



# **PHARMACOGENETIC STUDY IN THE IMMUNOSUPPRESSIVE TREATMENT WITH TACROLIMUS AND EVEROLIMUS**

Julia Concha Mayayo

Tesis doctoral en Ciencias de la Salud  
Facultad de Ciencias de la Salud,  
Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, 2023





# PHARMACOGENETIC STUDY IN THE IMMUNOSUPPRESSIVE TREATMENT WITH TACROLIMUS AND EVEROLIMUS

## ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DEL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR CON TACROLIMUS Y EVEROLIMUS

Tesis presentada por:

Julia Concha Mayayo

Para optar al título de doctor por la Universidad San Jorge

Dirigida por:

María Pilar Ribate Molina

Cristina Belén García García

Directora y tutora: Dra. María Pilar Ribate Molina

Codirectora: Cristina Belén García García

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, 2023



**Dra. María Pilar Ribate Molina**, Profesora Contratada Doctor de la Universidad San Jorge e Investigadora del grupo de Investigación GREENLIFE.

**Dra. Cristina Belén García García**, Profesora Contratada Doctor de la Universidad San Jorge e Investigadora del grupo de Investigación GREENLIFE.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación recogido en la presente Tesis titulada: “**Pharmacogenetic study in the immunosuppressive treatment with tacrolimus and everolimus**” presentada en la Universidad San Jorge, ha sido realizado bajo su dirección, por Dña. Julia Concha Mayayo y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor con Mención Internacional.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Villanueva de Gállego (Zaragoza) a 18 de julio de 2023.



Fdo. Dra. Mª Pilar Ribate



Fdo. Dra. Cristina B. García



# ÍNDICE





# ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
1. BREVE HISTORIA DE LOS INMUNOSUPRESORES	23
2. TACROLIMUS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO	25
2.1. HISTORIA Y EVOLUCION DEL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO	25
2.2. EVOLUCIÓN DEL INJERTO	27
2.2.1. Tipos de rechazo	27
2.2.2. Factores determinantes de la supervivencia y del rechazo	28
2.3. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE	30
2.3.1. Complejo mayor de histocompatibilidad-Antígeno leucocitario humano	31
2.3.2. Activación linfocitaria	33
2.3.3. Rechazo del trasplante y mecanismos asociados	34
2.3.3.1. Mecanismos celulares de rechazo	34
2.3.3.2. Mecanismos humorales de rechazo	35
2.4. VIAS INMUNOLÓGICAS IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS DE ACCION DE LOS PRINCIPALES FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES	36
2.4.1. Vía calcio calcineurina – Inhibidores de la calcineurina	36
2.4.2. Vía de bloqueo de la unión de IL-2 a su receptor –Bloqueadores IL-2R (CD25)	37
2.4.3. VÍA mTOR - Inhibidores de la mTOR	37
2.4.4. Vías de síntesis de nucleótidos – Inhibidores de la síntesis de ADN y ARN linfocitarios	37
2.4.5. Corticoesteroides	38
2.4.6. Otros inmunodepresores	38
2.5. PROTOCÓLOS DE INMUNOSUPRESIÓN	39

2.6. TACROLIMUS	40
2.6.1. Historia del tacrolimus	40
2.6.2. Mecanismo de acción	41
2.6.3. Farmacocinética	41
2.6.3.1. Absorción	42
2.6.3.2. Distribución	43
2.6.3.3. Metabolismo	43
2.6.3.4. Excreción	44
2.6.4. Interacciones farmacológicas: inhibidores, inductores y sustratos	44
2.6.5. Efectos adversos	46
2.6.5.1. Nefrotoxicidad	46
2.6.5.2. Hiperglucemia y efectos cardiovasculares	46
2.6.5.3. Tumores e infecciones	47
2.6.5.4. Efectos gastrointestinales y otros	48
2.6.6. Indicaciones y posología	49
3. EVEROLIMUS EN EL COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA	51
3.1. INTRODUCCIÓN, PREVALENCIA Y PRONÓSTICO	51
3.2. MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD	51
3.3. SIGNOS Y SÍNTOMAS ASOCIADOS	52
3.4. DIAGNÓSTICO	55
3.5. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO Y NO FARMACOLÓGICO	56
3.6. EVEROLIMUS	57
3.6.1. Historia de everolimus	57
3.6.2. Mecanismo de acción	58
3.6.3. Farmacocinética	58
3.6.4. Interacciones farmacológicas	59
3.6.5. Efectos adversos	60
3.6.5.1. Infecciones y tumores	61
3.6.5.2. Cardiovasculares	61
3.6.6. Indicaciones y posología	62
4. FARMACOGENÉTICA	63
4.1. DEFINICIÓN E HISTORIA DE LA FARMACOGENÉTICA	63
4.2. FARMACOGENÉTICA DE TACROLIMUS Y EVEROLIMUS	66
4.2.1. Genes que afectan a enzimas metabolizadoras de tacrolimus y Everolimus	67

4.2.1.1. Citocromo CYP3A5	68
4.2.1.2. Citocromo CYP3A4	70
4.2.1.3. Citocromo CYP2C8	74
4.2.2. Genes que afectan al transporte de tacrolimus y everolimus	75
4.2.3. Genes relacionados con la expresión y actividad de CYPs y glicoproteína-P	79
4.2.4. Genes que afectan a la terapia con inhibidores de la bomba de protones	81
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>87</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>91</b>
<b>HYPOTHESIS AND OBJECTIVES</b>	<b>95</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>98</b>
1. TACROLIMUS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO ALOPÁTICO	98
1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	98
1.2. ASPÉCTOS ÉTICOS	98
1.3. RECOGIDA DE VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS	99
2. EVEROLIMUS EN EL COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA	100
2.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	100
2.2. ASPÉCTOS ÉTICOS	100
2.3. RECOGIDA DE VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS	101
3. GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS SELECCIONADOS	102
3.1. Extracción de ADN	102
3.2. Análisis de los polimorfismos seleccionados	102
3.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction	104
3.2.2. Secuenciación Sanger	107
3.2.3. TaqMan® SNP Genotyping Assay	108
3.2.4. RhAmp SNP Genotyping System	110
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
<b>RESULTADOS</b>	<b>117</b>
1. RESULTADOS DEL ESTUDIO CON TACROLIMUS	117
1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO	117
1.2. ANÁLISIS INFERENCIAL	120

1.2.1.	Análisis de las variables demográficas y farmacocinéticas	120
1.2.2.	Análisis de la presencia de efectos adversos	121
1.3.	ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO	123
1.3.1.	Farmacogenética descriptiva de la población de estudio	123
1.3.2.	Relación de la farmacogenética con las variables farmacocinéticas	124
1.3.3.	Relación de la farmacogenética con la presencia de efectos adversos	129
2.	RESULTADOS DEL ESTUDIO CON EVEROLIMUS	132
2.1.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO	132
2.2.	ANÁLISIS INFERENCIAL	135
2.2.1.	Análisis de las variables demográficas y farmacológicas	136
2.2.2.	Análisis de la presencia de efectos adversos	136
2.3.	Análisis farmacogenético	137
2.3.1.	Farmacogenética descriptiva de la población de estudio	137
2.3.2.	Relación de la farmacogenética con las variables farmacocinéticas	139
2.3.3.	Relación de la farmacogenética con la presencia de efectos adversos	141
	<b>SUMMARY OF RESULTS</b>	<b>145</b>
	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
1.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE TACROLIMUS EN PACIENTES CON TRANSPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO	151
1.1.	EDAD, SEXO, PESO Y FALTA DE ADHERENCIA	151
1.2.	TIEMPO POST-TRASPLANTE, FUNCIÓN HEPÁTICA Y DIARREA	153
1.3.	HEMATOCRITO Y PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	155
1.4.	TRATAMIENTOS CONCOMITANTES	157
1.4.1.	Sustratos, inhibidores e inductores de CYP3A4 y gp-p	158
1.5.	EFFECTOS ADVERSOS	159
1.6.	CONSIDERACIONES SOBRE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS	160
1.7.	FARMACOGENÉTICA	160
1.7.1.	Genotipo de <i>CYP450</i> (metabolismo de tacrolimus)	160
1.7.2.	Genotipo de <i>ABCB1</i> (transporte tacrolimus)	163
1.7.3.	Genes relacionados con la expresión y actividad de CYPs y glicoproteína-P	165
1.8.	CASO DE INTERACCIÓN CON OMEPRAZOL	166
1.8.1.	Presentación del caso	166
1.8.2.	Discusión del caso	169

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE EVEROLIMUS EN PACIENTES CON COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA	172
2.1. EDAD, SEXO Y PESO	172
2.2. TRATAMIENTOS CONCOMITANTES Y EFECTOS ADVERSOS	172
2.3. FARMACOGENÉTICA	173
2.3.1. Genotipo de de <i>CYP450</i> (metabolismo de everolimus)	173
2.3.2. Genotipo de de <i>ABCB1</i> (transporte everolimus)	175
2.3.3. Genes relacionados con la expresión y actividad de CYPs y glicoproteína-P	176
3. LIMITACIONES	177
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>181</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>185</b>
<b>FUTURA PERSPECTIVA</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>195</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>221</b>



# **LISTADO DE ABREVIATURAS**





## LISTADO DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**AMF:** Ácido micofenólico

**ASC:** Área de superficie corporal

**AUC:** Área bajo la curva/*Area under the curve*

**CET:** Complejo de Esclerosis tuberosa

**CD:** *Cluster of differentiation*

**CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**CPIC:** *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

**CYP:** Citocromo

**DM:** Diabetes mellitus

**EEAA:** Efectos adversos

**EGI:** Eventos gastrointestinales

**EMA:** Agencia europea del medicamento/*European medicines agency*

**EVE:** Everolimus

**FDA:** Administración de alimentos y medicamentos/*Food and drug administration*

**FKB12:** Proteína de unión a FK 12-*FK Binding-protein 12*

**GWAS:** Estudio de asociación del genoma completo/*Genome-wide association study*

**HLA:** Antígeno leucocitario humano/*Human Leucocyte antigen*

**HTA:** Hipertensión arterial

**IBP:** Inhibidor de la bomba de protones

**IL:** Interleuquina

**KDIGO:** *Kidney disease: improving global outcomes*

**MEIA:** Enzimo inmunoensayo semiautomatizado por micropartículas

**mTOR:** *Mammalian target of rapamycin*

**NK:** Células *Natural Killer*

**NODAT:** Diabetes de nueva aparición post-trasplante/*New onset diabetes after transplantation*

**OMS:** Organización mundial de la salud

**ONT:** Organización nacional de trasplantes

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa/*Polymerase chain reaction*

**Pg-p:** Glicoproteína-P

**POR:** Oxidorreductasa del citocromo P450/*cytochrome P450 oxidoreductase*

**PXR:** Receptor X del pregnano/*Pregnane X receptor*

**RAML:** Angiomiolipoma renal

**SEGA:** Astrocitomas subependimarios de células gigantes

**SIA:** Sistema inmune adaptativo

**SII:** Sistema inmune innato

**SNP:** Polimorfismo de un único nucleótido/*Single nucleotide polymorphism*

**TAC:** Tacrolimus

**TFG:** Tasa de filtración glomerular

**TH1, TH2:** Linfocito T helper 1, Linfocito T *helper 2*

**TOS:** Trasplante de órgano sólido

**TSC:** Gen *Tuberous Sclerosis Complex*

# ÍNDICE DE TABLAS



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales citoquinas relacionadas con la alorrespuesta.	31
<b>Tabla 2.</b> Principales fármacos inhibidores, inductores y sustratos del CYP3A4 y gp-p.	45
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los efectos adversos de los anticalcineurínicos.	49
<b>Tabla 4 .</b> Esquema de manejo de la inmunosupresión a corto y largo plazo en el trasplante renal.	50
<b>Tabla 5.</b> Criterios de diagnóstico del complejo de esclerosis tuberosa.	55
<b>Tabla 6.</b> Fármacos habituales en pacientes con complejo de esclerosis tuberosa que son sustratos, inductores o inhibidores del CYP3A4 y/ gp-p.	60
<b>Tabla 7.</b> Efecto sobre el perfil lipídico de los diferentes fármacos inmunosupresores.	61
<b>Tabla 8.</b> Resumen de los fenotipos asociados con mayor evidencia en la literatura a cada polimorfismo estudiado.	82
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias alélicas en la población ibérica.	83
<b>Tabla 10.</b> Metodología/s utilizadas para el genotipado de cada uno de los polimorfismos.	103
<b>Tabla 11.</b> Primers, condiciones del termociclador y endonucleasas de restricción utilizados para cada uno de los polimorfismos analizados por PCR-RFLP.	106
<b>TABLA 12.</b> <i>Primers</i> utilizados para la amplificación previa por PCR del fragmento a secuenciar para cada polimorfismo analizado por secuenciación <i>Sanger</i> .	108
<b>TABLA 13.</b> Sondas TaqMan® empleadas y correspondencia de fluoróforos con cada alelo.	110
<b>Tabla 14.</b> Ensayo rhAmp® empleado y correspondencia de fluoróforos con cada alelo.	112
<b>Tabla 15.</b> Datos demográficos de la población de estudio de tacrolimus.	117
<b>Tabla 16.</b> Variables relacionadas con el tratamiento con tacrolimus.	118
<b>Tabla 17.</b> Efectos adversos presentados por los pacientes del estudio.	119

<b>Tabla 18.</b> Comparación de la frecuencia de los efectos adversos más representativos en la terapia inmunosupresora con tacrolimus y las características de los pacientes analizados.	122
<b>Tabla 19.</b> Prueba $X^2$ para la detección de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y de la frecuencia genotípica observada en la población Ibérica respecto a la cohorte de tacrolimus.	124
<b>Tabla 20.</b> Significación estadística para cada polimorfismo respecto a los datos farmacocinéticos de tacrolimus.	125
<b>Tabla 21.</b> Comparación de las variables farmacocinéticas entre combinaciones genotípicas de <i>CYP3A5</i> y <i>CYP3A4</i> en la cohorte de tacrolimus.	127
<b>Tabla 22.</b> Combinación de los polimorfismos <i>CYP3A4*1B</i> y <i>PXR A69789G</i> en la presencia de daño hepático en los pacientes del estudio con tacrolimus.	130
<b>Tabla 23.</b> Datos demográficos y farmacológicos de la población de estudio con complejo de esclerosis tuberosa.	132
<b>Tabla 24.</b> Características clínicas de los pacientes con complejo de esclerosis tuberosa, dosis de everolimus y dosis/ASC ajustada.	133
<b>Tabla 25.</b> Variables relacionadas con el tratamiento con everolimus.	134
<b>Tabla 26.</b> Efectos adversos derivados del tratamiento inmunosupresor con everolimus en los pacientes de estudio.	135
<b>Tabla 27.</b> Comparación de la frecuencia de los efectos adversos reportados en la terapia con everolimus y las características de los pacientes con complejo de esclerosis tuberosa.	137
<b>Tabla 28.</b> Prueba $X^2$ para la detección de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y de la frecuencia genotípica observada en la población Ibérica respecto a la cohorte del complejo de esclerosis tuberosa.	138
<b>Tabla 29.</b> Significación estadística (valor-p) para cada polimorfismo respecto a los datos farmacocinéticos de everolimus.	139

# ÍNDICE DE FIGURAS





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de alorrespuesta por vía directa e indirecta.	33
<b>Figura 2.</b> Cascada de activación de linfocitos T.	34
<b>Figura 3.</b> Metodología de cribado <i>cross-match</i> .	35
<b>Figura 4.</b> Principales vías de actuación de los fármacos inmunosupresores.	36
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción de diferentes tipos de inmunosupresores.	39
<b>Figura 6.</b> Estructura molecular de tacrolimus.	41
<b>Figura 7.</b> Combinación de los efectos de la gp-p y CYP3A4 sobre el fármacos metabolizados y transportados por estas vías.	44
<b>Figura 8.</b> Mecanismo molecular implicado en la aparición del complejo de esclerosis tuberosa.	52
<b>Figura 9.</b> Angiofibromas faciales asociados al complejo de esclerosis tuberosa	53
<b>Figura 10.</b> Manifestaciones clínicas del complejo de esclerosis tuberosa.	54
<b>Figura 11.</b> Estructura de EVE y su modificación molecular frente a sirolimus.	57
<b>Figura 12.</b> Dominios de unión a FKBP y mTOR de everolimus.	58
<b>Figura 13.</b> Línea temporal del número de entradas obtenidas en PubMed con el término “ <i>Pharmacogenetics</i> ” a fecha de junio de 2023.	64
<b>Figura 14.</b> Principales genes involucrados en la farmacocinética de tacrolimus y everolimus.	66
<b>Figura 15.</b> Distribución mundial de la variante CYP3A4*20, y específicamente en el territorio español.	72
<b>Figura 16.</b> Localización de los polimorfismos más relevantes de los genes CYP3A5 y CYP3A4 dentro del cromosoma 7.	74
<b>Figura 17.</b> Localización y estructura del gen <i>ABCB1</i> , localización de los principales SNPs y estructura tridimensional de la gp-p.	77

<b>Figura 18.</b> Patrones de bandas posibles para el SNP rs1128503 obtenido por RFLP-PCR mediante digestión con la endonucleasa <i>BsuRI</i> .	105
<b>Figura 19.</b> Metodología de secuenciación Sanger.	107
<b>Figura 20.</b> Metodología TaqMan® SNP Genotyping Assay, discriminación entre alelo VIC y FAM.	109
<b>Figura 21.</b> Metodología rhAmp™ SNP Genotyping System mediante discriminación alélica.	111
<b>Figura 22.</b> Dispersión de la dosis/peso ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) comparado con la edad (años) en el estudio de tacrolimus.	120
<b>Figura 23.</b> Dispersión de la dosis/peso ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) comparado con niveles en sangre (Co) de tacrolimus.	121
<b>Figura 24.</b> Diagrama de cajas de la dosis/peso de tacrolimus para cada grupo genotípico del SNP rs2740574.	126
<b>Figura 25.</b> Diagrama de cajas de la Co/dosis de tacrolimus para cada grupo genotípico del SNP rs2740574.	127
<b>Figura 26.</b> Diagrama de cajas de la dosis/peso de tacrolimus para los polimorfismos del gen <i>ABCB1</i> y A69789G del gen <i>PXR</i> en sujetos no portadores del alelo <i>CYP3A4*1B</i> .	129
<b>Figura 27.</b> Dispersión de la dosis/ASC ajustada de everolimus, respecto a la edad y presencia de fármacos inductores según indicaciones de ficha técnica.	134
<b>Figura 28.</b> Diagrama de cajas y bigotes de la dosis/ASC ajustada para las variantes G2677T y C3435T de everolimus.	140
<b>Figura 29.</b> Evolución temporal de Co ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), niveles de creatinina sérica ( $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ ) y dosis (mg al día).	168
<b>Figura 30.</b> Comparativa de la evolución de la Co/dosis a lo largo del tiempo con omeprazol y rabeprazol.	169
<b>Figura 31.</b> Inhibición de la actividad de la glicoproteína-P producida por el haplotipo TTT del gen <i>ABCB1</i> y la interacción con omeprazol.	171

# RESUMEN



## RESUMEN

La terapia inmunosupresora con tacrolimus y everolimus debe estar asociada a una rigurosa monitorización debido al estrecho margen que presentan ambos fármacos, de cara a evitar la presencia de ineffectividad terapéutica o en el lado opuesto, toxicidad. Tacrolimus es el fármaco de elección junto con ciclosporina en el trasplante de órgano sólido, en asociación o no con ácido micofenólico, corticoides y/o inhibidores de la mTOR. Por su parte, everolimus es el único fármaco aprobado hasta el momento para el tratamiento de ciertas manifestaciones asociadas a la enfermedad rara del complejo de esclerosis tuberosa. A pesar del seguimiento clínico, gran parte de estos pacientes se encuentran fuera del rango terapéutico, o incluso estando en niveles óptimos, presentan falta de efectividad o presencia de efectos adversos derivados del tratamiento farmacológico. Así mismo existe gran variabilidad inter e intraindividual que puede estar asociada a diversos factores demográficos, clínicos o genéticos.

El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar la posible influencia de ciertos polimorfismos genéticos en la respuesta terapéutica con tacrolimus y everolimus en dos cohortes de pacientes trasplantados y con complejo de esclerosis tuberosa respectivamente, y de este modo valorar la utilidad de la farmacogenética como herramienta de apoyo en la predicción de dosis terapéuticas óptimas o, de manera retrospectiva, explicar respuestas inesperadas.

Los pacientes del estudio fueron trasplantados renales, hepáticos, cardíacos o pulmonares, y pacientes pediátricos con diagnóstico de esclerosis tuberosa. Se recogieron datos demográficos, clínicos, terapéuticos y parámetros analíticos, y se analizaron los polimorfismos más representativos de los genes *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *CYP2C19*, *ABCB1*, *POR* y *PXR*. El análisis genético se hizo mediante secuenciación, PCR-RFLP o PCR a tiempo real.

Los resultados mostraron que la presencia de anemia y tratamientos concomitantes puede afectar a los parámetros farmacocinéticos y la aparición de efectos adversos de tacrolimus. Las variantes polimórficas *CYP3A4\*1B*, *PXR A69789G* y el haplotipo *ABCB1* se relacionaron con modificaciones en la farmacocinética y la presencia de nefrotoxicidad, daño hepático y efectos gastrointestinales de tacrolimus. Aunque para everolimus existe todavía escasa evidencia demostrada, la presencia de otros fármacos inhibidores de *CYP3A4* y polimorfismos genéticos relacionados con su metabolismo (*CYP3A4\*22*, *PXR C63396T* y *POR\*28*) y sus proteínas transportadoras (*ABCB1*), parecen asociarse a alteraciones en la dosificación de este fármaco y la presencia de neumonía e hipercolesterolemia.

Como conclusión, a pesar de la monitorización realizada en ambos fármacos sigue existiendo alta incidencia de efectos adversos de la terapia, y menos frecuentemente, inefectividades terapéuticas. A la par que las variables clínicas y tratamientos concomitantes, la información que nos proporciona la farmacogenética puede ayudar a tomar decisiones clínicas del paciente con tacrolimus y everolimus. Demostrada la alta variabilidad existente en los pacientes con estos tratamientos, la medicina personalizada supone una herramienta óptima para evitar potenciales interacciones e inefectividades, generando un gran beneficio para el paciente inmunodeprimido.

# **ABSTRACT**





## ABSTRACT

Immunosuppressive therapy with tacrolimus and everolimus must be associated with rigorous monitoring due to the narrow margins of both drugs, in order to avoid the presence of therapeutic ineffectiveness or, on the other hand, toxicity. Tacrolimus is the drug of choice together with cyclosporine in solid organ transplantation, in association or not with mycophenolic acid, corticosteroids and/or mTOR inhibitors. Everolimus is the only drug approved to date for the treatment of certain manifestations associated with the rare disease tuberous sclerosis complex. Despite clinical monitoring, many of these patients are outside the therapeutic range, or even at optimal levels, show a lack of effectiveness or the presence of adverse effects derived from drug treatment. There is also great inter- and intra-individual variability that may be associated with various demographic, clinical or genetic factors.

The aim of this doctoral thesis is to evaluate the possible influence of certain genetic polymorphisms on the therapeutic response to tacrolimus and everolimus in two cohorts of transplanted patients and patients with tuberous sclerosis complex, respectively. Therefore, it is intended to assess the usefulness of pharmacogenetics as a tool to support the prediction of optimal therapeutic doses or, retrospectively, to explain unexpected responses.

The study patients were renal, liver, heart or lung transplant recipients and paediatric patients diagnosed with tuberous sclerosis. Demographic, clinical, therapeutic and analytical parameters were collected, and the most representative polymorphisms of *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *CYP2C19*, *ABCB1*, *POR* and *PXR* genes were analysed. Genetic analysis was done by sequencing, PCR-RFLP or real-time PCR methods.

The results showed that the presence of anaemia and concomitant treatments may affect the pharmacokinetic parameters and the occurrence of adverse effects of tacrolimus. The polymorphic variants *CYP3A4\*1B*, *PXR* A69789G and the *ABCB1* haplotype were associated with changes in the pharmacokinetics and the occurrence of nephrotoxicity, liver damage and gastrointestinal effects of tacrolimus. Although there is still little evidence for everolimus, the presence of other *CYP3A4* inhibitors and genetic polymorphisms related to its metabolism (*CYP3A4\*22*, *PXR* C63396T and *POR\*28*) and its transporter proteins (*ABCB1*) seem to be associated with alterations in the dosing of this drug and the presence of pneumonia and hypercholesterolaemia.

In conclusion, despite the monitoring of both drugs, there is still a high incidence of adverse effects of therapy and, less frequently, therapeutic ineffectiveness. In addition to clinical variables and concomitant treatments, the information provided by pharmacogenetics can help us to make clinical decisions for patients with tacrolimus and everolimus. Given the high variability that exists in patients with these treatments, personalised medicine is an optimal tool for avoiding potential interactions and ineffectiveness, generating a great benefit for the immunocompromised patient.

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. BREVE HISTORIA DE LOS INMUNOSUPRESORES

La modulación de la respuesta inmune es una estrategia farmacológica utilizada desde hace muchos años. Por una parte, es utilizada para aumentar la respuesta frente a ciertos patógenos como pueden ser el caso del desarrollo de vacunas; mientras que, por otra, permite disminuirla impidiendo la hiperreactividad de este sistema. El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en cada tipo de respuesta celular ha permitido diseñar con el tiempo fármacos inmunomoduladores más específicos. En inmunodeficiencias se utilizan fármacos substitutivos como pueden ser citocinas, factores estimulantes del crecimiento hematopoyético, inmunoglobulinas o anticuerpos monoclonales (1). En el lado opuesto se encuentran los inmunosupresores, definidos como fármacos que anulan la respuesta inmunitaria de un organismo. Estos últimos son utilizados en un amplio espectro de patologías como pueden ser enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias intestinales, ciertos tipos de cáncer, enfermedades reumáticas (artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus eritematoso), afecciones dermatológicas (dermatitis atópica, urticaria crónica) o el trasplante de órganos sólido (TOS). El tipo de agente inmunosupresor utilizado en cada caso dependerá del mecanismo inmune implicado en la patología. En muchos casos se utilizan combinaciones de estos con el fin de abordar la inmunosupresión desde diferentes mecanismos de acción, ejercer una sinergia o reducir la dosis de cada molécula para disminuir la incidencia de efectos adversos (EEAA)(2).

En la década de 1940 se consiguió sintetizar con éxito el primer corticoesteroide, la cortisona, utilizado para tratar el lupus. Durante la década de los 60, cuando empezaron a realizarse mayor numero de TOS, el tratamiento inmunosupresor se basaba en la utilización de grandes dosis de corticoides asociados a 6-mercaptopurina, y más tarde su profármaco azatioprina, lo cual producía una alta incidencia de EEAA e infecciones asociados a la mielosupresión, así como alta prevalencia de rechazos del injerto (3). No fue hasta la siguiente década, en 1972, cuando se descubrió el primer fármaco capaz de regular selectivamente a los linfocitos T, la ciclosporina, aprobándose en 1983 para su uso clínico. La ciclosporina permitía una mayor especificidad en la prevención del rechazo y menor riesgo de infecciones, siendo una nueva promesa para el campo de los trasplantes. La tasa de supervivencia a un año tras el trasplante se triplicó durante los siguientes 20 años. Al igual que otros inmunosupresores se aisló a partir de un hongo, concretamente *Tolypocladium inflatum*, encontrado en tierra procedente de Noruega (4). En 1984 se descubrió otro inhibidor de la calcineurina, tacrolimus (TAC, o FK506), con mayor potencia que esta. Inicialmente se utilizaba solo en casos resistentes a ciclosporina y finalmente se instauró como fármaco de primera línea permitiendo elevar la tasa de supervivencia a un año hasta el 90%. Posteriormente en la década de 1990 aparecieron otros fármacos

inmunosupresores como ácido micofenólico (AMF), sirolimus y algunos anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados. Más tarde, apareció everolimus (EVE), un derivado de sirolimus, aunque sus primeras indicaciones fueron para carcinoma renal (5).

A día de hoy existe una amplia variedad de fármacos inmunosupresores, la mayoría con diferentes tipos de formulaciones y tecnología farmacéutica que permite modificar la farmacocinética del mismo, como pueden ser presentaciones de liberación modificada o retardada; o la disminución de EEAA, con fin de reducir la incidencia de eventos gastrointestinales (EGI) en las presentaciones orales entre otros (ej. sal sódica de AMF con cubierta entérica: Myfortic® vs el micofenolato mofetilo (éster de ácido micofenólico): Cellcept®).

Esta tesis se ha centrado en el estudio de dos inmunosupresores, TAC y EVE. El primero se ha estudiado como tratamiento de trasplante de órgano alopático, incluyendo injertos hepáticos, renales, cardíacos, pulmonar y pancreático. Por su parte, EVE se ha estudiado como tratamiento de la enfermedad del Complejo de Esclerosis Tuberosa (CET) en pacientes pediátricos.

## **2. TACROLIMUS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO**

### **2.1. HISTORIA Y EVOLUCIÓN DEL TRANSPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO**

El tipo de trasplante se puede clasificar en función de la procedencia, denominándose autotrasplante o trasplante autólogo si es del propio individuo a sí mismo, isotrasplante o trasplante sinérgico si es entre dos individuos genéticamente idénticos (gemelos), o alotrasplante o trasplante alogénico si es entre individuos genéticamente diferentes dentro de la misma especie. Adicionalmente, el xenotrasplante o trasplante xenogénico es aquel que se produce entre individuos de diferentes especies. El primer caso TOS alogénico en humanos se realizó en 1953. Fue un caso de trasplante de riñón donde el receptor sufrió un rechazo 22 días tras la operación por incompatibilidad inmunológica. Dos años más tarde en Boston se realizó el primer trasplante renal con éxito a largo plazo entre dos gemelos homocigóticos, ya que se garantizaba la ausencia de rechazo inmunológico al tratarse de isoinjertos. Los primeros intentos a nivel mundial con mayor o menor éxito de TOS alogénico no renal se realizaron ya en la década de 1960. Se pusieron en práctica trasplantes de corazón, pulmón, hígado y pancreático. La supervivencia del paciente no era muy prolongada por lo que en cierta medida algunos de ellos dejaron de llevarse a cabo. La llegada del primer inmunosupresor clásico, la ciclosporina, permitió resultados más alentadores por lo que empezaron a implantarse protocolos de trasplante en distintos hospitales a nivel mundial (6). Concretamente en España, el primer trasplante realizado fue de córnea en 1940. Posteriormente se realizó el de tipo renal en 1965 en Barcelona. No fue hasta 1983 cuando se llevó a cabo el primer trasplante hepático, seguido del primer trasplante cardiaco en 1984, y pulmonar en 1990. A día de hoy en España se realizan anualmente más de 300 trasplantes cardíacos en 20 centros, alrededor de 100 pancreáticos en 12 centros, más de mil hepáticos en 27 centros, 400 pulmonares en 8 centros y más de tres mil renales en 47 centros hospitalarios españoles. Según últimos datos de 2022, en España se realizaron un total de 5.383 TOS, obteniendo una tasa de trasplante de 113,4 por millón de población (p.m.p.), alcanzada gracias a una tasa de 46,3 donantes por millón de población (7). Estas cifras permiten al país encabezar la lista de trasplantes a nivel mundial desde hace más de tres décadas gracias a la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), dependiente del Ministerio de Sanidad, y el expandido “modelo español”, reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un referente. En 2005 se firmó el primer acuerdo anual entre la ONT y OMS para la cooperación en materia de donación y trasplantes (8). El modelo español cuenta entre otros con la figura del coordinador de trasplantes, quien se encarga de liderar, integrar y optimizar la búsqueda de donante y receptor. En España, el todo este proceso está regulado por el Real Decreto 1723/2012, de 28 de diciembre, por el que se regulan las actividades de

obtención, utilización clínica y coordinación territorial de los órganos humanos destinados al trasplante y se establecen requisitos de calidad y seguridad. Este decreto no solo regula el acto quirúrgico en sí, sino que implica un proceso largo de medicación adecuada enfocado a prevenir el rechazo del injerto. El paciente debe ser consciente de la importancia del tratamiento farmacológico crónico y hábitos de vida saludables para la optimización de este proceso.

El donante debe cumplir una serie de requisitos antes de ser apto para la donación. Entre ellos se realiza una exploración física completa, análisis o serologías específicas del órgano objeto, recogida de antecedentes personales y otros factores concluyentes. En caso de donantes cadáver, su última evolución en la unidad de cuidados intensivos antes de certificarse el fallecimiento también será un factor determinante (9).

Este modelo ha permitido incrementar notablemente el número de donantes. Aun así, las listas de espera para recibir un trasplante son amplias y el tiempo es muy variable en función de la disponibilidad de donantes y la clínica del propio paciente. Sin embargo, realizar el trasplante a término o con éxito no siempre es posible. Actualmente entre un 10 y un 15% de los pacientes trasplantados de corazón o pulmón y un 6% de los hepáticos fallecen durante el ingreso hospitalario peri-trasplante. En general, un 10% fallece antes de encontrar donante, y otro 10% no podrá recibir un trasplante por su estado deteriorado de salud u otros criterios de exclusión como patologías tumorales activas o causa de muerte desconocida (10).

Los grandes avances en farmacología han permitido mejorar sustancialmente los resultados del trasplante. Las altas tasas de éxito se dan sobre todo a corto plazo, donde la supervivencia del injerto y el paciente dentro del primer año es muy elevada. En el caso de trasplante renal, que es el tipo de TOS más frecuente, si procede de donante fallecido la supervivencia de injerto y paciente alcanza el 93% y 96% respectivamente, mientras que en el caso de donante vivo es 96% y 98% respectivamente. Sin embargo, a 10 años vista estas se reducen a 70% y 72% en caso de donante fallecido, y 80% en caso de donante vivo, siendo aun así resultados bastante alentadores (11).

Desde hace unos años el trasplante xenogénico se propone como potencial candidato ante la falta de órganos alogénicos y las largas listas de espera a nivel mundial. Sin embargo, la incompatibilidad inmunológica entre especies ha hecho que se haya descartado por el momento. Existen empresas dedicadas a la creación de animales transgénicos donde se introducen y silencian genes con la intención de bloquear la reactividad inmunogénica que se daría al tratarse de diferentes especies. En enero de 2022 en Estados Unidos se llevó a cabo el primer trasplante xenogénico con éxito sobre un paciente vivo, recibiendo un corazón porcino



transgénico, y alargando su vida durante dos meses más. Queda todavía mucho por explorar en este campo y parece que no se ha descartado la posibilidad de considerarse como alternativa a pesar de suponer un reto inmunológico (12).

## **2.2. EVOLUCIÓN DEL INJERTO**

El éxito del trasplante va a estar determinado por la supervivencia del paciente y del injerto. Existen diferentes tipos de rechazo asociados a diferentes causas y que cursan con mecanismos fisiopatológicos diferenciados.

### **2.2.1. Tipos de rechazo**

El rechazo del órgano trasplantado puede clasificarse en función de su evolución temporal y su histopatología:

- **Rechazo hiperagudo:** Ocurre en las primeras 48 horas post-trasplante. Se debe a la existencia de aloanticuerpos preformados que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo ABO endoteliales del donante o a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los anticuerpos migran al injerto reclutando células proinflamatorias y activando el sistema de complemento y plaquetario. Se produce una oclusión trombótica de la vasculatura con posterior infarto del injerto. No tiene solución salvo la extracción del injerto implantado. Gracias a las pruebas de compatibilidad previas, es inusual (1%) (13).
- **Rechazo agudo acelerado:** Ocurre dentro de los 3-5 primeros días tras el trasplante. Se debe a una reacción de anticuerpos no fijadores del complemento contra el injerto. También es inusual y el tratamiento suele ser complicado, aunque ha habido grandes avances(13).
- **Rechazo celular agudo:** Ocurre durante los primeros días a meses, con una incidencia del 15-25% durante los tres primeros meses. Interviene una respuesta celular y humoral. Los linfocitos CD8+ son predominantes lisando las células del injerto de forma específica, mientras que los CD4+ secretan citoquinas proinflamatorias produciendo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado. Hay una necrosis de las paredes vasculares del injerto, diferente a la del rechazo hiperagudo. En injertos con mayor irrigación (renal) la destrucción es mayor. El tratamiento consiste en un aumento de la terapia inmunosupresora, con la posibilidad de fibrosis de la parte afectada(13).

- **Rechazo crónico:** Evolución variable en el tiempo (habitualmente entre 6 meses y un año) y con diferentes etiologías (derivada de rechazo temprano, isquemia, toxicidad farmacológica, infecciones víricas...). Al igual que el rechazo agudo, tiene alta incidencia. Cursa con isquemia en parches y fibrosis, llevando a la pérdida funcional del órgano. Están principalmente implicados los linfocitos T CD4+ y B frente a los linfocitos T CD8+. El tratamiento es complicado debido a los cambios histológicos permanentes y la lenta progresión. Ciertos factores como la baja adherencia (al tratamiento y otros), la reacción inmunológica cruzada, hiperlipemia, hipertensión arterial e infecciones víricas se asocian a riesgo aumentado de disfunción crónica y rechazo. En el injerto renal además la diabetes mellitus y nefrotoxicidad por anticalcineurínicos (ej. TAC) se han visto relacionados (14).

### 2.2.2. Factores determinantes de la supervivencia y del rechazo

La supervivencia a largo plazo está condicionada a diferentes factores. Entre ellos se encuentra el tipo de injerto, edad del donante y receptor, tiempo de isquemia del injerto (determinada por el tipo de donación), raza, histocompatibilidad, situación clínica del receptor (comorbilidades metabólicas), y la toxicidad asociada a la inmunosupresión post-trasplante (15). Una de las principales causas de la reducción de la supervivencia por deterioro del injerto es el rechazo agudo (16).

La edad media del donante ha aumentado 20 años en las últimas dos décadas debido a la reducción de los accidentes de tráfico. El donante medio actual es un varón de 60 años fallecido por muerte encefálica tras accidente cerebrovascular (17). Por ello la ONT ha lanzado planes estratégicos para aumentar la donación en vivo de aquellos órganos que así lo permiten (renal y hepático). En cuanto a los receptores, según datos de la ONT, solo el 4.6% eran pacientes pediátricos en 2017, el resto adultos con una predominancia de mujeres (67%).

El tipo de donante se divide a grandes rasgos en:

- **Donante vivo:** solo predomina actualmente en ciertos países asiáticos y africanos. Generalmente se da en donaciones de riñón, porción del hígado o pulmón (18).
- **Donante cadáver por muerte encefálica:** certificada por criterios neurológicos. Las principales causas son accidente cerebrovascular, y traumatismo craneoencefálico. Representa el 70% de las donaciones en España. El 11% supera los 80 años por lo que la calidad de los órganos es limitada teniendo mayor sensibilidad a eventos tóxicos o isquémicos (19). La tasa de supervivencia en cuidados intensivos de estos pacientes está ascendiendo por lo que surge la necesidad de impulsar otros tipos de donantes(20).

- **Donante cadáver en asistolia:** certificada por criterios cardiovasculares tras el fracaso de las maniobras de reanimación cardiopulmonar. Supone actualmente el 17% de las donaciones en España (21).

El tiempo que permanece el injerto en isquemia, es decir, sin perfusión directa de sangre, va a determinar la calidad de este. Se habla comúnmente de tiempo de isquemia fría cuando refleja el tiempo que pasa el injerto bajo perfusión con la solución de refrigeración a 4°C, aplicada para disminuir la demanda metabólica del órgano hasta el trasplante, y el “descamplaje” arterial en el receptor, es decir, la unión y perfusión al órgano de sangre propia del receptor. Los tiempos de isquemia son más elevados en caso de donantes cadáver lo que tiene una implicación directa en la viabilidad del trasplante. Tiempos de isquemia fría superiores a 24h se asocian a mayor disfunción del injerto, siendo especialmente importante en el caso de trasplante de corazón, hígado, páncreas y pulmón donde no debe superar las 8h. Usualmente, los injertos renales pueden permanecer más tiempo bajo refrigeración. Los mecanismos celulares asociados a este proceso se asemejan a una enfermedad inflamatoria aguda y produciendo daño tisular.

En cuanto a la raza, los sujetos negros tienen menor posibilidad de recibir un trasplante compatible, así como mayor incidencia de rechazo comparado con sujetos blancos, debido a la mayor diversidad genética implicada en los procesos de histocompatibilidad (22).

Por otro lado, la falta de adherencia al tratamiento farmacológico es otro factor de riesgo de disfunción del injerto y rechazo. Dentro de esta no adherencia entra la correcta toma de fármacos inmunosupresores y otros co-tratamientos, revisiones médicas, pruebas analíticas, alimentación y estilo de vida saludable. Hay que tener en cuenta que se trata de pacientes con circunstancias patológicas complicadas, usualmente polimedicados y con tratamientos inmunosupresores con EEAA potencialmente graves. Usualmente la falta de adherencia se relaciona con rechazo de tipo crónico ya que la concienciación dentro de los 6 primeros meses post-trasplante es mayor. Un estudio llevado a cabo en 315 trasplantados renales puso de manifiesto que el 64% de los rechazos ocurridos fueron causados por mecanismos mediados por anticuerpos. De ese porcentaje, el 47% de los pacientes no eran adherentes(23).

Para comprender los mecanismos implicados en el trasplante y su tratamiento es necesario conocer a nivel molecular los mecanismos implicados en la inmunología humana.

### 2.3. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE

Uno de los mecanismos esenciales de supervivencia para cualquier ser vivo se basa en el reconocimiento de lo ajeno y la protección a uno mismo. Cuando se realiza un trasplante, un órgano o parte procedente de un donante es introducido en otro ser vivo, el receptor, a priori de la misma especie (aloinjerto). La primera barrera de protección (piel, mucosas) es atravesada y entran en juego otros componentes del sistema inmune. La reacción que se puede desencadenar es compleja y variable. La eficacia de esta dependerá de la capacidad del huésped para eliminar aquello que no se reconoce como propio. Para comprender las respuestas inmunológicas asociadas al trasplante es necesario conocer los principios básicos de la inmunología en que estas se sustentan.

La primera respuesta llevada a cabo por el sistema va a ser rápida pero inespecífica, y el encargado de producirla es el llamado Sistema Inmune Innato (SII). Este sistema reconoce estructuras comunes a diferentes patógenos, a menudo patrones, produciendo una reacción de defensa en la que están implicados varios componentes (24).

- **Neutrófilos:** primera línea de defensa en la sangre mediante fagocitosis y lisis celular.
- **Macrófagos:** Se encuentran a nivel tisular. Producen fagocitosis y lisis para posteriormente actuar como célula presentadora de antígenos a través de moléculas de Histocompatibilidad clase I y II, también antígeno leucocitario humano I y II (*HLA-I* y *HLA-II*) por sus siglas en inglés, que se explicaran con mayor detalle posteriormente.
- **Células dendríticas:** actúan como célula presentadora de antígenos sin poder de fagocitosis.
- **Células *Natural Killer* (NK):** destruyen células infectadas (virus) y aquellas que no cuentan con *HLA-I*. También reconocen células recubiertas de anticuerpos.
- **Citoquinas, citocinas o interleuquinas (IL):** son proteínas que estimulan el crecimiento y diferenciación de linfocitos y monocitos siendo imprescindibles en los mecanismos de inflamación y eliminación de aquello no reconocido como propio. Las principales citocinas involucradas en la alorrespuesta y sus acciones se resumen en la Tabla 1:

**Tabla 1. Principales citoquinas relacionadas con la alorrespuesta**

Citocina	Productora	Acciones principales
IL-2	Th1	Expansión clonal, expansión de NK
IFN-gamma	Th1	Aumenta la expresión de HLA I y II
IL-4	Th2	Expansión clonal de linfocitos T y B. Inhibe la producción de IFN-gamma
IL-5	Th2	Activa eosinófilos. Activa y expande linfocitos B
IL-6	Th2, monocitos, endotelio	Diferenciación de linfocitos B
IL-1	Monocitos	Activa linfocitos T. Activa macrófagos
TNF-x	Monocitos	Aumenta la expresión de E-selectina e ICAM-1
IL-12	Monocitos	Activa NK y linfocitos T
IL-8	Monocito, endotelio	Quimiotaxis, facilita la adherencia
IL-15	Monocitos, médula ósea	Mantenimiento de células NK
IL-7	Médula ósea	Aumenta la IL-2 e IL-2R

Th1: linfocito T *helper* 1; Th2: Linfocito T *helper* 2, INF: interferón; TNF: Factor de necrosis tumoral; ICAM: Moléculas de adhesión. Tabla adaptada de (24).

Existen otras citoquinas con funciones inmunodepresoras, como las IL-10 o el factor del crecimiento transformante-beta, secretadas por linfocitos T reguladores que ayudan a regular una respuesta excesiva que pueda dañar al propio cuerpo.

En principio este SII no debería ser activado cuando se introduce el aloinjerto en el receptor, dado que se trata de sujetos de la misma especie, pero existen una serie de factores que podrían actuar como la presencia de virus latentes en el injerto o contacto con otros patógenos durante el proceso del trasplante.

Por otro lado, se encuentra el Sistema Inmune Adaptativo (SIA), con la peculiaridad de poseer memoria y especificidad frente a exposiciones antigénicas sucesivas. Participan las células linfoides que poseen receptores en la membrana que les permiten identificar y ser activadas por un antígeno específico. Las principales células implicadas son los linfocitos T y linfocitos B. Estas células responden a un estímulo específico induciendo la producción de células efectoras a través de la inmunidad celular, o bien sintetizando anticuerpos a través de la inmunidad humoral (25).

### 2.3.1. Complejo de mayor histocompatibilidad- Antígeno leucocitario humano

El CMH es una familia de genes codificados en el cromosoma 6 en humanos y es el principal responsable de la presentación antigénica a los linfocitos T, y por lo tanto, de desencadenar la

respuesta del SIA. Este complejo permite distinguir lo propio de lo ajeno. En humanos, es usualmente denominado sistema *HLA*. Dentro del cromosoma 6, este complejo está codificado en 6 loci diferentes, siendo el locus (singular de loci) el lugar concreto dentro del cromosoma que determina la posición de un gen (26). Los genes codificantes para las moléculas de este complejo son altamente polimórficos. Esto quiere decir que los genes que contienen la información necesaria para transformar la secuencia bases nitrogenadas del ácido desoxirribonucleico (ADN) (adenina, timina, guanina y citosina) en las proteínas del *HLA* finales presentan alta variedad entre individuos. Esta variedad se hace presente a través de lo que se denomina alelos (27). Los 6 locus diferenciados se identifican como A, B, C, DR, DP y DQ, mientras que cada alelo se diferencia mediante un número. Concretamente, se han descubierto hasta la fecha más de 300 alelos para el locus A, 500 para el B, 150 para el C, 400 para DR y 50 para DQ. Por lo tanto, las posibles combinaciones de alelos son inmensas generando que entre dos individuos de la misma especie el sistema inmune reaccione por reconocer algo ajeno, y determinando por tanto la compatibilidad entre donante y receptor (28). El motivo por el cual el parentesco aumenta la posibilidad de compatibilidad de órganos entre sujetos se debe en parte a la combinación de alelos en este complejo. Los genes *HLA* se transmiten de un individuo a la descendencia conjuntamente en forma de bloque, también llamado haplotipo. Cada uno de los progenitores traslada la información genética en forma de haplotipo a su descendencia, pudiéndose generar diferentes combinaciones, de manera que el perfil genético generado corresponde en un 50% a cada uno de los progenitores. A priori será distinto en cada individuo de la descendencia, pudiendo compartir o no uno o varios haplotipos entre hermanos.

Los genes *HLA A, B y C* codifican para moléculas HLA tipo I (HLA-I) y su función es presentar antígenos del interior celular, usualmente virus, a los linfocitos T que expresan moléculas CD8 en su membrana (linfocitos CD8+ citotóxicos). Las HLA-I se encuentran en la membrana de todas las células nucleadas. Los genes *HLA DR, DP y DQ* codifican para moléculas HLA tipo II (HLA-II) y su función es presentar antígenos extracelulares a los linfocitos T que expresan moléculas CD4 en su membrana (linfocitos T CD4+ *helper*). Las HLA-II se encuentran en células encargadas de presentar antígenos como monocitos, células dendríticas y linfocitos B (24). Normalmente la presentación antigénica se hace a través de péptidos. Las moléculas CD (*cluster of differentiation*) son marcadores de superficie celular que identifican el tipo de célula y diferenciación, existiendo más de 300 CD conocidos no solo presentes en linfocitos.

### 2.3.2. Activación linfocitaria

Para que el linfocito T reconozca al antígeno/péptido y sea activado comenzando la cascada de reacción inmunitaria es necesario que sus receptores entren en contacto con las células presentadoras de antígenos mencionadas. Este contacto puede ser por vía directa, cuando las células presentadoras de antígenos alogénicas (del donante) presentan péptidos a través de moléculas HLA al linfocito T del receptor; o indirecto, cuando las propias células presentadoras de antígenos del receptor presentan moléculas HLA y péptidos alogénicos a los linfocitos T del receptor. La vía directa suele desencadenar una alorrespuesta más intensa y parece ser que esta más involucrada en episodios de rechazo agudo y respuesta a corto plazo tras el trasplante; mientras que la indirecta en el rechazo crónico (figura 1) (29).

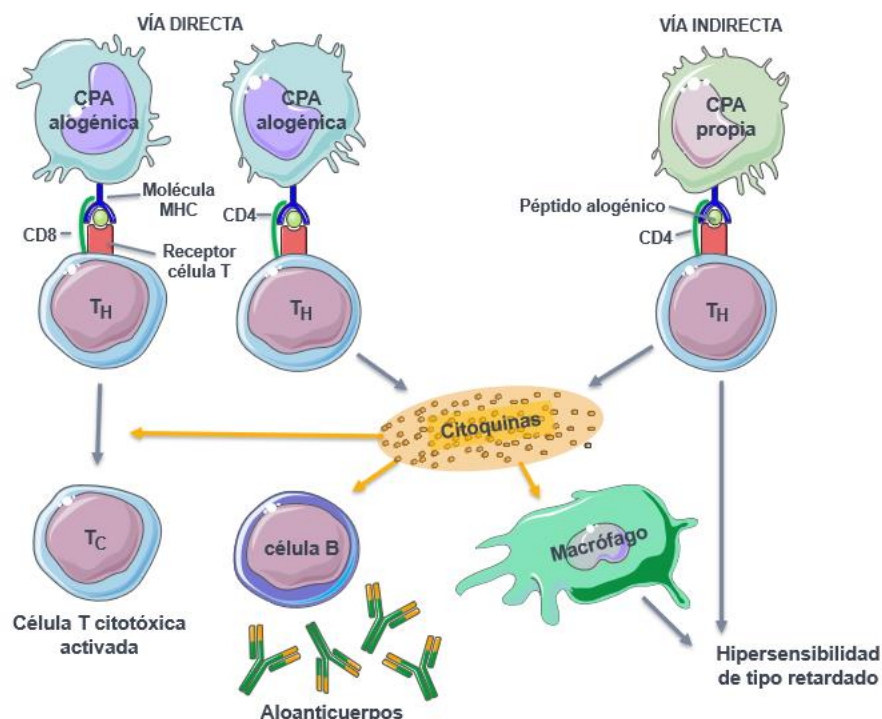
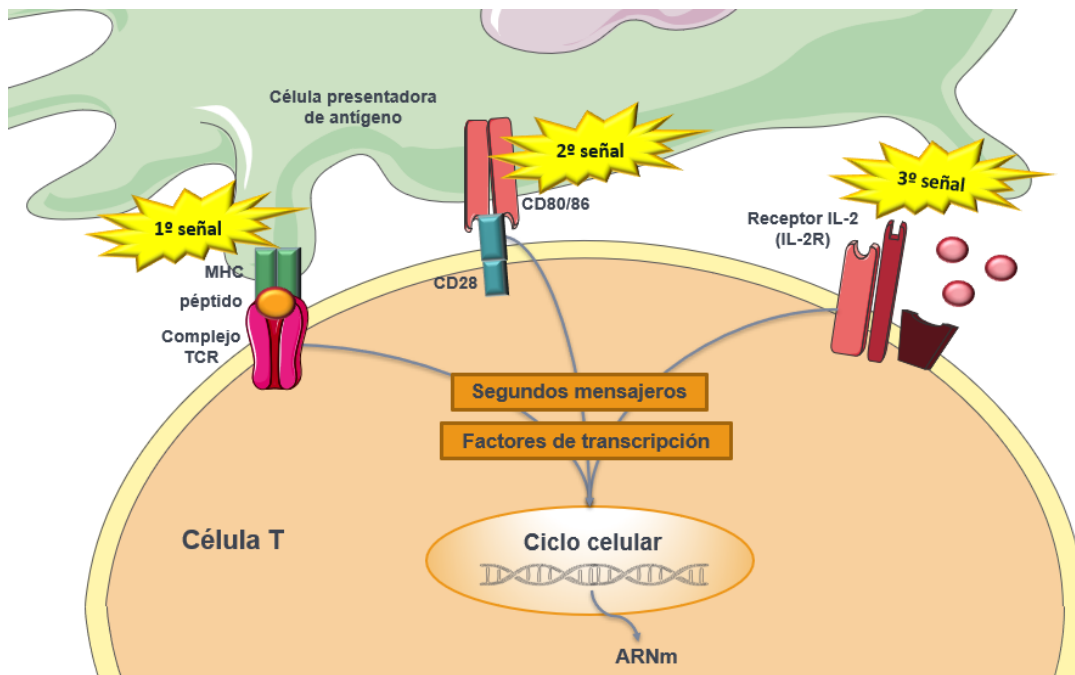


Figura 1. Mecanismos de alorrespuesta por vía directa e indirecta. Elaboración propia.

Tras este primer contacto los linfocitos son activados. Concretamente, tras su activación los linfocitos T CD4+ podrán diferenciarse en dos subtipos. El subtipo Th1 estará involucrado en una respuesta de tipo celular, secretando mayoritariamente IL tipo 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ); mientras que el subtipo Th2 será secretor de IL tipo 4, 5 y 6 entre otros activando a linfocitos B y por tanto participando en una respuesta de tipo humoral.

Sin embargo, para que exista una activación efectiva y expansión clonal tanto de linfocitos T *helper* como citotóxicos, los linfocitos T necesitan una segunda vía de señalización, en este caso a cargo de células presentadoras de antígenos más especializadas y moléculas de coestimulación, como la CD28 del linfocito. Finalmente, una tercera señal proveniente de

citoquinas como la IL-2. Sin estas señales el linfocito es incapaz de responder a estímulos e incluso entra en apoptosis (muerte celular programada). La figura 2 representa las tres señales nombradas para la activación de linfocitos T.



**Figura 2. Cascada de activación de linfocitos T.** Elaboración propia.

Por otro lado, los linfocitos B activados producirán anticuerpos de defensa. Los anticuerpos o inmunoglobulinas contienen una región peptídica constante (Fc) que determina la clase G, A, M, D y E; y otra variable (Fab) que genera la unión específica al antígeno (24). Esta unión permite la inmovilización del antígeno para su posterior eliminación. Además, los linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos y estimular al linfocito T *helper* a secretar citoquinas.

### 2.3.3. Rechazo del trasplante y mecanismos asociados

La alorrespuesta más común frente al injerto es de tipo celular, siendo más difícil de monitorizar, pero con mejor respuesta frente al tratamiento inmunosupresor convencional. La respuesta humoral por su parte es menos frecuente, fácil de monitorizar, pero menos fármaco-respuesta.

#### 2.3.3.1. Mecanismos celulares del rechazo

Los linfocitos CD4+ secretan citoquinas inflamatorias ante la presencia de moléculas HLA-II alogénicas, como se ha comentado anteriormente, estimulando la proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+. Los linfocitos CD8+ también reconocen moléculas HLA-I y tras ser activados, eliminan células del donante por citotoxicidad directa. Tras la activación los linfocitos son capaces de migrar de las zonas linfáticas, y para poder llegar al injerto, necesitan de la ayuda de



moléculas de adhesión, que suelen ser inducidas por ciertas citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1). Además, las citoquinas juegan un papel muy importante en la quimiotaxis, es decir, la atracción de todos esos leucocitos (neutrófilos, macrófagos, linfocitos T) al injerto. Frente a estas circunstancias, se han desarrollado fármacos bloqueantes de moléculas de adhesión y ciertas citoquinas

### 2.3.3.2. Mecanismos humorales del rechazo

El rechazo del injerto en el momento del trasplante mediado por anticuerpos es casi inexistente debido a la realización de una prueba de *cross-match* antes del procedimiento, en la que linfocitos del donante y suero del receptor se ponen en contacto para determinar la reacción antigénica (figura 3).

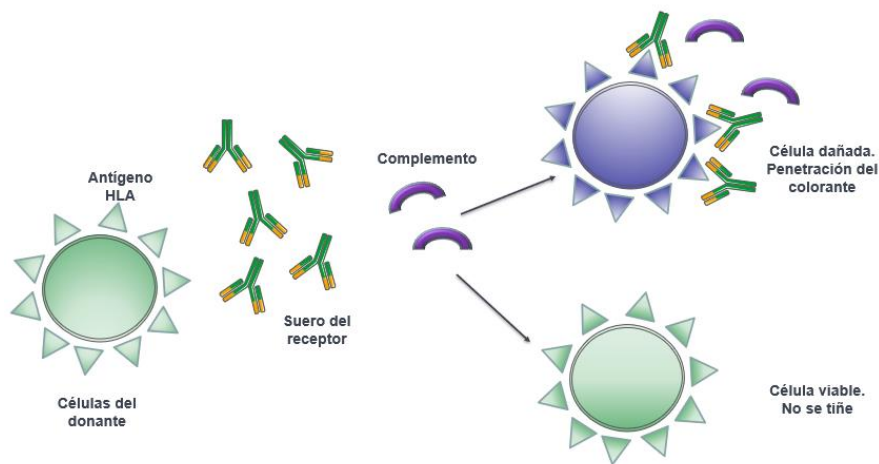


Figura 3. Metodología de cribado *cross-match*. Elaboración propia

En caso de ser positiva, se produciría una trombosis y necrosis del injerto en el periodo inmediatamente posterior al trasplante. Esta prueba es de vital importancia en todo tipo de injertos excepto en el hepático, por su capacidad de liberar moléculas HLA bloqueadoras de anticuerpos (30).

Los pacientes hipersensibilizados son aquellos que presentan anticuerpos o linfocitos T de memoria frente a una alta variedad de antígenos HLA. Esta variedad puede haber sido inducida por trasplantes previos, transfusiones de sangre, embarazo, o virus con estructuras similares a moléculas HLA. Esta reacción cruzada constituye una barrera en la recepción de órganos y a menudo los pacientes hipersensibilizados tienen altos tiempos de espera hasta poder encontrar un donante compatible (31).

La aparición de anticuerpos tras el trasplante (*de novo*) es más resistente a los tratamientos inmunosupresores, concretamente corticoides, pudiendo generar en los primeros meses daño

vascular del injerto, y a largo plazo lesión endotelial y rechazo crónico. Sin embargo, parece que combinaciones de TAC y AMF son más efectivas (31).

## 2.4. VÍAS INMUNOLÓGICAS IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PRINCIPALES FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES

Los mecanismos de acción de los principales fármacos inmunosupresores utilizados en la práctica clínica están involucrados en la inhibición de la estimulación antigénica y activación de linfocitos T y B. En la figura 4 se indican los fármacos que van por cada vía:

- Fármacos que inhiben a la calcineurina impidiendo la activación de IL-2.
- Fármacos que impiden la unión de esta IL-2 a su receptor activado.
- Fármacos que impiden la cascada de señales desencadenada por ILs y que desembocan en proliferación celular, implicando la vía mTOR.
- Fármacos que impiden la formación de ADN y ácido ribonucleico (ARN) en linfocitos.

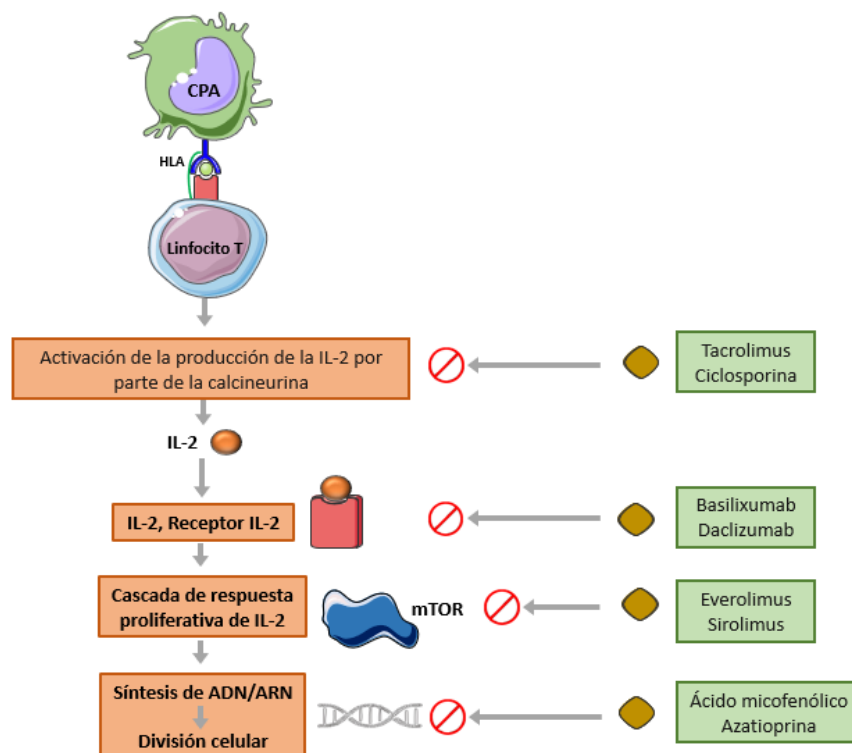


Figura 4. Principales vías de actuación de los fármacos inmunosupresores. Elaboración propia.

A continuación, se explica con más detalle cada una de las vías mencionadas.

### 2.4.1. Vía calcio calcineurina – Inhibidores de la calcineurina

Una vez activados los linfocitos T, se produce la activación de la enzima calcineurina dependiente de calcio y calmodulina. Esto produce la desfosforilación del factor nuclear de células T activadas

(NFAT), un factor transcripcional que cuando se encuentra desfosforilado viaja del citosol al núcleo celular y forma un complejo multiproteico capaz de unirse al ADN nuclear y estimular la expresión de ciertas citoquinas, como la IL-2 y la cadena alfa de su receptor en la superficie celular del linfocito. Es decir, al unirse a una determinada región del ADN es capaz de generar la traducción de las citoquinas codificadas por esos genes (32).

Los fármacos inhibidores de la calcineurina como ciclosporina y TAC actúan en esta vía. Concretamente la ciclosporina se une a la calmodulina, mientras que TAC se une a la proteína *FK Binding-Protein 12* (FKB12) formando un complejo. La unión a estas proteínas genera un cambio conformacional en ambos fármacos favoreciendo su unión con la calcineurina. Al unirse a la calcineurina activada impiden la desfosforilación de NFAT y la expresión de IL-2. TAC es de 10 a 100 veces más potente que la ciclosporina, y el perfil de EEAA varía ligeramente entre ambos.

#### **2.4.2. Vía de bloqueo de la unión de IL-2 a su receptor - Bloqueadores IL-2R (CD25)**

Ante la respuesta a estímulos antigénicos, ciertos receptores de ILs como IL-2R se expresan en la superficie de linfocitos T activados, desencadenando señales de crecimiento. Los anticuerpos monoclonales bloqueadores del receptor de IL-2 son fármacos dirigidos a impedir la unión de la IL-2 a su receptor, mayormente dirigiéndose a la subunidad alfa (o CD25) de este común a varias ILs. Esta subunidad alfa solo aparece en linfocitos activados, permitiendo que estos fármacos sean altamente selectivos. Basiliximab y daclizumab son dos fármacos que actúan por esta vía. Normalmente los anticuerpos monoclonales como los policlonales se utilizan en terapias de inducción o rechazo agudo (33).

#### **2.4.3. Vía mTOR - Inhibidores de la mTOR**

El complejo de *mammalian target of Rifamicin* (mTOR) es una quinasa con diferentes funciones celulares entre ellas la regulación del ciclo celular y su progresión de fase G1 a S. Los fármacos inhibidores del complejo mTOR como sirolimus y EVE actúan en esta vía. Ambos se unen a la proteína FKB12 inhibiendo la acción de mTOR, la supresión de IL-2, 4 y 5 y la inhibición de la proliferación de linfocitos (34).

#### **2.4.4. Vías de síntesis de nucleótidos – Inhibidores de la síntesis de ADN y ARN linfocitarios**

Los linfocitos requieren de la síntesis de purinas y pirimidinas para su replicación. Estas vías están reguladas por la dihidroorato deshidrogenasa y la iosina monofosfato deshidrogenasa. El fármaco azatioprina actúa como un antimetabolito impidiendo la correcta síntesis de ADN en linfocitos. El ácido micofenólico es un inhibidor de la enzima IMPDH, impidiendo la formación de

*novus* de purinas siendo este proceso esencial para los linfocitos al no poder utilizar productos del catabolismo como otros tipos celulares (35).

#### **2.4.5. Corticoesteroides**

Los glucocorticoides son un tipo de corticosteroides, corticoides u hormonas esteroideas con múltiples funciones dentro del organismo. En farmacología se utilizan principalmente por sus acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras. Concretamente se unen al receptor nuclear glucocorticoide expresado en muchas células corporales. Su acción inmunosupresora es potente e inespecífica y se basa en la inhibición de IL-1 inhibiendo la activación de linfocitos T *helper*, IL-6 inhibiendo la activación de linfocitos B, TNF e IFN- $\gamma$ , actuando tanto sobre la respuesta inmunitaria celular como humoral. Además, bloquea la acción de ciertas células de adhesión impidiendo la llegada de neutrófilos al foco. En pacientes con TOS se usa principalmente prednisona, profármaco que es transformado en prednisolona (36).

#### **2.4.6. Otros inmunosupresores**

Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal bloqueador de CD52. En España no se usa para el tratamiento de TOS, ciertos estudios apuntan a su potencial en casos de TOS de riñón, pulmón o páncreas.

Por otro lado, belatacept es una proteína quimérica bloqueadora de la coestimulación de linfocitos T mediada por CD86 impidiendo su activación. Se trata de un fármaco novedoso diseñado por ADN recombinante, que está actualmente autorizado en casos de TOS renal por vía intravenosa en combinación con corticoides y AMF (37).

La figura 5 muestra los mecanismos de acción de los diferentes inmunosupresores mencionados.

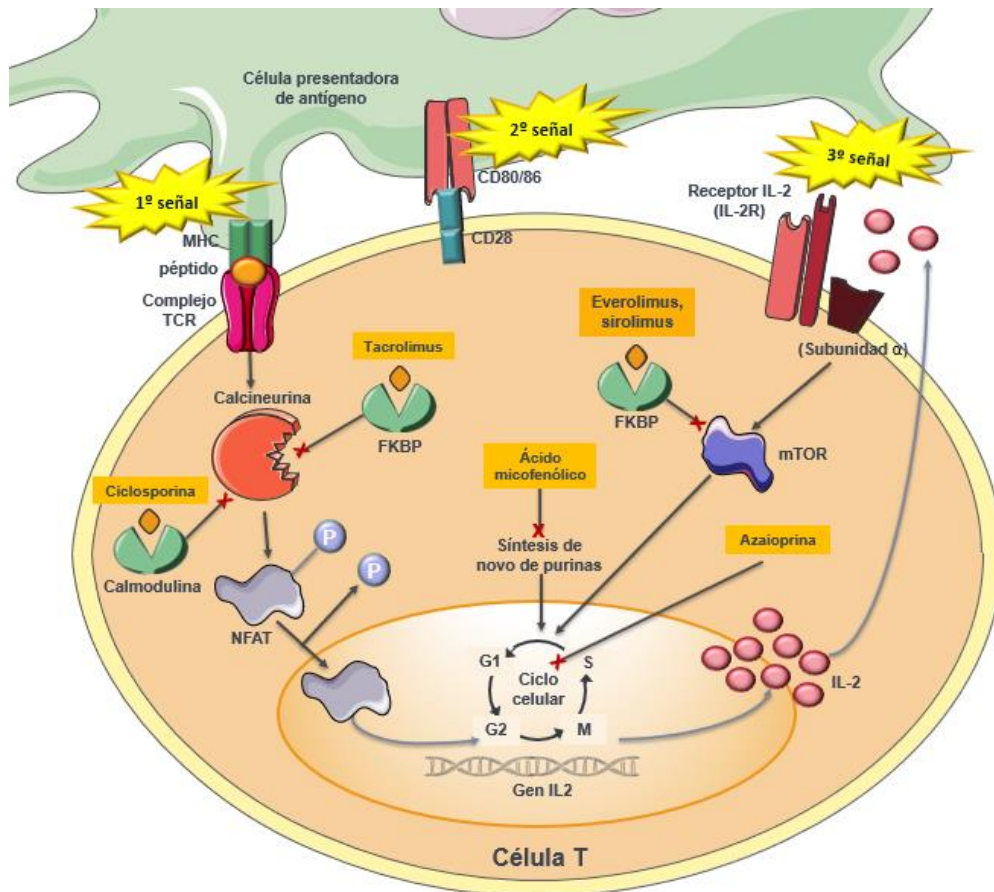


Figura 5. Mecanismos de acción de diferentes tipos de inmunosupresores. Elaboración propia.

## 2.5. PROTOCOLOS DE INMUNOSUPRESIÓN

Todos los tratamientos inmunosupresores están enfocados a evitar el rechazo del injerto. Debe encontrarse el punto de equilibrio entre la acción inmunosupresora suficiente para controlar la alorreactividad del donante, y una dosis terapéutica que produzca los menores EEA posibles. La terapia inmunosupresora es una terapia crónica, de por vida, por ello los EEA asociados a estos fármacos se deben tener en cuenta y ser evaluados regularmente.

Los regímenes de inmunosupresión pueden dividirse en tres según el estadio del trasplante (38):

- Prevención del rechazo en los primeros días post-trasplante: la capacidad de reacción del sistema inmune del receptor es máxima. Suelen utilizarse triple terapia asociando corticoesteroides, inhibidores de la calcineurina (ciclosporina o TAC) y agentes antiproliferativos (AMF); o cuádruple terapia, añadiendo anticuerpos mono o policlonales.

- Prevención del rechazo o mantenimiento a largo plazo: a priori la reactividad es menor y puede disminuirse la dosis inmunosupresora a una dosis de mantenimiento.
- Tratamiento de rescate ante episodios de rechazo agudo: en situaciones agudas, se elevan las dosis del tratamiento de mantenimiento y se administran altas dosis de corticosteroides, y se añaden otros medicamentos como AMF si no estaban en terapia, e incluso anticuerpos anti-linfocitos.

La toxicidad farmacológica asociada sobre todo a las terapias a largo plazo o mantenimiento son un hándicap importante a la hora de escoger el régimen inmunosupresor más adecuado a cada paciente y el tipo de trasplante. Hay que tener en cuenta que la disminución del sistema inmune del paciente no solo permite el mantenimiento del injerto, sino que implica un bloqueo de las defensas del organismo frente a otros tipos de amenazas. Por ello, uno de los riesgos es la aparición de neoplasias e infecciones recurrentes en estos pacientes. Además, suelen asociarse con mayor frecuencia la aparición de diabetes mellitus (DM) post-trasplante (*new onset diabetes after transplantation*, NODAT) e hiperlipidemias, contribuyendo a la aparición de enfermedad cardiovascular que es una de las principales causas de comorbilidad y muerte asociadas a estos pacientes. La aparición de osteoporosis también se asocia sobre todo al uso de corticosteroides. Otros EEAA relacionados con estos últimos son la hiperglucemia, hiperlipidemia, retención hidrosalina y retraso en el crecimiento. Por ello, los corticosteroides tienden a eliminarse tan pronto como sea factible, sobre todo en pacientes pediátricos en desarrollo (39,40).

## **2.6. TACROLIMUS**

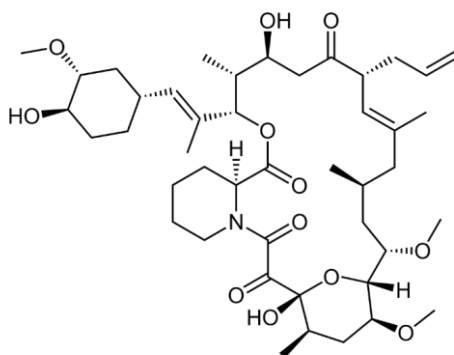
El principio activo TAC está indicado en su forma oral para el tratamiento o profilaxis del rechazo de aloinjerto, mientras que en su forma tópica está indicado en el tratamiento o profilaxis de eccemas asociados a dermatitis atópica resistente a corticoides (41).

Esta tesis se centra en la utilización de TAC como inmunosupresor en el tratamiento de TOS alogénico, concretamente en pacientes receptores de injertos renales, hepáticos, cardíaco, pulmonar y pancreático.

### **2.6.1. Historia del tacrolimus**

TAC fue de los primeros macrólidos inmunosupresores descubiertos, después de sirolimus (rapamicina). Fue hallado en 1984 por un equipo japonés a partir del microorganismo *Streptomyces tsukubaensis* en Tsukuba, Japón (42). Su nombre deriva de

'*Tsukuba macrolide immunosuppressant*'. La figura 6 muestra la estructura macrólido-lactona de TAC.



**Figura 6. Estructura molecular de tacrolimus.**

En 1994 fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) como profilaxis y tratamiento del trasplante hepático, y posteriormente se aprobó también en casos de riñón, corazón, intestino delgado, páncreas, pulmón, tráquea, piel, córnea, médula ósea y miembros.

Se plantea su eficacia y toxicidad con respecto a ciclosporina al ser ambos inhibidores de la calcineurina. Una revisión sistemática reciente concluyó que TAC es superior a ciclosporina en la disminución del número de rechazos agudos, hipertensión, dislipidemia e hiperplasia gingival asociada al uso de estos fármacos. Sin embargo, resultó inferior frente a la aparición de NODAT (43). Un metaanálisis bastante anterior (2006) ya concluía resultados similares comparando ambos fármacos (44).

### **2.6.2. Mecanismo de acción**

Como se ha mencionado anteriormente, TAC es un inhibidor de la calcineurina que actúa formando un complejo tras su unión a la proteína FKBP12. El complejo TAC-FKBP12 se une al sitio activo de la calcineurina en presencia de calmodulina y calcio inhibiendo la transcripción de genes como la IL-2. La diana terapéutica por tanto es el linfocito T (45).

### **2.6.3. Farmacocinética**

TAC es un fármaco con un estrecho margen terapéutico. Por ello, requiere de monitorización de los niveles sanguíneos de forma continuada asegurando que estos se encuentran dentro del rango terapéutico adecuado. Usualmente la monitorización es más frecuente en el periodo a corto plazo post-trasplante, y se amplía en terapia de mantenimiento, llegando a ser cada 6 meses incluso a veces anual. Las recomendaciones de *Kidney disease: improving global outcomes* (KDIGO), una organización global para la implementación de guías de práctica clínica

basadas en la evidencia en la enfermedad renal, recomienda con un nivel de evidencia 1B monitorizar los niveles de TAC, especialmente cuando haya un cambio en la farmacología del paciente que pueda afectar a los niveles sanguíneos, y cuando se notifique un deterioro en la función renal con potencial nefrotoxicidad o riesgo de rechazo (46).

El mejor parámetro para monitorizar TAC es el área bajo la curva (*Area Under the Curve*, AUC), ya que muestra las concentraciones sanguíneas a lo largo del tiempo reflejando la exposición total al fármaco. Debido a que las mediciones del AUC en la práctica clínica no son fáciles de realizar, la monitorización de TAC se lleva a cabo midiendo la concentración valle ( $C_o$ ) de TAC en sangre entera ya que parece tener correlación con el AUC mostrando una buena estimación de la exposición sistémica (47). La  $C_o$  se mide justo antes de la toma del fármaco, correspondiendo a 12h tras la toma anterior en caso de formulaciones de liberación inmediata, o 24h en el caso de liberación prolongada. Existen varias técnicas para la medición de  $C_o$  de TAC en sangre, como el ensayo de inmunoenzimología semiautomatizado por micropartículas (MEIA), habitualmente usado en la práctica clínica (48). En rangos de 1,5 mg a 10 mg (equivalente a dosis de hasta  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) TAC ha demostrado seguir una farmacocinética lineal (45).

#### **2.6.3.1. Absorción**

TAC se utiliza por vía oral para el tratamiento inmunosupresor en el TOS, aunque existen formulaciones tópicas para otras patologías. Es una molécula lipófila y su absorción intestinal es rápida pero limitada y variable, produciéndose mayormente en duodeno y yeyuno y en menor medida en íleon o colon (49). Su biodisponibilidad varía entre un 17-25%. Debe tomarse en ayunas ya que los alimentos interfieren en su absorción. Así mismo debe tomarse por la mañana ya que se han observado variaciones en el AUC (-35%) en comparación con la toma a mitad de tarde. La bilis, a diferencia de la ciclosporina, no influye en su absorción. El pico de concentración máxima se alcanza en 1h tras la toma (45).

La glicoproteína-p (gp-p) es una proteína transmembrana dependiente de ATP localizada en el epitelio intestinal que limita el paso de ciertos fármacos y xenobióticos como TAC devolviéndolos de nuevo al lumen para ser eliminados, metabolizados o nuevamente absorbidos. Por lo tanto, la gp-p condiciona la biodisponibilidad de TAC dado que interfiere directamente en su absorción intestinal (50).



### **2.6.3.2. Distribución**

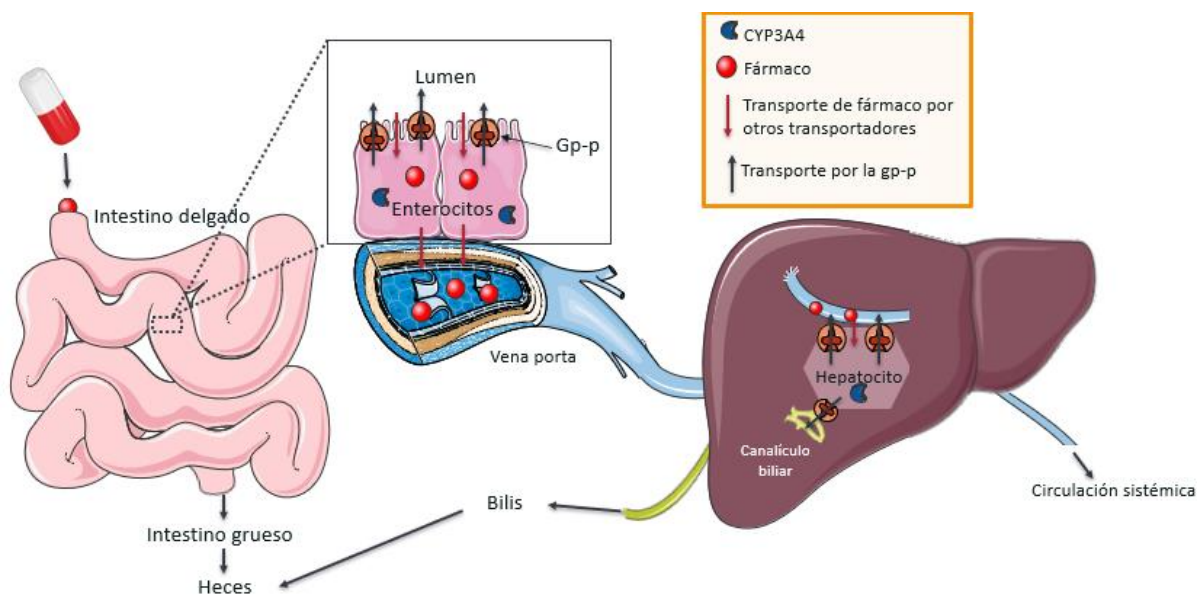
TAC se une altamente a los eritrocitos sanguíneos (>98,8%). En el plasma se une en >98% a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina y a la glicoproteína ácida alfa-1. Aunque usualmente se utilizan los niveles de TAC en sangre para determinar su efecto, es la fracción libre en plasma la que es realmente activa. Partiendo de esto, los niveles de hematocrito y proteínas plasmáticas afectan a la disponibilidad del fármaco.

TAC se distribuye ampliamente en tejidos donde puede acumularse, atraviesa la placenta y aparece en la leche materna. Dado que la gp-p se encuentra además de en intestino en otros órganos como riñón e hígado, también condicionará el paso de TAC a través de estos. Así mismo, los linfocitos, diana terapéutica de TAC, expresan la gp-p en su membrana, siendo un factor determinante de la concentración final de TAC intracelular (50).

### **2.6.3.3. Metabolismo**

El metabolismo de TAC es producido a través del citocromo hepático P40 (CYP450). Este citocromo pertenece a una superfamilia de enzimas tipo oxigenasas, con más de 57 isoformas. La mayoría de los fármacos se metabolizan por la subfamilia CYP3A. Concretamente TAC se metaboliza por el citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en ~60% y el citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en ~40% a través de desmetilación e hidroxilación (51). Se han caracterizado hasta el momento >20 metabolitos de TAC en modelos *in vitro*, de los que sólo uno mostró una actividad inmunosupresora significativa.

Los citocromos mencionados se encuentran principalmente a nivel hepático, pero también a nivel intestinal y renal determinando cierto metabolismo del fármaco a estos niveles. La presencia de gp-p a nivel intestinal (eritrocitos) y hepático produce la expulsión del fármaco, y en cierta medida una recirculación y mayor metabolización por parte del CYP3A (figura 7).



**Figura 7. Combinación de los efectos de la gp-p y CYP3A4 sobre el fármacos metabolizados y transportados por estas vías. Elaboración propia.**

#### 2.6.3.4. Excreción

La semivida de eliminación del fármaco es de 12-20 horas. La mayor parte se elimina por heces (>95%), siendo eliminada por la orina menos del 1% del fármaco intacto. Los pacientes pediátricos tienen un aclaramiento acelerado respecto a los adultos, necesitando mayores dosis. En caso de insuficiencia renal no es necesario ajustar la dosis de fármaco, pero si se recomienda vigilar la función renal debido a su nefrotoxicidad (45).

#### 2.6.4. Interacciones farmacológicas: Inhibidores, inductores y sustratos

Determinados fármacos que sean inductores, inhibidores o sustratos del CYP3A o la gp-p pueden interactuar con TAC. Normalmente los fenómenos de inhibición enzimática aparecen rápidamente, mientras que la inducción tarda unas 1-2 semanas en producirse. Existe una alta cantidad de fármacos que se metabolizan por vía de la subfamilia CYP3A, por lo que el potencial de interacciones medicamentosas es alto. Los fármacos con potencial de interactuar con TAC a través de las vías mencionadas se muestran en la Tabla 2:

**Tabla 2. Principales fármacos inhibidores, inductores y sustratos del CYP3A4 y gp-p.**

	<b>CYP3A4</b>	<b>Gp-p</b>
<b>Inhibidores</b>	Antivirales, antifúngicos. Inhibidores de la bomba de protones (omeprazol), antibióticos (Claritromicina, ciprofloxacino), amiodarona, ciclosporina, ácido valproico, ticagretol.	Inhibidores de la bomba de protones (omeprazol), anticonceptivos orales, verapamilo, carvedilol, diltiazem, haloperidol, nifedipino, simvastatina, ritonavir.
<b>Inductores</b>	Antiepilépticos (Fenotoína, fenobarbital, ox/carbamacepina, topiramato), glucocorticoides, Rifampicina, efavirenz, pioglitazona, hipérico.	Clorpromazina, ox/carbamazepina, fenobarbital, fenotoína, amiodarona, colchicina, ciclosporina, glucocorticoides, diltiazem, eritromicina, morfina.
<b>Sustratos</b>	Inmunosupresores, estatinas, ergotamina, psicótropos (benzodiazepinas, haloperidol, quetiapina), antidepresivos (sertralina, mirtazapina), antiepilépticos, estrógenos, antihistamínicos, eritromicina, ciclofosfamida, ketoconazol, amitriptilina, fentanilo, verapamilo.	Quimioterápicos, inhibidores mTOR, inhibidores calcineurina, glucocorticoides, metotrexato, antibióticos.

Información obtenida de (52).

Los inhibidores de la bomba de protones (IBP) son fármacos que actúan inhibiendo la producción ácida por las células parietales del estómago. Son fármacos ampliamente utilizados y es usual que formen parte de la farmacología concomitante del paciente inmunodeprimido. Ciertos estudios han demostrado que los IBP son sustratos del CYP3A4 y la gp-p, incluso algunos han demostrado su potencial efecto inhibidor, como en el caso de omeprazol (53). Una revisión reciente enfocada a los predictores de la variabilidad farmacocinéticos de TAC mostró que el uso concomitante de omeprazol, lansoprazol o esomeprazol puede incrementar más de 2-3 veces las concentraciones sanguíneas de TAC, recomendando rabeprazol como una alternativa más segura (54). En este sentido, parece ser que rabeprazol tiene un metabolismo alternativo y no interacciona de la misma manera con los fármacos metabolizados y transportados por estas vías (55).

## **2.6.5. Efectos adversos**

### **2.6.5.1. Nefrotoxicidad**

Uno de los principales EEAAs claramente establecido de TAC es la nefrotoxicidad, debido entre otros al efecto inhibitorio de la calcineurina, proteína que regula los canales de calcio celulares. La nefrotoxicidad aguda es dosis dependiente y reversible y afecta principalmente a vasos y túbulos generando vasoconstricción arteriolar, disminución del flujo y del filtrado glomerular. La nefrotoxicidad crónica se debe al mantenimiento de la vasoconstricción y diferentes mecanismos que generan lesiones estructurales (56).

La nefrotoxicidad es evidenciada principalmente como insuficiencia renal asociada detectada por el aumento de creatinina y la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG). Concretamente, se considera insuficiencia renal en  $TFG < 60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$ . Entre el 40 y 80% de los casos de insuficiencia renal en TOS no renal se asocian a la toma de inmunosupresores, especialmente anticalcineurínicos. En pacientes que tras reajuste de dosis no se normalizan los niveles de creatinina, se recomienda el cambio de tratamiento. Así mismo, puede producir desajustes en otros electrolitos como potasio, sodio, calcio y magnesio. Hay que tener especial cuidado con el uso concomitante de antiinflamatorios no esteroideos y antimicrobianos por su potencial nefrotóxico, monitorizando la función renal en caso de que se incluyan (57).

### **2.6.5.2. Hiperglucemia y efectos cardiovasculares**

El desarrollo de hiperglucemia o NODAT es mayor en pacientes con trasplante hepático (>30%) que renales (20%). Suele iniciarse a los dos meses post-trasplante siendo reversible hasta en un 50% de los casos tras dos años. Niveles elevados en sangre de TAC predisponen a una mayor hiperglucemia. El paciente tipo para desarrollar NODAT es aquel que ya cuenta con un perfil de insulinoresistencia: >45 años, sobrepeso/obesidad central, hiperglucemia, dislipidemias, o síndrome metabólico). Los anticalcineurínicos disminuyen la secreción de insulina, aumentando aún más la glucemia y ejerciendo un efecto tóxico sobre las células beta del páncreas. Los glucocorticoides que usualmente están asociados a la farmacoterapia empeoran la resistencia a la insulina, produciendo un mayor efecto diabetogénico. Varios estudios han demostrado que NODAT es un factor de riesgo de mortalidad independiente, mientras que no se relaciona con la pérdida del injerto (58,59). Concretamente, la presencia de NODAT duplica el riesgo de eventos cardiovasculares aumentando sustancialmente la morbimortalidad asociada (58).

Niveles elevados de anticalcineurínicos en sangre también se han asociado a la presencia de hiperlipidemia (48). Es habitual que los primeros meses post-trasplante se alteren marcadores de colesterol total, colesterol LDL (LDL-c) y apolipoproteína-B. El mecanismo implicado parece

ser el bloqueo de 25-hidroxilasa en la síntesis de ácidos biliares y la lipoprotein-lipasa, aumentando los niveles de LCL-c y triglicéridos respectivamente. Así mismo, parece que los pacientes trasplantados renales tienen una menor capacidad antioxidante viéndose alterada la oxidación de lipoproteínas y la inducción de aterosclerosis (60). Sin embargo, se ha demostrado que TAC tiene menor efecto sobre el metabolismo lipídico que ciclosporina. Las estatinas son el fármaco de elección para tratar esta patología.

Por otro lado, la hipertensión arterial también es una de las complicaciones más frecuentes después del TOS, con una incidencia a los 10 años del 98% en trasplantados cardiacos, 67-90% renales y >50% hepáticos (61). Los mecanismos asociados a la aparición de HTA con anticalcineurínicos son el incremento de la síntesis de endotelina, disminución de óxido nítrico y retención de sodio. Por otro lado, el tratamiento concomitante con corticoides agrava la HTA debido a una reabsorción de sodio y estimulación mineralocorticoide. A pesar de su prevalencia en pacientes con TOS, existen muchos factores de riesgo modificables sobre los que se puede actuar (obesidad, tabaquismo, alcohol, consumo de sodio). El tratamiento farmacológico de primera elección suele ser amlodipino (bloqueador de los canales de calcio), por su potencial vasodilatador que contrarresta la vasoconstricción mediada por anticalcineurínicos. Se aconseja evitar el grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (enalapril y similares), y antagonistas del receptor de angiotensina II (losartan y similares) por su efecto sobre el sistema nefrourinario (62).

### **2.6.5.3. Tumores e infecciones**

Por otro lado, la aparición de neoplasias e infecciones recurrentes es uno de los problemas asociados a la inmunosupresión per se. Los pacientes inmunodeprimidos tienen un riesgo neoplásico de 2,7 a 13,7 veces mayor al de la población general, pero también el riesgo es superior al de los pacientes que están esperando el trasplante (no inmunodeprimidos). Por todo ello, el cáncer es en la actualidad uno de los mayores limitantes de la expectativa y calidad de vida del paciente portador de TOS (63).

Así mismo, ciertas infecciones son relativamente frecuentes y conllevan a la toma de una pauta antibiótica preventiva (64). Cabe diferenciar entre infecciones precoces, de origen nosocomial relacionadas con causas quirúrgicas (heridas, catéteres, etc), y normalmente causadas por bacterias (Gram+: *Staphylococcus* y *Enterococcus*, Gram-: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) y hongos (*Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*); e infecciones tardías causadas por microorganismos oportunistas en los momentos de máxima inmunosupresión, siendo más duraderas y complicadas. Dentro de las infecciones más típicas se encuentran:

- Infección por *Pneumocystis jirovecii*: uno de los principales microorganismos causante de infecciones pulmonares durante los primeros meses post-trasplante. El tratamiento consta de la toma de trimetoprim/sulfametoxazol 400/80 mg cada 24h de 3 a 6 meses en función de la respuesta.
- Citomegalovirus: una de las principales infecciones víricas en el trasplantado. El tratamiento incluye vanciclovir 900 mg cada 24h máximo 6 meses.
- *Aspergillus*: una de las principales infecciones fúngicas en trasplantados, causando principalmente cuadros de pulmonía sobre todo durante los primeros meses post-trasplante. El tratamiento alternativo a voriconazol consiste en anfotericina B liposomal inhalada 25mg semanal o quincenal.

Hay que tener en cuenta estos episodios de infección o prevención dado que muchos fármacos, sobre todo de tipo antifúngicos, interaccionan con la terapia inmunosupresora. Además, la nefrotoxicidad puede aumentar al usarse concomitantemente fármacos como aminoglucósidos o anfotericina B.

#### **2.6.5.4. Efectos gastrointestinales y otros**

A nivel gastrointestinal, niveles altos de TAC se relacionan con diarrea (40-70%), dolor abdominal (30-50%), transaminasas elevadas (35%), náuseas (30%) y vómitos (20%). Concretamente la diarrea se presenta en un 24% de los pacientes a 3 años post-trasplante. El origen de esta puede ser infeccioso como no infeccioso, estando TAC involucrado en este último a través de un mecanismo de toxicidad intestinal, pudiendo causar una colitis eosinofílica. La diarrea genera deshidratación, y así mismo se ha descrito que disminuye la expresión de la gp-p a nivel intestinal, generando una mayor absorción de fármaco y mayor biodisponibilidad (65).

Los síntomas neurotóxicos también son frecuentes en TAC, presentando alrededor de un 50% de los pacientes algún síntoma relacionado entre los que se incluyen cefaleas, insomnio, temblor, parestesias o mareos. Otros EEAA descritos incluyen astenia, dolores musculares o reacciones dermatológicas.

La Tabla 3 resume los principales EEAA de los anticalcineurínicos.

**Tabla 3. Resumen de los efectos adversos de los anticalcineurínicos.**

<b>Renales</b>	Nefrotoxicidad aguda y crónica, hipertensión**, síndrome hemolítico urémico, hiperpotasemia*, hipomagnesemia*, acidosis metabólica.
<b>Digestivos</b>	Hepatotoxicidad, colestasis, ictericia, pancreatitis, coledocistitis, diarrea*, vómitos*, náuseas, dispepsias*
<b>Neurológicos*</b>	Temblores*, parestesias, convulsiones, mareos, cefaleas, enteropatías
<b>Metabólicas</b>	Hiperglucemia* y diabetes*, hiperuricemia**, gota**, hipercolesterolemia**, osteoporosis
<b>Dermatológicas** (apenas con tacrolimus)</b>	Hipertricosis, hirsutismo, hiperplasia gingival**
<b>Neoplasias</b>	Linfomas, carcinomas, sarcoma de Kaposi
<b>Infecciones</b>	Víricas (citomegalovirus), bacterianas, fúngicas, parasitarias
<b>Hematológicas</b>	Trombocitopenia
<b>Musculoesqueléticas</b>	Artralgias, distrofia refleja, rabdomiólisis

\*Mayor frecuencia con tacrolimus, \*\*mayor frecuencia con ciclosporina

Datos obtenidos de (66).

### **2.6.6. Indicaciones y posología**

Existen diferentes formas comerciales para la administración oral de TAC, predominando en España las siguientes presentaciones:

- Cápsulas de liberación inmediata: Prograf® 0,5 mg, 1 mg y 5 mg. Dos veces al día.
- Cápsulas de liberación prolongada: Advagraf® 0,5 mg, 1 mg, 3 mg y 5 mg. Una vez al día; Envarsus® 0,75 mg, 1 mg, 4 mg. Una vez al día.
- Granulado para suspensión oral: Modigraf® 0,2 mg y 1 mg. Dos veces al día.

En caso de sustitución de una marca comercial por otra, la equivalencia de Prograf®, Modigraf® y Advagraf® es 1:1 (mg:mg) mientras que para Envarsus® es 1:07 por su mayor biodisponibilidad, siendo necesaria un 30% menos de dosis (67).

La dosis dependerá principalmente del peso, del tiempo post-trasplante, tipo de trasplante y características fisiológicas y fisiopatológicas del paciente, así como el riesgo inmunológico asociado al rechazo. En términos generales las dosis iniciales recomendadas son superiores para la profilaxis de rechazo del injerto renal frente al hepático, y estas superiores que el cardiaco y pulmonar. Concretamente, las dosis de inicio diarias recomendadas según tipo de TOS y basadas en el peso son (45):

- Renal: 0,20-0,30 mg·kg<sup>-1</sup>. Para pacientes pediátricos: 0,30 mg·kg<sup>-1</sup>.
- Hepático: 0,10-0,20 mg·kg<sup>-1</sup>. Para pacientes pediátricos: 0,30 mg·kg<sup>-1</sup>.
- Cardíaco: tras inducción con anticuerpos, 0,075 mg·kg<sup>-1</sup>. Para pacientes pediátricos: tras inducción con anticuerpos, 0,10-0,30 mg·kg<sup>-1</sup>.
- Pulmón: 0,10-0,15 mg·kg<sup>-1</sup>.
- Páncreas: 0,2 mg·kg<sup>-1</sup>.

Los niveles en sangre objetivo son mayores en el corto periodo post-trasplante, y normalmente se sitúan entre 4-8 ng·ml<sup>-1</sup> en la terapia de mantenimiento (>12 meses), aunque pueden ser menores si se pauta TAC concomitantemente con un inhibidor de la mTOR.

A modo de ejemplo en la Tabla 4 se muestra un esquema del manejo de la inmunosupresión en trasplante renal dependiente del tiempo y del riesgo inmunológico (38).

**Tabla4 . Esquema de manejo de la inmunosupresión a corto y largo plazo en el trasplante renal.**

	Fármaco	Inicio	0-3 meses	4-12 meses	posteriormente		
<b>Bajo riesgo inmunológico</b>	Tacrolimus-AMF	Tacrolimus (ng·ml <sup>-1</sup> )	0,10-0,15 mg·kg <sup>-1</sup> (D0)	8-12 ng·ml <sup>-1</sup>	5-10 ng·ml <sup>-1</sup>	4-8 ng·ml <sup>-1</sup>	
		AMF	2 gr (D0)	1 gr·12h <sup>-1</sup>	0,5·12h <sup>-1</sup>	0,5·12h <sup>-1</sup>	
		Prednisona	125 mg (D1)	10 mg	5 mg	5mg /FIN	
		Tacrolimus-inhibidores	Tacrolimus (ng·ml <sup>-1</sup> )	0,10-0,15 mg·kg <sup>-1</sup> (D0)	5-10 ng·ml <sup>-1</sup>	4-8 ng·ml <sup>-1</sup>	3-6 ng·ml <sup>-1</sup>
		mTOR	Everolimus	1,5 mg·12h <sup>-1</sup> (D1)	3-8 ng·ml <sup>-1</sup>	3-8 ng·ml <sup>-1</sup>	3-8 ng·ml <sup>-1</sup>
			Prednisona	125 mg (D1)	10 mg	5 mg	5mg /FIN
<b>Si se requiere minimizar precozmente tacrolimus</b>	Añadir inducción con basiliximab 20 mg (D0 y D4) o bien dosis muy reducida de timoglobulina (1-2 dosis de 1mg·kg <sup>-1</sup> ).						
<b>Alto riesgo inmunológico</b>	Añadir inducción con timoglobulina (1,5 mg·kg <sup>-1</sup> durante 7 días).						



### **3. EVEROLIMUS EN EL COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA**

#### **3.1. INTRODUCCIÓN, PREVALENCIA Y PRONÓSTICO**

CET o síndrome de Bourneville, es una enfermedad rara de origen genético y hereditaria caracterizada por la presencia de trastornos neurocutáneos, como la triada de Vogt: discapacidad intelectual, convulsiones y lesiones cutáneas. Fue descrito por primera vez en 1880 por Bourneville (68).

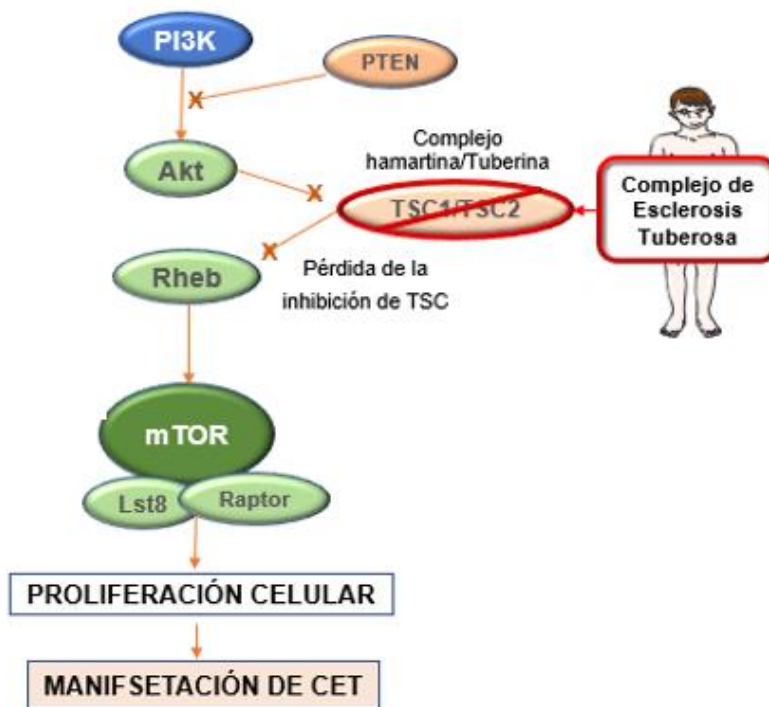
Se calcula que aproximadamente 1 de cada 6000 niños nacidos vivos poseen CET, a pesar de su diagnóstico subestimado debido a que los casos muy leves de la enfermedad pasan desapercibidos. Se calcula una incidencia de menos de 1 caso por 100.000 personas/año. En el mundo 1-2 millones de personas aproximadamente padecen CET, de los cuales unas 4.000 personas viven en España (69).

#### **3.2. MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD**

CET es una enfermedad rara de origen genético ligada a la mutación de dos genes, el *TSC1* y el *TSC2*. Solo es necesaria la mutación en uno de estos genes para que aparezca la enfermedad. Afecta tanto a diferentes etnias y edades como a ambos sexos. A pesar de su herencia dominante, en dos tercios de los casos esta enfermedad se da por mutación espontánea (10-15% en el gen *TSC1* y 75-80% en *TSC2*) (70).

El gen Tuberous Sclerosis Complex (*TSC*) 1 se encuentra en el cromosoma 9 y codifica la proteína hamartina, mientras que el gen *TSC2* se encuentra en el cromosoma 16 y codifica la proteína llamada tuberina. Estas dos proteínas forman un complejo que actúa en la cascada de señalización celular Akt, regulando la acción de la kinasa mTOR a través de la proteína Rheb y actuando como supresores de tumor. La mTOR es una proteína encargada de la proliferación, angiogénesis, metabolismo y muerte celular, regulando la activación/inhibición de la síntesis proteica, por lo que su falta de regulación provoca un crecimiento celular descontrolado. La aparición de una segunda mutación alélica de uno o de ambos genes produce una deficiencia mucho más marcada del complejo hamartina-tuberina, provocando una hiperactivación de la mTOR y consecuentemente la aparición de lesiones tumorales, así como manifestaciones de displasia cerebral. También se ha visto que el complejo formado por estas dos proteínas está altamente involucrado en el desarrollo del cortex cerebral del embrión y el control del crecimiento neural, provocando las alteraciones neurológicas del CET (68).

La figura 8 resume el mecanismo molecular implicado en la enfermedad.



**Figura 8. Mecanismo molecular implicado en la aparición del complejo de esclerosis tuberosa.**

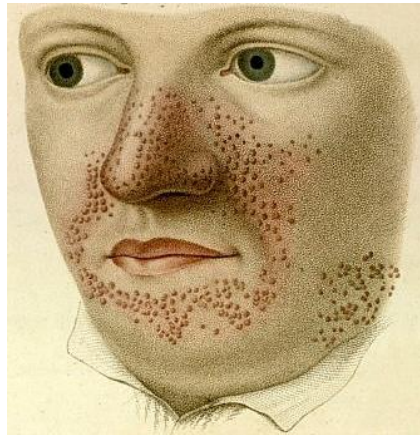
Elaboración propia.

PI3K: fosfatidyinositol3-quiinasa; PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; Rheb: Homologo de Ras enriquecido en el cerebro; mTOR: mammalian target of rapamycin; Lst8: subunidad del complejo de rapamicina SEC13 proteína 8; Raptor: proteína reguladora asociada a mTOR.

### 3.3. SIGNOS Y SÍNTOMAS ASOCIADOS

La clínica de la enfermedad puede aparecer en cualquier momento, desde el nacimiento hasta la edad adulta. Se engloba dentro del grupo de enfermedades neurocutáneas, siendo caracterizado por hamartomas multisistémicos, los cuales son tumores benignos formados por una mezcla anormal de células y tejido. Estos afectan sobre todo a piel, cerebro, riñones, pulmones, ojos y corazón. Presenta una penetrancia cercana al 100%, y una expresividad muy variable dando lugar a manifestaciones clínicas diversas, desde aquellas casi inapreciables con solo implicación de la dermis, a aquellas en que se compromete la vida del paciente. La clínica se hace más evidente conforme avanza la edad del paciente debido a la aparición de nuevas lesiones. Entre la sintomatología típica del CET se encuentran (71).

- Alteraciones cutáneas: presentes en prácticamente todos los individuos. Máculas hipocrómicas, placas fibrosas cefálicas, angiofibromas faciales (pequeños bultos rojos formados por vasos sanguíneos y tejido fibroso. Figura 9), piel de zapa (tumores de tejido conectivo) y fibromas ungueales, entre otros.

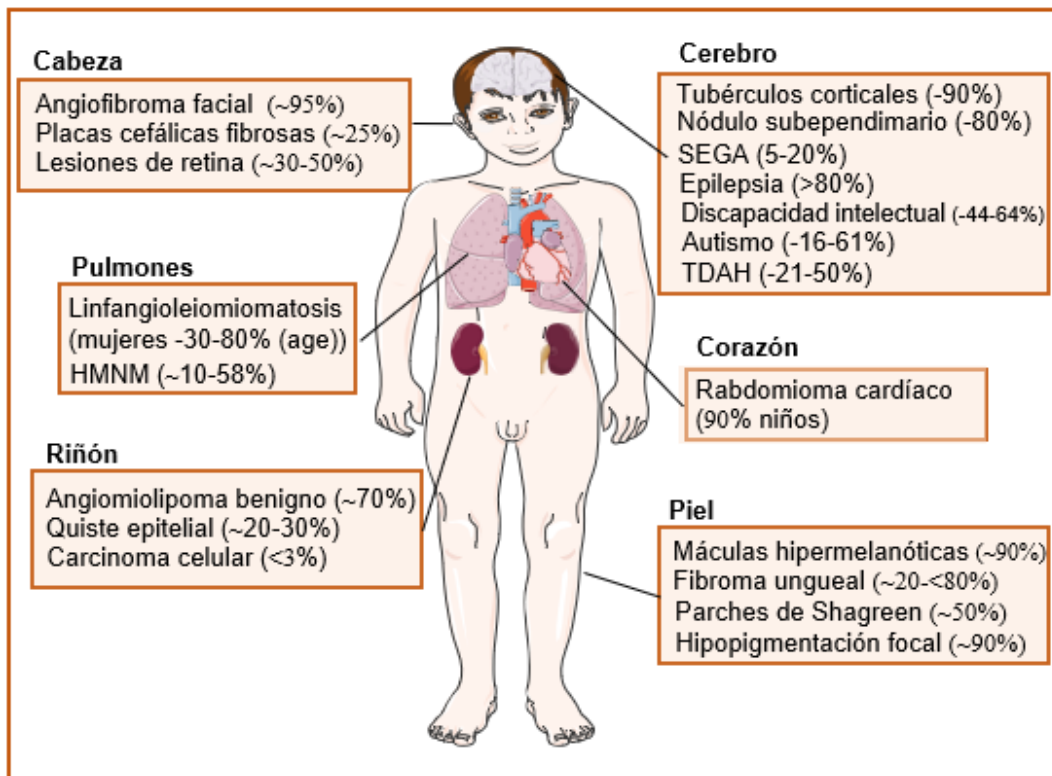


**Figura 9. Angiofibromas faciales asociados al complejo de esclerosis tuberosa**

Figura obtenida de (72).

- Trastornos neurológicos: presentes hasta en el 90% de los individuos. Las principales son epilepsias, discapacidad intelectual y alteraciones de conducta. El 70-90% de los pacientes sufre de epilepsia frecuentemente refractaria y de difícil tratamiento. Especialmente importantes son astrocitoma subependimario de células gigantes (SEGA), unos tumores benignos que se desarrollan en los ventrículos cerebrales. Además, túberes corticales, nódulos subependimarios y quistes aracnoideos.
- Lesiones renales: principal causa de mortalidad. El angiomiolipoma renal (RAML), un tipo de tumor benigno, se presenta en el 80% de los pacientes. Además, presentan principalmente quistes y carcinoma de células renales.
- Lesiones cardiacas: Principalmente rabdomiomas (tumor benigno), y lesiones lipomatosas.
- Lesiones pulmonares: lifangioleiomiomatosis y tumores de células claras.
- Lesiones oculares: hamartomas y manchas acrómicas retinianas.
- Otros: lesiones dentales y quistes óseos.

En la figura 10 se resume el cuadro de síntomas asociados.



**Figura 10. Manifestaciones clínicas del complejo de esclerosis tuberosa.** Elaboración propia, adaptada de (71). SEGA: astrocitomas subependimarios de células gigantes; TDAH: Trastorno de déficit de atención e hiperactividad; HMNM= Hiperplasia micronodular neumocitaria multifocal.

La epilepsia es uno de los síntomas más comunes y de aparición usualmente temprana. La aparición de convulsiones tempranas y refractarias, y más concretamente espasmos en edad pediátrica, están asociados con un peor pronóstico neurológico. El control temprano de estas crisis parece prevenir un mayor deterioro neurológico producido por la epilepsia. Estas crisis son causadas por tumores corticales epileptogénicos que pueden llegar a provocar hasta 40 crisis diarias (73).

La supervivencia de los pacientes depende de la gravedad de las manifestaciones neurológicas y así mismo al desarrollo de otras manifestaciones graves como insuficiencia renal crónica por la aparición de neoplasias malignas o sustitución del tejido parenquimatoso por hamartomas.

### 3.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de CET se basa en una exploración física y clínica con criterios fijados a nivel internacional, con última actualización en 2012 (74). Los criterios de diagnóstico se encuentran reflejados en la Tabla 5, teniendo en cuenta que un diagnóstico definitivo se basa en la existencia de dos criterios mayores/un criterio mayor más dos menores, y un posible diagnóstico en la existencia de un criterio mayor/dos o más criterios menores (74).

**Tabla 5. Criterios de diagnóstico del complejo de esclerosis tuberosa.**

Criterios Mayores	Criterios Menores
1) Máculas hipocrómicas (3 o más, de al menos 5 mm de diámetro)	1) Lesiones cutáneas hipomelanóticas en “confetti” (<5mm)
2) Angiofibromas faciales (3 o más) o placa fibrosa cefálica	2) Hoyuelos múltiples en esmalte dentario (3 o más)
3) Fibromas ungueales (2 o más)	3) Fibromas intraorales (2 o más)
4) Placa chagrín	4) Placa acrómica en retina
5) Hamatomas retinianos múltiples	5) Quistes renales múltiples
6) Displasias corticales	6) Hamartoma no renal
7) Nódulos subependimarios	
8) Astrocitoma subependimario de células gigantes	
9) Rabdomioma cardíaco	
10) Linfangioleiomiomatosis	
11) Angiomiolipomas (2 o más)	

Información obtenida de (74).

Además, se puede realizar el diagnóstico genético para la confirmación, detectando mutaciones patogénicas en los genes *TSC1* o *TSC2*, siendo el segundo cuatro veces más mutagénico que el primero (>410 frente a >1130 variantes alélicas descritas). Precisamente los fenotipos asociados a mutaciones en el gen *TSC2* son más severos que los asociados al *TSC1*, encontrándose mayor riesgo de autismo, coeficiente intelectual bajo o epilepsia refractaria entre otros. Esta detección es posible en el 85% de los casos ya que el 15% restante puede deberse a un mosaicismo genético (coexistencia en un mismo individuo de dos o más poblaciones celulares con distinto genotipo). El estudio genético es costoso debido al gran número y dispersión de las mutaciones de estos genes, sin embargo, las técnicas de *Next Generation Sequencing* han permitido agilizar el proceso. La no detección de mutación genética en individuos con CET diagnosticado suele asociarse a manifestaciones más leves de la enfermedad, sobre todo a nivel del sistema nervioso central. Complementariamente puede hacerse uso de técnicas de neuroimagen corporal como resonancia magnética, tomografía computarizada o ecografías (70).

### 3.5. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO Y NO FARMACOLÓGICO

CET es una enfermedad crónica que no posee cura hasta el momento, aunque los inhibidores de la mTOR parecen tener un efecto modificador de la enfermedad. El tratamiento se basa en paliar la sintomatología asociada: antiepilépticos para las crisis convulsivas, antidepresivos/ansiolíticos/antipsicóticos para los síntomas psiquiátricos, terapia hormonal, dermoabrasión con rayos láser o dermoabrasión para las lesiones cutáneas (angiofibromas) o ungueales, o programas de terapia ocupacional entre otros. En los casos necesarios, se puede recurrir a cirugía para extirpación de tumores (75).

Entre los fármacos epilépticos más utilizados se encuentran los clásicos de primera generación como fenobarbital o fenitoína; los clásicos de segunda generación como carbamacepina, ácido valproico y las benzodiazepinas; los nuevos antiepilépticos como gabapentina, pregabalina, lamotrigina, vigavitrina, oxcarbacepina, topiramato, levetiracetam y zonisamida; y otros fármacos con potencial antiepiléptico como, corticoides o la corticotropina (hormona adenocorticotropa). Normalmente la administración es vía oral, salvo las benzodiazepinas en algunos casos de crisis que pueden administrarse vía rectal.

El tratamiento de primera línea para las convulsiones infantiles es la monoterapia con vigabitrina, un inhibidor selectivo e irreversible de GABA. En segunda línea entran los antiepilépticos clásicos. La asociación de fármacos solo se lleva a cabo en casos resistentes a monoterapia (76).

Existe evidencia que apoya el uso de potenciadores de la acción inhibitoria de GABA, como oxcarbacepina y topiramato, son efectivos para tratar las convulsiones de inicio focal (76). Sin embargo, las convulsiones y epilepsia generalizadas suelen ser resistentes a los antiepilépticos clásicos siendo un reto farmacológico, ya que se trata de unas de las manifestaciones más prevalentes en CET (73). Además el tratamiento con antiepilépticos puede agravar las alteraciones de conducta propias de la enfermedad. Solo los casos de crisis fármaco resistentes o que afecta a la calidad de vida y desarrollo neurológico el paciente son tratados con cirugía para la extirpación del tumor epiloatógónico. Entre el 60 y 100% de los pacientes mejora tras la cirugía. En casos pediátricos incompatibles con cirugía, o cuando esta no ha disminuido la incidencia de las crisis, se pauta una dieta cetogénica, la cual tiene un alto contenido en grasas, suponiendo hasta el 90% de las calorías ingeridas diarias, y muy limitada en hidratos de carbono. Esta dieta puede disminuir las crisis entre un 40 y 50%, obteniéndose los mejores resultados en espasmos epilépticos y en epilepsias focales o multifocales (77).

En los últimos años se ha introducido el uso de inhibidores de la mTOR debido a que el descontrol de la regulación de esta proteína está implicado en la aparición de la enfermedad. En este grupo de fármacos se encuentra EVE, que fue aprobado para su uso en el tratamiento de RAML (78),

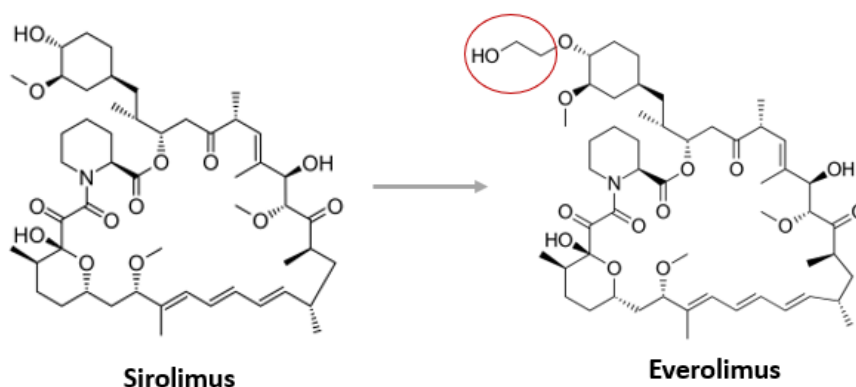
astrocitoma supendimario de células gigantes (79), y cierto tipo de epilepsia, además de mostrarse útil para otros signos de la enfermedad como la linfangioleiomiomatosis, los angiofibromas faciales o los rabdomiomas cardíacos (79).

### 3.6. EVEROLIMUS

A pesar de poseer varias indicaciones terapéuticas, esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de EVE en el tratamiento de CET.

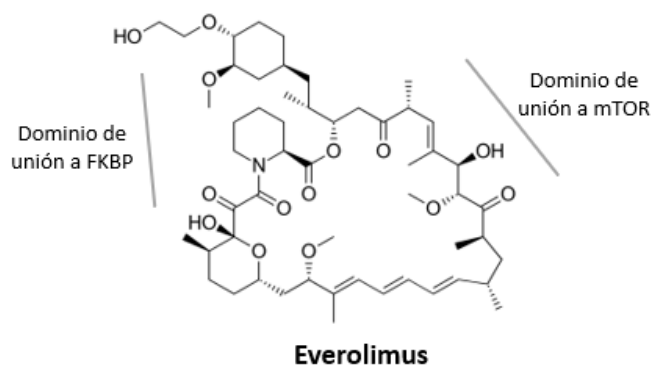
#### 3.6.1. Historia del everolimus

EVE es un fármaco derivado de la rapamicina o sirolimus, concretamente se trata de 40-O-(2-hidroxiethyl)-sirolimus (figura 11). Sirolimus es estructuralmente una lactona macrocíclica aislada de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* encontrada en Rapa Nui (Isla de Pascua), de ahí su nombre.



**Figura 11. Estructura de EVE y su modificación molecular frente a sirolimus.** Elaboración propia.

Comparado farmacocinéticamente con sirolimus, EVE ha demostrado tener mayor biodisponibilidad y una vida media más corta. Además, la adición de la cadena hidroxetilo parece modificar la distribución celular y tisular, la interacción con proteínas transportadoras y enzimas metabolizadoras, así como otorgarle una mayor potencia en su interacción con mTOR (figura 12) (80).



**Figura12. Dominios de unión a FKBP y mTOR de everolimus.** Elaboración propia.

EVE ha sido aprobado para su uso en distintas patologías. En 2009 a través del estudio RECORD fue aprobado para el tratamiento de carcinoma renal avanzado. En 2011 se aprobó para el tratamiento de tumores neuroendocrinos avanzados de origen pancreático y no pancreático (estudio RADIANT). En 2012 para el cáncer de mama avanzado ER+/PR+ (estudio BOLERO). Concretamente, en su uso clínico para la terapia de CET, EVE fue aprobado en 2015 para el tratamiento del RAML y SEGA, siendo la mejor alternativa para tratar las condiciones asociadas a la enfermedad sin tener que recurrir a cirugía (estudio EXIST) (81). En 2017, se aprobó además para el tratamiento de las crisis epilépticas refractarias de inicio parcial. Parece ser una alternativa efectiva a ciertos fármacos antiepilépticos ya que ha demostrado disminuir la frecuencia e intensidad de las crisis (82).

### 3.6.2. Mecanismo de acción

EVE es un inhibidor de la mTOR, proteína que juega un papel importante en el metabolismo, proliferación y supervivencia celular. Su mecanismo de acción es similar a sirolimus, basándose en la unión al receptor proteico FKBP12 y formando un complejo que se une al complejo mTORC1 inhibiéndolo. De este modo se inhibe el crecimiento tumoral y la angiogénesis. La figura 5 muestra gráficamente el mecanismo de acción intracelular de este fármaco.

### 3.6.3. Farmacocinética

Los niveles sanguíneos de EVE deben monitorizarse, siendo la medición de la concentración valle o  $C_0$  el parámetro utilizado en la práctica clínica, ya que parecen mostrar buena correlación con el AUC. Los niveles valle deben medirse tras la primera semana de tratamiento, y de forma crónica cada 6 o 12 meses en pacientes con área de superficie corporal (ASC) estable, o 3-6 meses si hay cambios sustanciales en esta. Así mismo, en caso de administración concomitante de inhibidores o inductores del CYP3A4 o gp-p es recomendable evaluar la  $C_0$ . (83).



EVE sigue una farmacocinética lineal a dosis habitual. En cuanto a su absorción, la polaridad de la cadena hidroxietilo frente a sirolimus permite una mayor biodisponibilidad de EVE, aun así se encuentra entorno al 16%. Se puede administrar con o sin comida, pero siempre de la misma manera. Los alimentos ricos en grasas sí que puede afectar a su absorción hasta en un 22%. Se absorbe rápidamente tras su administración, alcanzando picos máximos tras 1-2h. EVE es sustrato de la gp-p por lo que la absorción a través del tracto gastrointestinal está determinada por la actividad de esta proteína (84). En cuanto a su metabolismo, EVE es altamente metabolizado por el CYP3A4, mientras que el CYP3A5 tiene un papel menos importante, siendo un ratio 1:6 respectivamente. El CYP2C8 representa menos del 10% del metabolismo (85). Se han identificado varios metabolitos incluyendo productos de hidroxilación y metilación, todos inactivos o con una actividad 100 veces menor.

EVE se une a eritrocitos en un 95%, mientras que su unión a proteínas plasmáticas es de un 74%. La relación sangre/plasma de EVE es dependiente de la concentración, oscilando entre el 17% y 73% en el intervalo de 5 a 5000ng·ml<sup>-1</sup>. Se distribuye por todo el organismo y atraviesa la barrera hematoencefálica. La vida media de eliminación es de 30h. Según datos de estudios de eliminación realizados en paciente trasplantados, su excreción es mayoritariamente en heces (80%) y minoritaria en orina (5%) (84).

#### **3.6.4. Interacciones farmacológicas**

Las interacciones farmacológicas con EVE pueden darse en presencia de inhibidores, inductores o sustratos del CYP3A4 o gp-p sobre todo. Teniendo en cuenta que los pacientes CET del estudio son pediátricos, factores como la ingesta de alcohol o tabaco no se tienen en cuenta. Los principales fármacos que pueden interactuar con EVE y que frecuentemente están pautados en pacientes con CET se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 6. Fármacos habituales en pacientes con complejo de esclerosis tuberosa que son sustratos, inductores o inhibidores del CYP3A4 y/ gp-p.**

<b>Familia fármacos</b>	<b>Sustratos</b>	<b>Inductores</b>	<b>Inhibidores</b>
<b>CYP3A4</b>			
<b>Inmunosupresores</b>	Everolimus, sirolimus, tarolimus, ciclosporina		Ciclosporina
<b>Antidepresivos</b>	Amitriptilina, clormipramina, setralina, fluoxetina, venlafaxina, citalopram		
<b>Antipsicótico</b>	Haloperidol, quetiapina, aripipazol		Ácido valproico
<b>Antiepiléptico</b>	Topiramato, perampanel, ox/carbamazepina	Topiramate, carbamazepine, oxcarbamazepine, fenobarbital, fenitoina, rufinamida	
<b>Benzodiazepinas</b>	Clobazam	Clobazam	
<b>Otros</b>	Verapamilo, estatinas, estrógenos, antihistamínicos	Corticosteroids, pioglitazone	
<b>Glicoproteína-p</b>			
<b>Inmunosupresores</b>	Everolimus, sirolimus, tarolimus, ciclosporina		
<b>Antipsicótico</b>		Clorpromazina	
<b>Antiepiléptico</b>		Ox/carbamazepina, fenobarbital, fenitoína	
<b>Benzodiazepinas</b>		Midazolam	Alprazolam
<b>Otros</b>	Corticosteroides Metotrexato	Corticosteroides	IBPs, anticonceptivos orales, verapamilo

El uso concomitante de estos fármacos debe tenerse en cuenta en las dosis orales de EVE, ya que pueden afectar a la concentración sanguínea de este, eficacia e incidencia de efectos adversos.

### **3.6.5. Efectos adversos**

Una dosis insuficiente de EVE puede conllevar la ineficacia terapéutica y el agravamiento de la enfermedad. En el caso contrario, el exceso puede generar una serie de EEAA entre los que destacan por su mayor frecuencia: úlceras orales (estomatitis), tos, diarrea/estreñimiento, problemas en la piel, náuseas y vómito, fiebre, pérdida del apetito, pérdida de peso, hiperglucemia, dislipidemia (hipercolesterolemia y hipertrigliceridemia), hipertensión, espasmos musculares, gusto anormal o boca seca, dolor de cabeza, pérdida de cabello, insomnio, mareos, infecciones recurrentes y anemia. La estomatitis es el trastorno más frecuente, que aparece de forma recurrente sin ser significativamente grave. Así mismo, al tratarse de pacientes pediátricos, la amenorrea y trastornos en el crecimiento deben ser controlados y debidamente tratados (84).

### 3.6.5.1. Infecciones y tumores

Al igual que con los inhibidores de la calcineurina y otros inmunosupresores, la presencia de infecciones y neoplasias son una de las complicaciones derivadas de la inmunosupresión que ocurren con cierta prevalencia y comprometen la vida del paciente.

La supresión del sistema inmune por EVE conlleva la aparición de infecciones recurrentes. Es importante controlar los marcadores virales antes y durante el tratamiento inmunosupresor. Por otro lado, puede aparecer neumonitis de causa no infecciosa durante los 6 primeros meses de tratamiento. En caso de neumonitis intersticial grave se debe suspender el tratamiento con EVE.

### 3.6.5.2. Cardiovasculares

La aparición de alteraciones metabólicas como la hiperglucemia y dislipidemias son más frecuentes en pacientes con TOS que sobre la población general. El efecto más pronunciado es el aumento de LDL-c, aunque también pueden elevarse los niveles de colesterol HDL (HDL-c) y triglicéridos. Entre los distintos grupos de inmunosupresores, los inhibidores de la mTOR destacan por alterar el perfil lipídico respecto al resto (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto sobre el perfil lipídico de los diferentes fármacos inmunosupresores.

Grupo inmunosupresor	Fármaco	Colesterol total	LDL-c	HDL-c	Triglicéridos
Corticoides	Prednisona	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Inhibidores de la calcineurina	Ciclosporina	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑
	TAC	↑↑	↑↑	↑	↑
Inhibidores de la mTOR	Sirolimus	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑
	EVE	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑
Antiproliferativos	Ácido micofenólico, azatioprina	↔	↔	↔	↔

↑↑↑: aumento notable; ↑↑: aumento moderado; ↑: aumento leve; ↔: sin cambio

Información obtenida de (86).

Entre los mecanismos implicados en la dislipidemia por mTOR se encuentra la inhibición de la lipoprotein-lipasa, disminución de la lipólisis, disminución del catabolismo de la Apo-B100 e incremento de la secreción de VLDL.

En pacientes trasplantados se exigen unos niveles de LDL-c por debajo de 100 mg·dl<sup>-1</sup> para evitar el riesgo cardiovascular. Por ello el tratamiento hipolipemiante está indicado en estos pacientes,

siendo primera elección las estatinas, concretamente atorvastatina. También pueden asociarse omega3 o ezetimiba.

### 3.6.6. Indicaciones y posología

La dosis de EVE depende de la indicación, siendo significativamente mayor para el tratamiento de los síntomas asociados a CET que para la profilaxis de rechazo en caso de trasplantes. La mayoría de las recomendaciones de dosis de inicio en CET se calculan en base a el ASC, la edad, y la presencia o no de inductores/inhibidores enzimáticos del CYP3A4 y la gp-p. El ASC debe calcularse con la fórmula de Dubois:  $ASC = (p^{0,425} \times A^{0,725}) \times 0,007184$ . Las dosis diarias recomendadas por ficha técnica son:

- Tratamiento de RAML: se recomienda una dosis fija de 10 mg por día.
- Tratamiento de SEGA:  $4,5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  o en niños de entre 1 a 3 años  $7 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ .
- Epilepsia: Para niños menores de 10 años la dosis de inicio es  $6 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ , o  $9 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  en caso de presencia de inductores del CYP3A4 o gp-p. Para niños entre 10 y 18 años la dosis de inicio es  $5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ; o  $8 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  en caso de presencia de inductores del CYP3A4 o gp-p. En caso de adultos (>18 años) la dosis de inicio es  $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ , o  $5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  en caso de presencia de inductores del CYP3A4 o gp-p.

Las concentraciones objetivo se sitúan en torno a  $5\text{-}15 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , aunque para epilepsia refractaria se recomiendan entre  $9\text{-}15 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . En el caso de trasplante, las dosis objetivo son menores,  $3\text{-}8 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  (87). Se recomienda la monitorización de los niveles en sangre en el caso de SEGA, mientras que es opcional para RAML y no hay indicaciones en caso de epilepsia. Basándose en niveles valle en sangre objetivo, el incremento de dosis debe hacerse según la siguiente fórmula: nueva dosis de EVE = dosis actual x (concentración objetivo/concentración actual) (87).

Así mismo, las dosis deben ajustarse con el tiempo en función de la evolución del paciente, por lo que dependiendo de la eficacia y/o presencia de efectos adversos pueden variar sustancialmente de las dosis recomendadas de inicio. Así mismo, la inclusión de inductores o inhibidores del CYP3A4 o gp-p deben tenerse en cuenta para el posible reajuste de dosis.

## **4. FARMACOGENÉTICA**

### **4.1. DEFINICIÓN E HISTORIA DE LA FARMACOGENÉTICA**

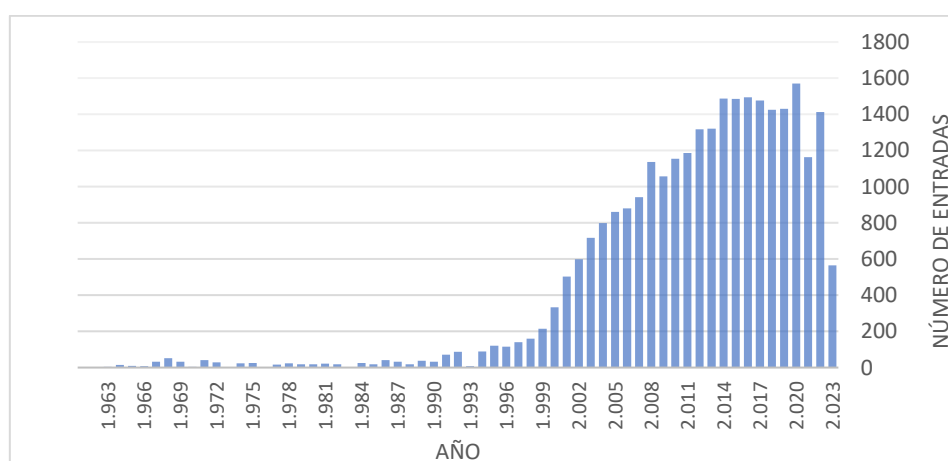
Desde hace siglos se intenta buscar la respuesta a por que dos individuos tienen reacciones diferentes ante la toma de un mismo medicamento, ya sea a nivel de efectividad como de seguridad. La mayoría de los medicamentos solo son efectivos en un 25-60% de pacientes, registrándose anualmente más de 2 millones de casos de EEA derivados de fármacos, y cien mil muertes por esta causa (88). Esta variabilidad interindividual puede deberse a factores genéticos y no genéticos. La expresión y actividad de los genes es gran parte de la causa, más que la dotación génica per se. Pequeñas diferencias en la secuencia de nucleótidos del ADN, denominadas polimorfismos, son los principales responsables. Aunque varios siglos antes de Cristo ya se observaron y reportaron estas diferencias, el primer informe farmacogenético moderno fue publicado a principios de 1930, por Synder, donde observó que la capacidad de degustar el sabor amargo de la feniltiourea dependía del genoma individual y presentaba una herencia autosómica recesiva. Posteriormente, en 1957 Motulsky documentó que las diferentes respuestas entre individuos a los medicamentos podían deberse a “defectos” heredados en las enzimas metabolizadoras (89). No fue Vogel hasta 1959 quien definió por primera vez el término farmacogenética, estableciéndola como campo de estudio para dar respuesta a esas variaciones interindividuales.

Hoy en día la farmacogenética se describe como una ciencia que estudia la relación entre el genotipo individual y la respuesta a la terapia farmacológica. Concretamente, la EMA define la farmacogenética como “el estudio de las variaciones en la molécula de ADN que tiene relación con la respuesta a los fármacos” (90). En un sentido más amplio se encuentra otro término relacionado con la farmacogenética, y que en ciertas ocasiones se emplea indistintamente, la farmacogenómica. En concreto esta última se encarga del estudio de la variabilidad de expresión de genes relevantes en la susceptibilidad a enfermedades, así como la respuesta celular, tisular, individual o a nivel poblacional, con la finalidad de identificar nuevas dianas y marcadores para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Esta tesis se basa en la aplicación de la farmacogenética en el tratamiento inmunosupresor y como tal nos centraremos en la misma. La farmacogenética basa en el estudio de las variantes genéticas y su asociación con la farmacocinética y farmacodinamia del fármaco. La farmacocinética se encarga de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, que dan lugar a diferencias de concentración del fármaco incluyendo su lugar de acción. Por su parte, la farmacodinamia se

encarga de la variabilidad en el mecanismo de acción del fármaco debido a las interacciones del principio activo con su diana terapéutica en el organismo.

En 1953 Watson y Crick publicaron en *Nature* el artículo «*Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*», que marcaba un hecho histórico y un punto clave en el desarrollo de la biomedicina con el descubrimiento de la molécula de ADN (91). Pero fue el *International Genome Project* (92) quien marcó el desarrollo de la farmacogenética y farmacogenómica. Este proyecto tenía como objetivo la secuenciación completa del genoma humano, que, tras ser completado en 2004, dio a conocer que tenemos alrededor de 30000 genes, de los cuales sorprendentemente solo un 1,5% codifica para proteínas (93). Gracias a su descubrimiento, se observó que tenemos un genoma idéntico al 99,9%, siendo ese 0,1% el responsable de la gran variabilidad entre individuos y capaz de generar grandes diferencias en la expresión génica. Además, la mayor parte de diferencias se encuentran en regiones no codificantes para proteínas.

Desde la secuenciación del genoma, el número de estudios en este tema ha crecido de forma exponencial. La Figura 13 muestra la línea de tiempo del número de entradas con el término “*Pharmacogenetics*” en el motor de búsqueda *Pubmed* (94).



**Figura 13.** Línea temporal del número de entradas obtenidas en PubMed con el término “*Pharmacogenetics*” a fecha de junio de 2023.

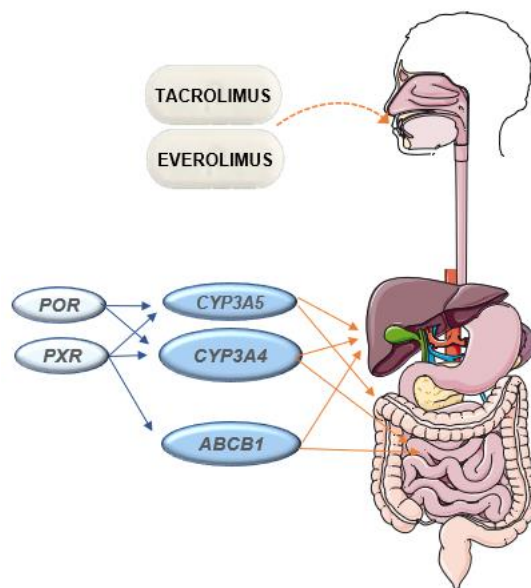
En 2008 se puso en marcha el proyecto *1000 Genomes Project* (92) cuyo objetivo era secuenciar el genoma de 1000 individuos (posteriormente ampliado a 2500) de 27 grupos poblacionales. Se consiguieron caracterizar más de 88 millones de variantes en el genoma humano, incluyendo 84,7 millones polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polimorphisms*), 3,6 millones de inserciones o eliminaciones cortas uno o más pares

de bases (*indels*) y 60000 variantes estructurales, agrupándolos en haplotipos, o lo que es lo mismo, variantes genéticas que tienden a heredarse juntas (95). Hoy en día existen bases de datos como GenBank® (96), Ensembl (97), RefSeq (del *National Center of Biotechnology Information*) (98) u OMIM® (99), donde se puede consultar información sobre todas estas variantes incluido su frecuencia alélica y genotípica.

El conocimiento de las variaciones existentes entre individuos ha permitido profundizar en la repercusión farmacológica que puede suponer para sus portadores, y las necesidades de adaptación en la terapia para estos individuos. La farmacogenética se enfoca en definir un tratamiento individualizado basando en el perfil genético del paciente, contribuyendo a lo que hoy en día se llama Medicina Personalizada de Precisión. El análisis de los polimorfismos influyentes en la respuesta a un fármaco no pretende ser una única variable decisiva, pero sí parte de la respuesta, permitiendo adaptar la terapia o bien explicar la falta de efectividad o existencia de efectos adversos. Su incorporación en la práctica clínica prevé mejorar la efectividad y seguridad de los fármacos, sin embargo, aún existen barreras para su implantación, ya que la identificación de biomarcadores relevantes y el análisis conjunto de todos los datos resulta todavía una tarea compleja. Con fin de abordar estas barreras nació el *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC®)*, un consorcio internacional dedicado a la creación, selección y publicación de pautas de práctica clínica, las cuales están basadas en la evidencia. Este proyecto comenzó en 2009 de la mano de *Pharma Knowledge base (PharmGKB)* y el *Pharmacogenomics Research Network (PGRN)* (100). El consorcio CPIC elabora guías que pretenden abordar la dificultad de traducir los resultados genéticos en decisiones a la hora de prescribir un fármaco en la práctica clínica (101). No todos los fármacos cuentan a día de hoy con Guías CPIC®, y para los que tienen se incluye información sobre su evidencia científica (1A como mayor evidencia hasta 3 de forma decreciente), y relevancia/repercusión clínica. Además, debe tenerse en cuenta que las recomendaciones deben ser adaptadas a cada entorno, en función de la prevalencia de las variantes genéticas, la tecnología disponible y los protocolos de actuación en cada zona de salud. Con todo ello, la Medicina Personalizada de Precisión pretende aplicar estas estrategias para la elección del medicamento idóneo, y mejorar el perfil de seguridad y efectividad de los fármacos utilizados en grupos poblacionales concretos.

## 4.2. FARMACOGENÉTICA DE TACROLIMUS Y EVEROLIMUS

Los fármacos inmunosupresores actúan regulando la respuesta del sistema inmune, siendo normalmente fármacos de estrecho margen terapéutico como TAC o EVE. Sin embargo, existe una elevada variabilidad interindividual en la respuesta, encontrando pacientes con mayor incidencia de efectos adversos y otros con falta de efectividad terapéutica. Existen múltiples factores que influyen en la respuesta como pueden ser la edad, el sexo, el peso o patologías asociadas, pero solo parte de ellos son tenidos en cuenta a la hora de definir la dosis adecuada de fármaco para cada paciente. Aun así, actualmente la capacidad de predecir de respuesta individual es limitada y supone un reto farmacológico de cara a optimizar la terapia de los pacientes inmunodeprimidos. La farmacogenética surgió como una herramienta de apoyo ante esta problemática, ayudando en la selección del tratamiento adecuado para cada grupo poblacional. A día de hoy existen numerosos estudios farmacogenéticos en el campo de la inmunosupresión, sin embargo, siguen existiendo grandes incógnitas y los resultados observados en algunos estudios parecen ser controvertidos. Actualmente, TAC cuenta con una Guía CPIC publicada en 2015 sobre la implicación de un polimorfismo en el gen *CYP3A5* que codifica la principal enzima metabolizadora de este fármaco (102). La investigación de la farmacogenética de TAC es mucho más extensa que en el caso de EVE. Sin embargo, ambos fármacos comparten rutas de metabolismo y transporte, por lo que la mayoría de las variantes genéticas descritas influyentes en la farmacocinética de ambos también son comunes como puede apreciarse en la Figura 14.



**Figura 14. Principales genes involucrados en la farmacocinética de tacrolimus y everolimus.** Elaboración propia.



Los estudios farmacogenéticos para TAC y EVE realizados hasta la fecha se centran mayoritariamente en las variantes genéticas implicadas en la farmacocinética, mientras que, aunque existentes, son escasos para la farmacodinamia.

#### **4.2.1. Genes que codifican para enzimas metabolizadoras de tacrolimus y everolimus**

Los principales polimorfismos estudiados en la terapia de TAC y EVE son los relacionados con su metabolismo, ya que implica una relación directa con los niveles sanguíneos de estos fármacos. Tras su metabolismo, son generados metabolitos intermedios o finales, que en el caso de TAC y EVE no han demostrado tener acción inmunosupresora importante, atribuyéndose el efecto farmacológico al principio activo inicial. El metabolismo ocurre principalmente en hígado, donde se expresan mayoritariamente las enzimas metabolizadoras, pero también puede darse en intestino, pulmones, riñón o piel, por lo que la vía de administración del fármaco es determinante en este sentido. Concretamente, los fármacos administrados vía oral sufren un primer metabolismo intestinal, para pasar vía vena porta al hígado donde sufren la principal metabolización y ser posteriormente distribuidos al resto del cuerpo. Las reacciones del metabolismo de fármacos pueden clasificarse en dos grupos: reacciones de fase I y reacciones de fase II. Las reacciones de fase I constan de reacciones de oxidación, reducción e hidrolisis, con fin de disminuir la lipofilia del fármaco y con posibilidad de generar metabolitos activos e incluso tóxicos. Las reacciones de fase II incluyen conjugaciones con moléculas endógenas que aumentan la hidrofilia del fármaco para ser más fácilmente excretado (103). Una mínima parte del fármaco, en el caso de TAC y EVE, será excretado intacto. Existen numerosas familias de enzimas metabolizadoras entre las que destaca la superfamilia del citocromo P450 (CYP450), compuesta por más de 2000 isoformas diferentes. Las familias 1, 2 y 3 son las encargadas del metabolismo de xenobióticos, mientras que el resto participa en la biosíntesis y metabolismo de sustancias endógenas. Concretamente TAC y EVE son metabolizados principalmente por la subfamilia de isoenzimas CYP3A, en específico por los citocromos CYP3A5 y CYP3A4, los cuales poseen un alto porcentaje de homología (>85%) y son los predominantes en el hígado. Particularmente el CYP3A4 es el responsable del metabolismo de gran parte de los fármacos existentes. Tanto el CYP3A4 como el CYP3A5 son altamente polimórficos e inducibles por la acción de numerosos principios activos. Por ello, unas de las principales vías de interacciones medicamentosas son mediadas por estos citocromos. Ambos citocromos se encuentran codificados por genes localizados en el cromosoma 7, en la posición 7q21-q22.1, junto con los pseudogenes *CYP3AP1* y *CYP3AP2*. Los pseudogenes son secuencias de ADN estructuralmente similares a un gen pero que no codifican para proteínas, aunque sí parecen tener funciones reguladoras. La estructura básica de los genes *CYP3A* es la misma, contando todos con 13 exones.

La región 5'-UTR de los citocromos *CYP3A* es bastante corta (unos 100 pb), sin embargo, la 3'-UTR es muy variable existiendo 111 pb en el *CYP3A5* y 1152pb en el *CYP3A4*. Es posible que estas diferencias afecten a la capacidad de regulación génica, siendo más fuerte en el caso del *CYP3A4* (104).

#### 4.2.1.1. Citocromo CYP3A5

El citocromo CYP3A5 se localiza principalmente en el hígado, pero también en pulmón, riñón, colon, esófago y glándula pituitaria. Este citocromo es codificado por el gen del mismo nombre, *CYP3A5*, el cual contiene 13 exones que producen un transcrito de 1720 pb codificando para una proteína de 502 aminoácidos. Se han descrito más de 26 variantes alélicas para este gen (105). Su expresión muestra una alta variabilidad interindividual siendo inducido por el receptor de glucocorticoides entre otros, pero principalmente debido al SNP rs776746 localizado en la posición 6986 del intrón 3 del gen que supone un cambio de la base nitrogenada adenina (A) por guanina (G), expresándose como A6986G o A>G6986 (106). Este polimorfismo da como resultado un defecto de *splicing*, es decir, un corte y empalme incorrecto del pre-ARNm, entre los exones 3 y 4 que genera un ARNm maduro inestable que finalmente es degradado y por lo tanto la enzima no es transcrita correctamente (107). Este polimorfismo, conocido comúnmente como *CYP3A5\*3*, permite clasificar a los individuos en no-expresores (*CYP3A5\*3/\*3* o GG), metabolizadores intermedios (*CYP3A5\*3/\*1* o AG, siendo \*1 el alelo *wildtype* o A) y metabolizadores rápidos (*CYP3A5\*1/\*1* o AA) (102). Aunque el metabolismo principal de TAC sea a través de esta ruta, en individuos no-expresores es desviado hacia el *CYP3A4*. Cabe destacar que el 92,5% de la población española es portadora de esta variante, habiendo un 86% de no-expresores al ser homocigotos para este alelo. Sin embargo, la frecuencia alélica entre grupos étnicos es muy dispar, siendo la mayoría de los sujetos de raza negra homocigotos *wildtype* para esta variante. Esto en parte explica la mayor incidencia de rechazo y nefrotoxicidad experimentada por este colectivo, ya que las dosis de TAC necesarias para la prevención de rechazo son significativamente mayores frente a sujetos de raza blanca (108,109). Concretamente, los expresores del *CYP3A5* necesitan entre 1'5 y 2 veces dosis mayores de TAC comparado con no-expresores (102). Este gen cuenta con recomendaciones para la dosificación en base al genotipo del en cuatro guías diferentes. CPIC (nivel evidencia 1A) y *National Pharmacogenetics Network (RNPgX)* recomiendan en presencia del alelo \*1 (*wildtype*) una dosis inicial 1,5-2 veces superior a la estándar, no superando los  $0,3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , y ajustando posteriormente la dosis de mantenimiento en función de los niveles en sangre. Las guías *Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG)* recomiendan un aumento de 1,5 veces respecto a la dosis estándar para portadores y de 2,5 para homocigotos del alelo \*1 (110). La FDA por su parte,

recomienda monitorizar los niveles en sangre para el ajuste inicial de dosis en individuos expresores del CYP3A5 pero no hace recomendaciones específicas sobre su ajuste.

Un estudio de Theveret et al. (2010) en trasplantados renales observó la respuesta tras la aplicación de las recomendaciones basadas en el genotipo *CYP3A5*, estableciendo un grupo control con una dosis inicial estándar de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  y un grupo con una dosis inicial adaptada en función del genotipo *CYP3A5*, siendo  $0,15\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$  para metabolizadores lentos  $*3/*3$ , y  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  para metabolizadores rápidos (portadores alelo  $*1$ ). Observaron que tras tres días de tratamiento, descritos como suficientes para alcanzar el estado estacionario, había mayor número de pacientes con concentraciones en sangre dentro del rango diana (43,2% vs 29,1%), y fueron necesarios menos reajustes de dosis en el grupo de dosis ajustada (111). Otro estudio realizado en España en 400 trasplantados renales, estableció tras 12 meses de tratamiento una dosis media necesaria de TAC de  $0,05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  en individuos no-expresores de *CYP3A5*, mientras que para expresores fue de  $0,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , con unos niveles objetivo de  $5\text{-}10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (112). Por otro lado, existen estudios que relacionan el fenotipo expresor o no-expresor con presencia de efectos adversos, concretamente la ausencia de enzima con mayor riesgo de NODAT y EGI (diarrea) mientras que su presencia con un mayor riesgo de rechazo del injerto (113,114).

Un caso especial es en trasplantados hepáticos, donde el genotipo del donante parece jugar un papel importante, sobre todo a corto plazo post-trasplante. En un estudio de Shao et al. (2019) se observó que en los casos donde el receptor es portador *CYP3A5* y el donante no portador; y donde el receptor es no portador y el donante portador, no era necesario el ajuste de dosis, indicando que el *CYP3A5* intestinal del paciente y el *CYP3A5* hepático del donante tienen el mismo rol (115). Los resultados son consistentes con otros estudios donde el genotipo del hígado del donante y el genotipo intestinal del receptor contribuyen casi por igual a corto plazo post-trasplante (116). Otros estudios sin embargo, enfocan a que la dosis inicial de TAC debe guiarse por el genotipo del donante para alcanzar una concentración objetivo más rápidamente y reducir el riesgo de rechazo temprano (117). Sin embargo, los resultados son controvertidos y no está del todo claro cómo este quimerismo evoluciona a lo largo del tiempo conforme las células hepáticas se van regenerando dentro del receptor.

Respecto a EVE, el *CYP3A5* representa un metabolismo secundario respecto al *CYP3A4* en un ratio 1:6. De hecho, un estudio llevado a cabo por Picard et al. (2011) en trasplantados renales, demostró que la presencia del alelo *CYP3A5\*1* no influía en la farmacocinética de EVE, incluido el aclaramiento en microsomas hepáticos humanos mientras que en TAC este aclaramiento

aumentaba 1,5 veces (85). Otros estudios han demostrado lo mismo que en el caso de EVE en trasplantes cardiacos y pulmonar, sin embargo, por el momento no hay estudios en el caso de pacientes con CET (118–121). El único estudio que ha mostrado asociación con esta variante en la terapia con EVE fue realizado en 34 pacientes con cáncer de mama, renal y pancreático, mostrando menores niveles sanguíneos en presencia del alelo *CYP3A5\*1*. Los autores sugieren que la causa de esta asociación es una saturación del CYP3A4 por la politerapia del tratamiento contra el cáncer (hormonoterapia, quimioterapia, etc), ya que el CYP3A5 tiene un papel menor en el metabolismo de EVE (122).

#### **4.2.1.2. Citocromo CYP3A4**

El CYP3A4 se encuentra en el hígado, pero también en la mucosa intestinal. Su inducción está regulada por el Receptor X del Pregnano (PXR, del inglés *Pregnane X Receptor*), un receptor nuclear. Este citocromo es codificado por el gen del mismo nombre, *CYP3A4*, el cual tiene una longitud de 27,7 kb y 13 exones. Se han descrito más de 240 variantes alélicas para este gen (123), sin embargo, su repercusión sigue siendo controvertida y no se ha podido establecer una implicación clara. La falta de valor predictivo viene dada en parte por las bajas frecuencias alélicas de estas variantes y la falta de una asociación clara con un fenotipo alterado (104).

El polimorfismo más relevante para el gen *CYP3A4* es el rs2740574 localizado en la posición -392, la cual se encuentra en la región promotora 5' donde se unen los elementos reguladores de la transcripción. Este polimorfismo comúnmente es nombrado como *CYP3A4\*1B* y supone un cambio de adenina (A) por guanina (G) (A-392G). Las asociaciones fenotípicas a este polimorfismo son contradictorias, ya que ciertos estudios *in vitro* muestran una actividad disminuida de la enzima, mientras que otros demuestran lo contrario (124). Parece ser que la presencia de esta variante en el promotor del gen afecta a la unión de represores transcripcionales, tratándose estos de proteínas inhibitorias de la transcripción génica que regulan la expresión final del gen. Amirami et al. (2003), demostraron en diferentes líneas celulares (*HepG2* y *MCF-7*) y hepatocitos primarios de donantes, que la presencia del alelo *CYP3A4\*1B* se asociaba a 1,2-1,9 veces mayor actividad enzimática del CYP3A4 (125). Posteriormente, se han llevado a cabo numerosos estudios en pacientes intentando establecer la relación de este alelo con la farmacocinética de TAC y su respuesta terapéutica, mostrando mayoritariamente una actividad enzimática aumentada y una menor dosis de fármaco necesaria (126,127). Un metaanálisis de Wei-Long et al. (2015) mostró que la presencia del alelo *\*1B* afecta a la dosis necesaria de TAC y los niveles sanguíneos ajustados al peso en pacientes con trasplante

renal, concretamente europeos(128). También se ha confirmado en pacientes pediátricos con síndrome nefrótico tratados con TAC (129).

Hay que tener en cuenta que la frecuencia alélica de este SNP en la población europea es minoritaria, siendo en España de un 2,8% (97). Se ha descrito la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*1*, heredándose de forma conjunta en un alto porcentaje de los casos a pesar de estar situados en distintos *loci*. Algunos autores atribuyen el efecto del alelo *CYP3A4\*1B* a un metabolismo aumentado generado por la presencia conjunta del *CYP3A5\*1* (130,131).

En relación a EVE, por el momento solo existe un estudio relativo al alelo *CYP3A4\*1B*, mostrando poca o ninguna evidencia al respecto (120).

Por otro lado, la variante rs35599367 descrita por primera vez en 2011, se encuentra localizada en el intrón 6 del gen y supone una sustitución de una citosina (C) por una Timina (T) en la posición 15389 (C15389T). Esta variante es comúnmente nombrada como *CYP3A4\*22*, y su frecuencia en la población española es del 3,7% (97). A diferencia del *CYP3A4\*1B*, los resultados obtenidos en los estudios de esta variante parecen mostrar mayor concordancia. La presencia del alelo *CYP3A4\*22* supone una reducción en producción de ARNm y la actividad enzimática del citocromo CYP3A4 en el hígado, reflejando una necesidad de menor dosis de fármaco y menor riesgo de sobreexposición (132,133). También ha sido asociado a una modificación en el aclaramiento renal (134). Concretamente, un estudio de Pallet et al. (2015) mostró que la presencia del alelo *CYP3A4\*22* requería un 30% menos de dosis de TAC en el periodo corto plazo post-trasplante, en caso de ser no-expresores del CYP3A5 (135). Elens et al. (2011) obtuvieron resultados similares, pero con independencia del genotipo *CYP3A5* (132). Otros estudios han mostrado una expresión hepática disminuida de hasta 1,7 veces para el genotipo *wildtype* frente a la presencia del SNP (104). Sorprendentemente, la reducción en la expresión del ARNm solo se ha observado en células hepáticas, mientras que no ocurre en células intestinales, mostrando una asociación tejido-específica de esta variante. Los mecanismos implicados en esta especificidad no están del todo claros (104).

A diferencia del resto de guías clínicas, *RNPGx* ha establecido la recomendación del análisis del genotipo *CYP3A4\*22* en estudios retrospectivos cuando se intenta buscar la causa de una necesidad de dosis reducida, aunque su beneficio en el establecimiento inicial de dosis está todavía por determinar. De momento, no especifica ningún ajuste concreto en función del genotipo (136).



mucho mayor que el resto (141). Sin embargo, no existen muchos más estudios al respecto debido a la baja incidencia de este SNP ya que supone una frecuencia <0,06% en la población europea general.

Ante todo lo nombrado anteriormente, hay que considerar que en individuos no-expresores de CYP3A5, el CYP3A4 y por tanto sus variantes polimórficas, tienen una mayor repercusión en la respuesta farmacoterapéutica que en expresores del CYP3A5. Un estudio reciente de Hernández et al. (2023) estableció que existen diferencias en la dosis inicial necesaria de TAC entre expresores del CYP3A5 y no-expresores, mostrando variabilidad en estos últimos en función del genotipo de *CYP3A4* (142).

Se han desarrollado numerosos algoritmos intentando predecir la dosis de TAC de inicio en función de variables clínicas y genéticas. El primero, diseñado por Passey et al. en 2011 solo tenía en cuenta el genotipo del *CYP3A5* (143). Cada vez surgen nuevos algoritmos incluyendo variantes más precisas, aunque su validez en diferentes etnias sigue siendo un reto. Otros investigadores han intentado definir un *cluster* genotípico que incluya las diferentes variantes de los *CYP3A5* y *CYP3A4* para establecer distintos perfiles metabolizadores, sin embargo, se necesita estudiar más profundamente la repercusión final que conlleva la combinación de las diferentes variantes del *CYP3A4* (144).

La Figura 16 muestra la localización de cada uno de los polimorfismos mencionados para los genes *CYP3A5* y *CYP3A4* en el cromosoma 7.

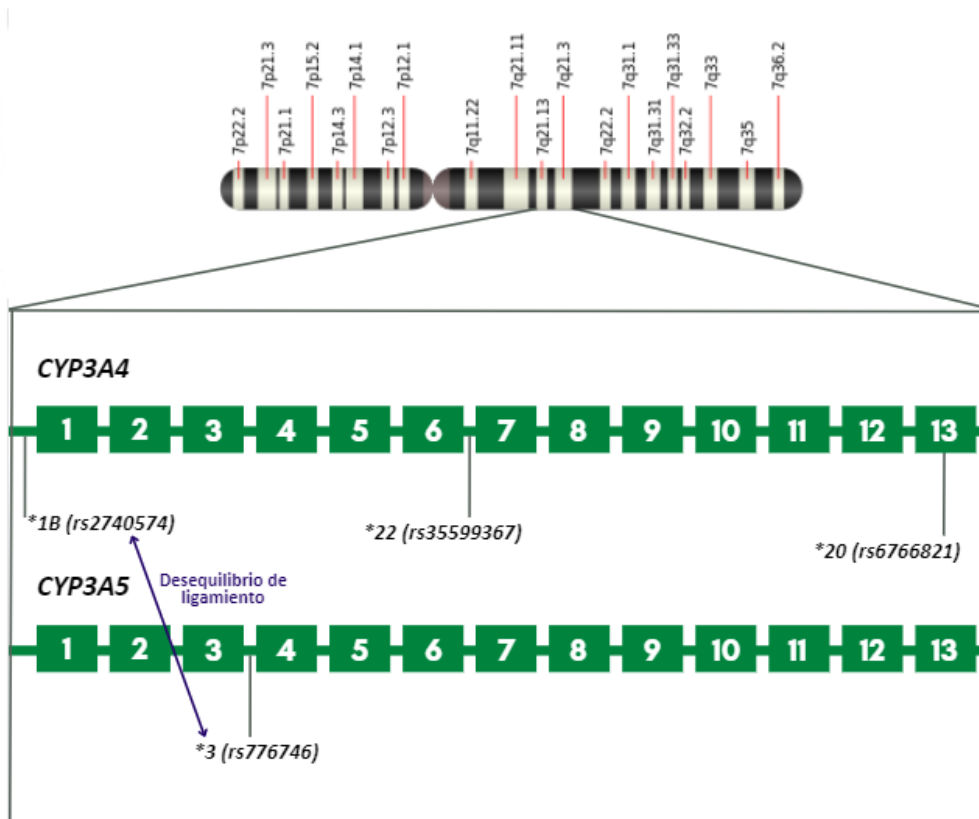


Figura 16. Localización de los polimorfismos más relevantes de los genes CYP3A5 y CYP3A4 dentro del cromosoma 7. Elaboración propia.

#### 4.2.1.3. Citocromo CYP2C8

El citocromo CYP2C8 está involucrado en el metabolismo de numerosos fármacos (>60), ya sea como vía principal o secundaria. Este citocromo es codificado por el gen *CYP2C8* localizado en el cromosoma 10 en la posición 10q23.33, y consta de 32726pb que contienen 9 exones que codifican para 490 aminoácidos. Este citocromo se expresa mayoritariamente en hígado, aunque también en riñón, cerebro, útero, intestino, corazón y otros incluidos ciertos tumores (145).

La variante más destacada de este gen consiste en dos SNP altamente vinculados: el rs11572080 que supone un cambio de guanina (G) por adenina (A) en la posición 416 del gen (G416A o G>A416), y el rs10509681 que supone un cambio de adenina (A) por guanina (G) en la posición 1196 del gen (A1196G), comúnmente denominados *CYP2C8*\*3. Esto supone un cambio de arginina por lisina en la posición 139 de la proteína, y de lisina por arginina en la posición 399 (Arg139Liy+Lys399Arg). La frecuencia del alelo mutado es de un 15% en España.

El citocromo CYP2C8 no participa en el metabolismo de TAC, pero sí en una manera minoritaria en el de EVE (aproximadamente <10%). Su efecto sobre el metabolismo de fármacos no está claro, ya que parece ser sustrato específico, aumentando el metabolismo de ciertos fármacos y



reduciendo el de otros(146). Curiosamente, un estudio en trasplantados renales estableció que la variante *CYP2C8\*3* y un injerto procedente de donante vivo eran variables asociadas a un menor riesgo de función retardada del injerto, la cual se ha relacionado con mayor riesgo de rechazo y peor pronóstico del trasplante. Así mismo se asoció a menor daño renal teniendo los niveles de creatinina como criterio. Esta asociación ha sido explicada por la expresión del *CYP2C8* a nivel renal, participando en el metabolismo del ácido araquidónico a ácido *eicosatrienoico*, un compuesto biológicamente activo con efectos vasodilatadores a nivel de la vasculatura renal, que contrarresta el efecto vasoconstrictor de los anticalcineurínicos (147,148). Sin embargo, otros estudios concluyen lo contrario. Concretamente un estudio español en trasplantados renales con TAC o ciclosporina, se asoció el genotipo *CYP2C3\*8* con un mayor riesgo de función disminuida del injerto y una reducción en el aclaramiento de creatinina (149).

Respecto a EVE, los estudios llevados a cabo en diversos pacientes trasplantados no demostraron asociación de la variante *CYP2C8\*3* con la dosis, niveles en sangre ni presencia de EEAA, probablemente debido al menor metabolismo de EVE a través de este citocromo (85,120,121,150,151).

#### **4.2.2. Genes que afectan al transporte de tacrolimus y everolimus**

La gp-P pertenece a la superfamilia de transportadores ABC formada por 48 miembros, los cuales están clasificados en 8 subfamilias (A-G) basados en la similitud de su secuencia. La gp-p posee dos mitades separadas por una región conectora flexible, contando cada mitad con 6 dominios hidrofóbicos y un dominio de unión a ATP. A través de la hidrólisis de ATP expulsan del interior celular diferentes sustancias como iones, azúcares, fosfolípidos, aminoácidos, péptidos, proteínas, toxinas y ciertos fármacos, generalmente de naturaleza hidrofóbica. Por lo tanto, esta proteína tiene una función protectora celular. Se han propuesto numerosos fármacos como sustratos de esta proteína, aunque el mecanismo de unión a sustrato e inhibición de la gp-p es complejo. Parece ser que la especificidad de sustrato está determinada por varios dominios transmembrana, aunque SNPs localizados fuera de esos dominios también parecen afectar a la especificidad. La gp-p se expresa en el intestino, hepatocitos, riñón (epitelio tubular del asa de Henle y túbulo colector), linfocitos, células con borde de cepillo, ovarios, placenta, testículos y barrera hematoencefálica (152). Así mismo, se expresa en ciertas células cancerosas jugando un rol importante a la resistencia farmacoterapéutica a ciertos quimioterápicos, y por eso es también llamada MDR1 (*Multidrug Resistance protein -1*, del inglés, Proteína de Resistencia Múltiple a Fármacos 1). A nivel celular se encuentra en la membrana citoplasmática, y también en el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico.

Los principales factores de transcripción implicados en la expresión de MDR1 son el factor de respuesta de crecimiento temprano 1 (*EGR1*, por sus siglas en inglés *Early Growth Response 1*), el factor nuclear para expresión de interleucina-6 (*NF-IL6*, del inglés *Nuclear Factor for Interleukin-6*), el factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (*NF-R2*, del inglés *NF-kappa-B related protein 2*) y el PXR.

La gp-p es codificada por el gen *ABCB1* (o *MDR1*) localizado en el cromosoma 7, en la posición 7q21.1, contando con 28 exones que codifican para una proteína de 1280 aminoácidos y un peso molecular de 170 KDa. Este gen es altamente polimórfico, habiéndose identificado más de 50 variantes (153). La mayoría de SNPs producen un cambio de aminoácido (60%), codifican para el mismo aminoácido (polimorfismos sinónimos, 25%) o son no codificantes (15%) (152). Los polimorfismos más estudiados de esta proteína son tres principalmente. El SNP rs1128503, localizado en la posición 1236 (exón 12) supone un cambio de citosina (C) por timina (T) (C1236T), siendo un SNP sinónimo y por tanto manteniendo una glicina en la posición 412 (Gly412Gly). El SNP rs2032582 se localiza en la posición 2677 (exón 21) y supone un cambio de guanina (G) por timina (T) o adenina (A) (G2677T/A), aunque esta última menos prevalentemente. Este SNP supone como resultado el cambio de alanina en el aminoácido 893 por serina o treonina (Ala893Ser/Thr) que se ha asociado con modificaciones en la función de la gp-p. El tercer SNP, rs1045642, localizado en la posición 3435 del gen (exón 26) supone un cambio de una citosina (C) por una timina (T) (C3435T), suponiendo un SNP sinónimo sin cambio de aminoácido, manteniendo una isoleucina en la posición 1145 (Ile1145Ile). La frecuencia alélica del alelo T se encuentra entre el 53-62% en la población ibérica para las tres variantes. La Figura 17 muestra la estructura del gen *ABCB1* y la localización de los SNPs mencionados, así como la estructura tridimensional de la gp-p.

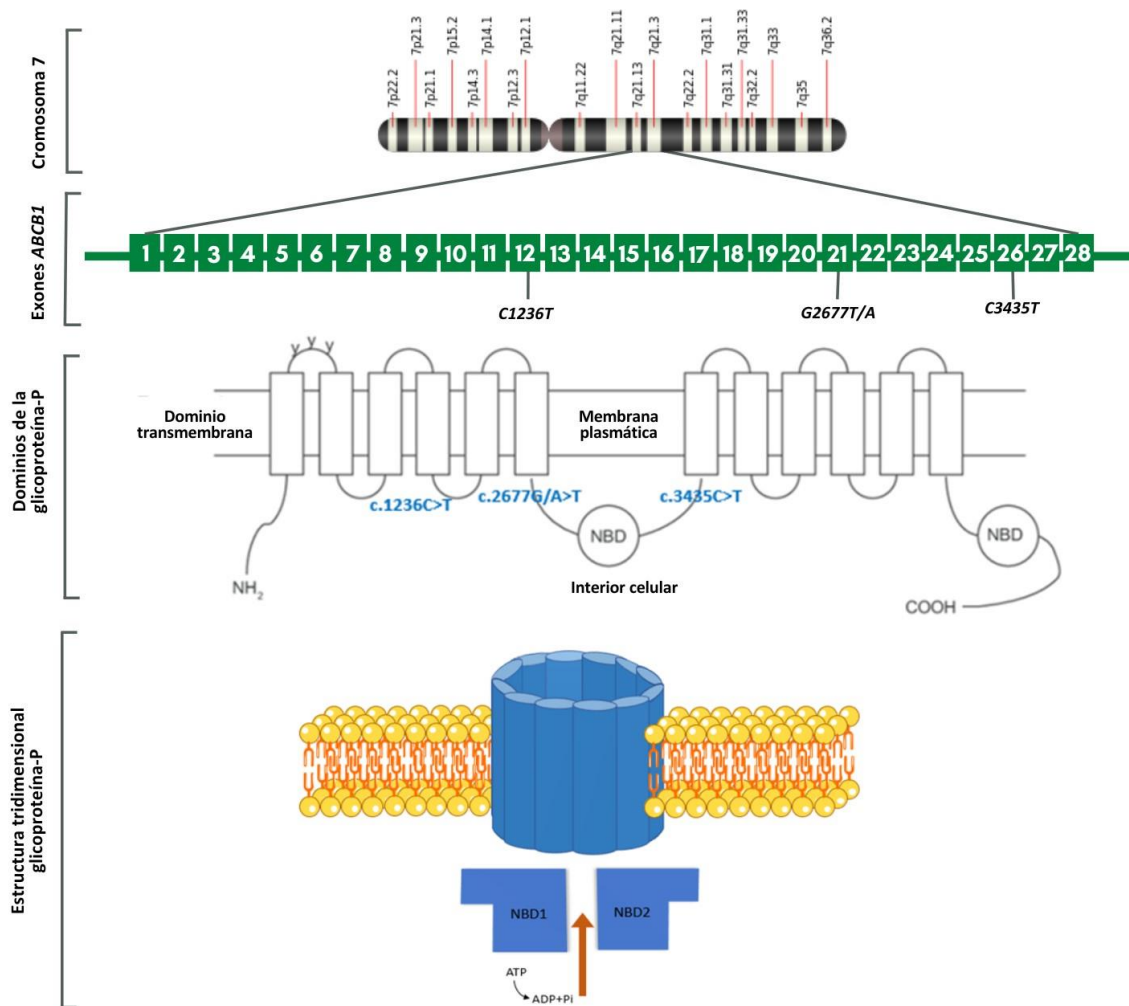


Figura 17. Localización y estructura del gen *ABCB1*, localización de los principales SNPs y estructura tridimensional de la gp-p. Elaboración propia. Información obtenida de (154).

Las dos SNPs sinónimos, a pesar de no afectar al marco de lectura de aminoácidos, han sido relacionados con alteraciones en el plegamiento y estancamiento de los ribosomas por el reconocimiento de codones anómalos, produciendo una alteración en la estructura tridimensional y un cambio en la función de la proteína (153,155). Además, el C1236T parece inducir una alteración conformacional en el ARNm, afectando a la vida media de la gp-p (156). Parece que el SNP C3435T podría tener algo más de influencia por su posición dentro del gen. Así mismo, aunque estudios *in vivo* e *in vitro* muestran resultados controvertidos frente a las dos variantes, parece que la C3435T cuenta con mayor evidencia que confirma su relación con una función de la gp-p disminuida, así como una alteración de la especificidad por sustrato (157,158). Un metaanálisis que incluía 1327 pacientes de trasplante renal concluyó que existe asociación entre la variante C3435T y la farmacocinética de TAC. Concretamente los portadores de al menos

un alelo T mostraban una dosis necesaria menor, así como un ratio concentración/dosis mayor (159).

Estas tres variantes nombradas tienden a agruparse en haplotipos, debido a que se encuentran en un fuerte desequilibrio de ligamiento y tienden a heredarse juntas. Se han descrito diferentes combinaciones haplotípicas aunque el que supone más relevancia es el haplotipo TTT con una o dos timinas en las tres posiciones polimórficas, en función de si se presenta en hetero u homocigosis. El desequilibrio de ligamiento entre estos 3 SNPs ha sido cuantificado en algunos estudios siendo entre 72-89% (160).

En pacientes trasplantados en tratamiento con anticalcineurínicos la relación de estas variantes con los requerimientos de dosis o el ratio concentración/dosis es controvertido (161,162).

Un estudio de Wang et al. (2018) utilizó células *LLC-PK1* transfectadas para generar diferentes haplotipos *ABCB1*, mostrando que la presencia del haplotipo mutado disminuía drásticamente la capacidad de la gp-p de expulsar a TAC y sirolimus, mostrando una disminución de la actividad sustrato dependiente (156). Sin embargo, sí que han demostrado afectar a los niveles intracelulares de fármaco, en especial dentro de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cell*), las cuales son predominantemente linfocitos (163,164). Esta relación ya fue establecida hace tiempo por Hoffmeyer et al. (2010) en población caucásica, asociando el genotipo 3435TT con menores niveles de gp-p en linfocito comparado con el genotipo CC (165). Algunos autores señalan que la discrepancia mostrada entre los distintos estudios puede deberse a la variabilidad de frecuencias entre etnias. Bajos niveles de fármaco en linfocitos (diana terapéutica), se han asociado a mayor riesgo de rechazo en estudios en trasplantados hepáticos y renales (166). Un estudio reciente, además de correlacionar la presencia de 2677TT con la exposición a TAC, también lo relacionó con la mayor presencia de efectos adversos (167).

Un caso especial para este gen es en trasplantados renales, donde el genotipo *ABCB1* del donante parece estar implicado en la función renal. Dado que la gp-p se expresa en células tubulares renales, varios estudios se han llevado a cabo tras la hipótesis de que un genotipo mutado en el donante, y por lo tanto el riñón trasplantado, podría resultar en una mayor concentración intracelular de TAC, aumentando el riesgo de nefrotoxicidad o función renal alterada. La concentración intrarenal de TAC puede no aparecer reflejada por las concentraciones en sangre. Concretamente en España, un estudio en 90 pacientes trasplantados renales en tratamiento con TAC mostró que la presencia del alelo T en el donante estaba asociado con una filtración glomerular disminuida al año post-trasplante (CC: 49,4 vs TT: 41,5

ml\*min<sup>-1</sup>\*1.73 m<sup>-2</sup>, p<0,001) (168). Otro estudio en 237 trasplantados renales de donante vivo, determinó que no había asociación entre el genotipo C>T3435 del donante y nefrotoxicidad (169). En la misma línea, un estudio anterior sobre donantes renales fallecidos tampoco encontró asociación con la función renal ni la supervivencia del injerto (170).

La asociación de estas variantes en donante y receptor es controvertida, ya que la función renal está determinada por numerosos factores entre los que intervienen el tipo de donante, edad del donante, medicación concomitante, patologías y otros factores de riesgo. Así mismo, el potencial de regeneración celular de cada órgano con células del propio receptor depende del tipo de injerto, ya que el hígado tiene tasas de regeneración altas mientras que el riñón no. Aun así, se ha observado una alta prevalencia de quimerismo epitelial tras el trasplante renal, conteniendo un 88% de los aloinjertos células epiteliales tubulares originarias del receptor (171). Todavía queda mucho por investigar en este campo.

Respecto a EVE, los polimorfismos del gen *ABCB1* no han demostrado tener influencia sobre su farmacocinética en trasplantados renales, cardíacos ni de pulmón, aunque en todos los casos los pacientes estaban en terapia simultánea con anticalcineurínicos pudiendo enmascarar el efecto (118,120,121,172). El estudio de Schneider et al (2016) mostró que la presencia de al menos un haplotipo TTT se asociaba con una exposición reducida a EVE en un 21%, siendo contradictorio con otros estudios (173). Por otra parte, un estudio mostró que la concentración intracelular de EVE en linfocito y los niveles en sangre mostraban buena correlación, sugiriendo que la salida del fármaco mediada por la gp-p y sus polimorfismos es de menor importancia (174). Sin embargo, queda mucho por explorar sobre este tema.

#### **4.2.3. Genes relacionados con la expresión y actividad de CYPs y glicoproteína-P**

El PXR, también llamado receptor nuclear de la subfamilia 1, grupo I, miembro 2 (NR1I2), es un factor de transcripción que es activado en presencia de sustancias exógenas, generando la expresión de ciertas proteínas detoxificantes o protectoras. Este factor forma un heterodímero con el Receptor X retinoide (RXR) activando entre otros la expresión del *CYP3A4* y *ABCB1* al unirse a elementos específicos en la región reguladora de estos genes (175). Está codificado por el gen *PXR* (o *NR1I2*) y han sido descritas numerosas variantes polimórficas en él. Se han demostrado correlaciones positivas entre los niveles de ARNm del *PXR* y del *ABCB1* en PBMCs (176).

El polimorfismo rs2472677 consiste en un cambio citosina (C) por timina (T) en la posición de 63396 del gen (C63396T), siendo predominante en España, con una frecuencia alélica del 62,1%. Se trata de un SNP en el intrón 1 que incrementa la unión de ciertos factores de transcripción como el factor nuclear del hepatocito 3β (HNF3β, de sus siglas en inglés *Hepatocyte Nuclear*

*Factor 3β*) regulando la actividad del promotor de *PXR* y produciendo mayor actividad y nivel de ARNm a nivel hepático (177). Por tanto, esta variante también se ha asociado a una mayor actividad del CYP3A4 y gp-p. Adicionalmente, el polimorfismo rs7643645 produce un cambio de adenina (A) por guanina (G) en la posición 69789 del gen (A>G 69789), con una frecuencia alélica en España de un 35%, inferior al anterior. Este SNP se ha asociado a la pérdida de la zona de unión del factor nuclear hepático 4α (HNF4α, del inglés *hepatic nuclear factor 4α*) y consecuentemente una expresión más baja del ARNm de *PXR*, *CYP3A* y *ABCB1* (178).

Por otro lado, la oxidorreductasa del citocromo P450 (POR, de sus siglas en inglés *P450 oxidoreductase*) es una proteína de membrana responsable de la transferencia de electrones desde NADPH a las enzimas microsomales tipo II del CYP450 del retículo endoplasmático. Se han descrito más de 40 variantes del gen en humanos, siendo el SNP rs1057868 la variante más común y estudiada. Este polimorfismo supone el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 1508 del gen (C1508T) produciendo un cambio aminoacídico de una alanina por una valina en la posición 503 de la proteína (Ala503Val). La frecuencia del alelo T en la población española es del 28%. Esta variante parece afectar al sitio de unión del dinucleótido de flavina y adenina alterando su reactividad hacia las enzimas CYP y por tanto la actividad de estos. Concretamente, el CYP3A5 y CYP3A4 son activados por esta oxidorreductasa. A nivel hepático, se estudió la influencia de esta proteína en ratones *POR-knockout*, y se observó una acumulación de lípidos a nivel hepático además de mostrar un metabolismo hepático de fármacos disminuido (179).

*POR* se ha establecido como un elemento influyente en la actividad del CYP3A. Individuos portadores del alelo *POR\*28* se asocian con mayor actividad del CYP3A5 y mayores dosis necesarias de TAC en trasplantados renales que expresan el CYP3A5 (180–182) mientras que se asocia a mayor actividad del CYP3A4 para aquellos individuos que no expresan el CYP3A5 (183). Así mismo, otros estudios asocian la variante a una menor concentración de TAC en sangre y un menor ratio concentración/dosis en pacientes trasplantados renales o cardíacos, aunque con un impacto clínico limitado (15-20%) (161). Sin embargo, otros estudios no han establecido esas asociaciones (184,185). También se ha asociado la presencia de este SNP a mayor riesgo de NODAT a través de un mecanismo CYP17A1 dependiente. El alelo *POR\*28* ha demostrado disminuir la actividad de este citocromo en un 60%, lo cual se ha relacionado con una disminución de la actividad 17,20-liasa y un aumento de 17-hidroxilasa, característico de sujetos con DMII (186). Por lo tanto, aunque no sea un mecanismo TAC dependiente, puede contribuir a un mayor riesgo diabetogénico en asociación con TAC.

Respecto a EVE, en un estudio reciente el genotipo *POR\*28* fue asociado a hipertrigliceridemia, un EEAA mostrado en EVE debido a su efecto en la modulación de la expresión de la lipoproteína lipasa (187).

#### **4.2.4. Genes que afectan a la terapia con inhibidores de la bomba de protones**

Los pacientes trasplantados son pacientes polimedicados en los que los IBP suelen estar presentes debido a la alta incidencia de ulceraciones gástricas y duodenales que pueden ocurrir durante la terapia inmunosupresora con ácido micofenólico o corticoides (hasta en un 39%) (188). Omeprazol es el principal IBP prescrito debido a su buena relación coste-efectividad. Se metaboliza principalmente a través del citocromo CYP2C19 y secundariamente por los CYP3A4. En pacientes con una enzima CYP2C19 no funcional, el metabolismo de omeprazol se desvía hacia el CYP3A4, produciendo una interacción competitiva con TAC y aumentando los niveles en sangre.

El CYP2C19 es codificado por el gen *CYP2C19* localizado en el cromosoma 10 en la posición 10q23.33, contando con 1473pb y 9 exones que codifican para 490 aminoácidos y 6 zonas de reconocimiento de sustrato. Se han descrito más de 30 variantes siendo el miembro más polimórfico de la familia CYP2C. Se expresa principalmente en hígado, pero también en intestino delgado en menor medida (189). Entre los SNPs más estudiados se encuentra el *CYP2C19\*2* (rs4244285) que resulta de un cambio de guanina (G) por adenina (A) en la posición 681 del gen (G681A, exón 5), produciendo un defecto de *splicing* y una disminución de la actividad enzimática. Por otro lado, el SNP *CYP2C19\*3* (rs4986893) supone un cambio de guanina (G) por adenina (A) en la posición 636 del gen (G636A, exón 4) resultado en un codón de finalización de la traducción (*stop*) y una proteína totalmente afuncional. No se encuentra en la población europea mientras que alcanza una frecuencia alélica de hasta el 8% en el este asiático. Estas dos variantes generan un fenotipo metabolizador lento o nulo. Por último, el SNP *CYP2C19\*17* (rs12248560) consiste en un cambio de citosina (C) por timina (T) en el promotor del gen (C-806T), que provoca la unión de proteínas nucleares específicas a la región flanqueante 5', produciendo una actividad enzimática aumentada y un fenotipo metabolizador ultrarrápido (190).

Se ha planteado que la presencia de alguno de estos polimorfismos en pacientes tratados con IBPs pueda producir una interacción con TAC a través del CYP3A4. En individuos con genotipo *CYP2C19\*2/\*2* y *CYP3A5\*3/\*3* (no-expresores), se ha observado un aumento de los niveles de TAC en sangre y efectos adversos relacionados a una sobreexposición(191). Sin embargo,

rabeprazol parece una alternativa más segura frente a otros IBPs ya que su metabolismo oxidativo es menos dependiente del CYP2C19 (192).

La Tabla 8 resume el fenotipo que ha sido asociado en la mayoría de los estudios llevados a cabo sobre las variantes mencionadas.

**Tabla 8. Resumen de los fenotipos asociados con mayor evidencia en la literatura a cada polimorfismo estudiado.**

<b>Variante</b>	<b>Alelo mutado</b>	<b>Fenotipo alelo mutado</b>
<i>CYP3A5*3</i>	G	No producción de enzima
<i>CYP3A4*1B</i>	G	Expresión enzimática aumentada
<i>CYP3A4*22</i>	T	Disminución de la actividad enzimática
<i>CYP3A4*20 (Ins A)</i>	Ins A	No producción de enzima
<i>CYP2C8*3.1</i>	G	Aumento o disminución del metabolismo dependiendo del sustrato
<i>CYP2C8*3.2</i>	A	
<i>ABCB1 (2677 G&gt;T/A)</i>	T/A	Menor expresión y actividad de la gp-p
<i>ABCB1 (1236 C&gt;T)</i>	T	
<i>ABCB1 (3435 C&gt;T)</i>	T	
<i>PXR (c.63396 C&gt;T)</i>	T	Actividad CYP3A4 y gp-p aumentada
<i>PXR (c.69789 A&gt;G)</i>	G	Actividad CYP3A4 y gp-p disminuida
<i>POR*28</i>	T	Mayor actividad de los CYPs
<i>CYP2C19*2</i>	A	Disminución de la actividad enzimática
<i>CYP2C19*3</i>	A	No producción de enzima
<i>CYP2C19*17</i>	T: 21,5%	Aumento de la actividad enzimática

En la Tabla 9 pueden observarse las frecuencias genotípicas y la frecuencia del alelo mutado en la población ibérica según la base de datos Ensembl.



Tabla 9. frecuencias alélicas en la población ibérica.

Variante	Wildtype/homocigoto no mutado	Heterocigoto	Homocigoto mutado	Alelo mutado
<b>CYP3A5*3</b>	AA: 0,9%	AG:13,1%	GG: 86%	G: 92,5%
<b>CYP3A4*1B</b>	AA: 94,4%	AG: 5,6%	GG: 0%	G: 2,8%
<b>CYP3A4*22</b>	CC: 92,5%	CT: 7,5%	TT: 0%	T: 3,7%
<b>CYP3A4*20 (Ins A)</b>	98,8%	1,2%	0	0,6
<b>CYP2C8*3.1</b>	GG: 72%	GA: 26,2%	AA: 1,9%	A: 15%
<b>CYP2C8*3.2</b>	AA: 72%	AG: 26,2%	GG: 1,9%	A: 15%
<b>POR*28</b>	CC: 50,5%	CT: 43%	TT: 6,5%	T: 28%
<b>ABCB1 (2677 G&gt;T/A)</b>	GG: 34,6%	GT: 49,5%	TT: 11,2%; GA: 3,7%	T: 36,4%, A: 2,3%
<b>ABCB1 (1236 C&gt;T)</b>	CC: 37,4%	CT: 49,5%	TT: 13,1%	T: 37,9%
<b>ABCB1 (3435 C&gt;T)</b>	CC: 29,9%	CT: 47,7%	TT: 22,4%	T: 46,3%
<b>PXR (c.63396 C&gt;T)</b>	CC: 15,9%	CT: 43,9%	TT: 40,2%	T: 62,1%
<b>PXR (c.69789 A&gt;G)</b>	AA: 40,2%	AG: 49,5%	GG: 10,3%	G: 35%
<b>CYP2C19*2</b>	GG: 71%	GA: 29%	AA: 0%	A: 14,5%
<b>CYP2C19*3</b>	GG: 100%	GA: 0%	AA: 0%	A: 0%
<b>CYP2C19*17</b>	CC: 60,7%	CT: 35,5%	TT: 3,7%	T: 21,5%

Datos obtenidos de ensembl.org (97)



# **JUSTIFICACIÓN**



## JUSTIFICACIÓN

El uso de inmunosupresores está ampliamente extendido para tratar diversas patologías en las que se requiere controlar la respuesta del sistema inmune. Asegurar la eficacia de la farmacoterapia inmunosupresora es especialmente importante cuando se compromete la vida del paciente, como supone el rechazo del injerto en pacientes con trasplante de órgano sólido, o la aparición de nuevos tumores y convulsiones que comprometen la calidad y esperanza de vida en el paciente con complejo de esclerosis tuberosa. Ambos casos requieren de un ajuste adecuado de la dosis de fármaco, ya que además de la eficacia, los efectos adversos asociados a estos tratamientos no son menospreciables: infecciones, neoplasias, nefrotoxicidad y alteraciones cardiovasculares, entre otros. A pesar de que en la práctica clínica se lleva a cabo la monitorización del fármaco inmunosupresor, tanto en tacrolimus como en everolimus, la incidencia de ineficacia y morbimortalidad del tratamiento crónico inmunosupresor sigue siendo relativamente frecuente.

La diferente respuesta encontrada entre individuos se puede deber a múltiples factores, entre los que se encuentra la genética. La presencia de ciertos polimorfismos en genes involucrados en la farmacocinética del fármaco - absorción, metabolización y transporte - parece dar explicación a gran parte de esta variabilidad, siendo en ocasiones clave en la respuesta terapéutica mientras que en otros casos no juega un papel decisivo o todavía no ha sido dilucidado.

La farmacogenética pretende ser una herramienta más para optimizar el ajuste de dosis y elección del fármaco adecuado, pero, además, dar explicación en aquellos casos resistentes a la farmacoterapia o con alta presencia de efectos adversos injustificados. En el campo de la inmunosupresión se han llevado a cabo numerosos estudios sobre estos polimorfismos, sin embargo; estos hallazgos no suelen ser llevados a la práctica clínica y queda mucho camino para poder establecer protocolos de actuación definidos en función del perfil genético del paciente. Cabe destacar que la optimización de la terapia se basa en los niveles sanguíneos de fármaco, mientras que la concentración en la diana terapéutica, en este caso el linfocito, no es tenida en cuenta siendo el verdadero marcador de efectividad. Los polimorfismos no solo afectan a la absorción y metabolización, sino que son un determinante de la concentración final del fármaco en la diana.

Por tanto, se propone el estudio individualizado de los factores relevantes que influyen sobre la respuesta terapéutica para poder optimizar y dar explicación a la efectos observados en cada paciente, destacando el papel de la farmacogenética en este campo.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

Dentro de los pacientes en tratamiento inmunosupresor con tacrolimus y everolimus existe gran variabilidad de respuesta que no puede ser explicada a través de las variables clínicas habituales. La farmacogenética es una herramienta con potencial de esclarecer y predecir esta variabilidad interindividual. En pacientes inmunodeprimidos, estos hechos pueden suponer el fracaso terapéutico o la predisposición a mayor morbimortalidad, por lo que su predicción es de especial importancia.

Teniendo en cuenta esto, la hipótesis de esta tesis es:

### **Hipótesis:**

Determinadas variantes genéticas de los pacientes que afectan a la metabolización y transporte de tacrolimus y everolimus pueden influir en la efectividad del tratamiento inmunosupresor y su seguridad.

### **El objetivo principal, por tanto:**

Evaluar la influencia de ciertos polimorfismos genéticos en la respuesta individual al tratamiento inmunosupresor con tacrolimus y everolimus, teniendo en cuenta su interacción con otros factores relacionados con el paciente.

### **Los objetivos específicos son:**

- 1) Determinar el efecto de variables demográficas y clínicas en la respuesta al tratamiento inmunosupresor en una cohorte de pacientes trasplantados en tratamiento con tacrolimus y de pacientes con complejo de esclerosis tuberosa en tratamiento con everolimus.
- 2) Valorar la influencia de tratamientos concomitantes en la interacción con tacrolimus y everolimus a nivel de inhibición, inducción o competición enzimática.
- 3) Identificar los polimorfismos más importantes implicados en el metabolismo y transporte de los fármacos inmunosupresores tacrolimus y everolimus.
- 4) Establecer una relación genotipo-fenotipo de los polimorfismos de los genes seleccionados (*CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *CYP2C19*, *ABCB1*, *POR* y *PXR*) en la farmacoterapia inmunosupresora de pacientes en tratamiento con tacrolimus y everolimus a nivel de efectividad y seguridad.



# **HYPOTHESIS AND OBJECTIVES**



## **HYPOTHESIS AND OBJECTIVES**

There is great variability in response among patients on immunosuppressive therapy with tacrolimus and everolimus that cannot be explained by the usual clinical variables. Pharmacogenetics is a tool with the potential to elucidate and predict this inter-individual variability. In immunocompromised patients, these facts may lead to therapeutic failure or predisposition to increased morbidity and mortality, so their prediction is of particular importance.

Considering the above, the hypothesis of this doctoral thesis is:

### **Hypothesis:**

Certain genetic variants in patients that affect tacrolimus and everolimus metabolism and transport may influence the efficacy and safety of immunosuppressive therapy.

**The main objective**, therefore is:

To evaluate the influence of certain genetic polymorphisms on individual response to immunosuppressive treatment with tacrolimus and everolimus, taking into account their interaction with other patient-related factors.

**The specific objectives** are:

- 1) To determine the effect of demographic and clinical variables on the response to immunosuppressive treatment in a cohort of transplant recipients treated with tacrolimus and patients with tuberous sclerosis complex treated with everolimus.
- 2) To assess the influence of concomitant treatments on the interaction with tacrolimus and everolimus at the level of inhibition, induction or enzyme competition.
- 3) To identify the most important polymorphisms involved in the metabolism and transport of the immunosuppressive drugs tacrolimus and everolimus.
- 4) To establish a genotype-phenotype relationship of the polymorphisms of the selected genes (*CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *CYP2C19*, *ABCB1*, *POR* and *PXR*) in the immunosuppressive pharmacotherapy of patients treated with tacrolimus and everolimus, at the level of effectiveness and safety.



# **METODOLOGÍA**

## **METODOLOGÍA**

Con los dos fármacos inmunosupresores se realizaron estudios de tipo observacional retrospectivo en los que se recopilaban variables clínicas y muestras biológicas sanguíneas de pacientes voluntarios.

### **3. TACROLIMUS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANO ALOPÁTICO**

#### **3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población de estudio reclutada fueron pacientes voluntarios con TOS alogénico en tratamiento con TAC en la comunidad autónoma de Aragón. Los pacientes fueron reclutados a través de dos vías y en dos momentos temporales diferentes:

- 1) Oficinas de farmacia. Fue la primera vía de reclutamiento. Se buscaron participantes a través de distintas oficinas de farmacia: farmacia Rosendo Concha Longás (Calle Unceta 63-65, Zaragoza), farmacia Miguel Alquezar Montañés (Calle Juan Pablo Bonet, 17, Zaragoza), farmacia Eduardo López Martínez (Calle Hernán Cortés, 17, Zaragoza), farmacia Rosario Langa (Avenida puerta Sancho, 10, Zaragoza) y farmacia Mariano Giménez (Calle Ramón y Cajal, 10, Teruel). Se reclutaron 16 pacientes con TOS de tipo renal, hepático, cardiaco, pulmonar y pancreático.
- 2) Asociación de Enfermos y Trasplantados Hepáticos de Aragón (AETHA). Fue la segunda vía de reclutamiento con fin de ampliar el número de pacientes para el estudio. Se trata de una asociación sin ánimo de lucro fundada en 1999 con sede en la Plaza de Nuestra Señora del Carmen, 1, de Zaragoza. El reclutamiento se hizo a través de la sede de la asociación. Se reclutaron 11 pacientes con TOS hepático o hepático + renal.

Los criterios de inclusión y exclusión fueron:

- **Criterios de inclusión:**
  - Ser paciente con TOS alogénico en tratamiento con TAC oral.
  - Pacientes voluntarios que hayan firmado el consentimiento informado.
- **Criterios de exclusión:**
  - No se determinaron criterios de exclusión.

#### **3.2. ASPÉCTOS ÉTICOS**

Tanto el estudio previo inicial como las ampliaciones posteriores recibieron la aprobación a nivel autonómico del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) (Anexo I). Todos los



pacientes o tutores legales firmaron un consentimiento escrito de que aceptaban participar en el estudio (Anexo II). En aquellos pacientes menores de edad (n=2), los tutores legales fueron los responsables de aceptar el estudio y firmar el consentimiento informado. Todos los pacientes y/o tutores legales recibieron explicaciones claras verbalmente y por escrito de los objetivos del estudio y el procedimiento a llevar a cabo. Los datos clínicos y muestras biológicas fueron codificadas de manera que solo los responsables del equipo investigador tenían acceso a la identificación personal de cada paciente. Todos los documentos fueron archivados para su seguridad y confidencialidad.

### **3.3. RECOGIDA DE VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS**

Los datos se recogieron a través de cuestionarios aprobados previamente por el CEICA. Las variables incluidas fueron:

- Variables demográficas: sexo, edad, peso y altura.
- Variables relacionadas con el TOS: tipo y fecha del trasplante, medicación inmediata tras trasplante y presencia de problemas relacionados con ella, histórico de rechazos y medicación que tomaba, antecedentes familiares de trasplante, otras patologías concomitantes, periodicidad de análisis médicos, parámetros analíticos alterados y otros datos relevantes.
- Variables relacionadas con el tratamiento farmacológico: fecha de inicio con TAC, posología de TAC, ajustes realizados en la dosis de TAC, rechazos, signos de rechazo del injerto u otros problemas relacionados desde que toma TAC, adherencia, actuación tras en caso de olvido de la toma de TAC, otros fármacos concomitantes para TOS u otras patologías, adherencia a fármacos concomitantes, actuación en caso de olvido de estos fármacos, reacciones adversas con alguno de los fármacos que toma, toma de suplementos, fitoterapia y otros.
- Variables analíticas: histórico de niveles de TAC en sangre ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), niveles de creatinina ( $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ ) y tasa de filtrado glomerular ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

\*No todos los pacientes aportaron las variables analíticas.

El modelo de cuestionario así como la información de los pacientes del estudio se recogen en el Anexo III y Anexo IV respectivamente.

## **4. EVEROLIMUS EN EL COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA**

### **4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población de estudio fueron pacientes pediátricos diagnosticados de CET en tratamiento con EVE. Al tratarse de una enfermedad rara con baja prevalencia, se reclutaron finalmente 10 pacientes de toda España. El contacto y recogida de datos se hizo en colaboración con el Servicio de Neuropediatría del hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, a través del Dr. José Luis Peña Segura y con la aprobación del jefe de Servicio. La Sociedad Española de Neuropediatría fue el medio de difusión para la captación de pacientes.

Los criterios de inclusión y exclusión fueron:

- **Criterios de inclusión:**

- Diagnóstico de CET por un especialista con confirmación genética.
- Tomar EVE en forma oral.
- Pacientes voluntarios que hayan firmado el consentimiento informado.
- Ser menor de 16 años.

- **Criterios de exclusión:**

- Coexistencia de otras enfermedades autoinmunes.
- Cotratamiento con otros inhibidores de mTOR.

### **4.2. ASPÉCTOS ÉTICOS**

El estudio recibió el dictamen favorable del CEICA (Anexo V). Todos los pacientes eran menores de edad por lo que sus tutores legales recibieron explicaciones claras verbalmente y/o por escrito de los objetivos del estudio y el procedimiento a llevar a cabo, y fueron los encargados de firmar el consentimiento informado (Anexo VI). Los datos clínicos y muestras biológicas fueron codificadas de manera que solo los responsables del equipo investigador tenían acceso a la identificación personal de cada paciente. Todos los documentos fueron archivados para su seguridad y confidencialidad.

Todos los tutores legales firmaron un consentimiento escrito de que aceptaban participar en el estudio.

### **4.3. RECOGIDA DE VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS**

Los datos se recogieron a través de cuestionarios aprobados previamente por el CEICA. Las variables incluidas fueron:

- Variables demográficas: sexo, edad, peso y altura.
- Variables relacionadas con CET: manifestaciones clínicas de CET y afección para la que se pauto EVE (RAML, SEGA, epilepsia, otros).
- Variables relacionadas con el tratamiento farmacológico: posología EVE, inicio toma EVE, adherencia EVE y actuación en caso de olvido de la toma, tratamiento farmacológico anterior a EVE, medicación actual concomitante, mejoría (si/no) con la toma de EVE, presencia de EEAA relacionados con EVE, controles médicos rutinarios y otros datos relevantes.

El modelo de cuestionario así como la información de los pacientes del estudio se recogen en el Anexo VII y Anexo VIII respectivamente.

## 5. GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS SELECCIONADOS

El análisis farmacogenético de los polimorfismos seleccionados que son comunes en el estudio de TAC y el estudio de EVE se hizo a través de la misma metodología.

### 5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras biológicas obtenidas para la extracción de ADN fueron de sangre venosa periférica. La toma de muestra se hizo de forma aséptica a través de punción capilar con lanceta en el dedo índice. Una o dos gotas de sangre fueron depositadas de forma individual en una tarjeta *Whatman FTA™* codificada, dejándolas secar durante 20 minutos. Se trata de unas tarjetas de celulosa con sustancias químicas que permiten la lisis celular, desnaturalización de proteínas y protección de ácidos nucleicos frente a nucleasas de la muestra depositada, de modo que permiten el almacenamiento a temperatura ambiente y a largo plazo de muestras de ADN. Posteriormente, se extrajo el ADN de cada una de las tarjetas *Whatman FTA™* mediante incubación con resina Chelex®100 al 5% (193). El DNA de la muestra se obtiene en el sobrenadante tras centrifugación a 13.200 rpm durante 3 minutos. Las muestras obtenidas se conservaron en congelación a -20°C hasta su posterior análisis.

### 5.2. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS SELECCIONADOS

Para la selección de los polimorfismos a analizar en ambos estudios, se hizo una revisión exhaustiva en diferentes bases de datos. Se revisaron variantes genéticas relacionadas con la farmacocinética de ambos fármacos. Finalmente, se seleccionaron 15 polimorfismos de genes codificantes para enzimas metabolizadoras (*CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*), proteína transportadora (*ABCB1*), factor de transcripción (*PXR*) y oxidorreductasa del citocromo P450 (*POR*). Ambos fármacos compartían la mayoría de las rutas metabólicas y transporte, por lo que la mayor parte de las variantes seleccionadas fueron comunes para ambos estudios. La razón de la selección de dichos polimorfismos fue por su potencial utilidad en la práctica clínica y/o por la existencia de resultados controvertidos con el fin de aumentar la evidencia al respecto. Los polimorfismos analizados para cada uno de los estudios fueron:

- Polimorfismos comunes a ambos fármacos, TAC y EVE: *CYP3A5\*3* (rs776746), *CYP3A4\*1B* (rs2740574), *CYP3A4\*22* (rs35599367), *CYP3A4\*20* (rs67666821), *ABCB1* (rs1045642), *ABCB1* (rs2032582), *ABCB1* (rs1128503), *PXR* (rs2472677) y *PXR* (rs7643645).
- Polimorfismos analizados solo en el estudio de TAC: *POR\*28* (rs1057868), *CYP2C19\*2* (rs4244285), *CYP2C19\*3* (rs4986893) y *CYP2C19\*17* (rs12248560).

\*Las variantes del gen *CYP2C19* se analizaron por ser el principal gen metabolizador de omeprazol, con la intención de buscar posibles interacciones entre este y TAC.

- Polimorfismos analizados solo en el estudio de EVE: *CYP2C8*\*3 (rs11572080), *CYP2C8* (rs10509681).

Se utilizaron distintas metodologías para el análisis del genotipo, todas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*).

Para la mayoría de las variantes, se hizo una doble comprobación analizando el resultado por dos metodologías diferentes. La (Tabla 10) muestra la/s metodología/s utilizada para cada una de las variantes en ambos estudios:

**Tabla 10. Metodología/s utilizadas para el genotipado de cada uno de los polimorfismos.**

Gen	Proteína que codifica	Variante	Técnica/s de análisis	Ref.
<b>CYP3A5</b> (NM_000777.5)	Citocromo P450 3A5	c.6986 A>G (rs776746)	Secuenciación y RT-PCR (rhAmp™ SNP®)	(194)
<b>CYP3A4</b> (NM_001202855.3)	Citocromo P450 3A4	g.-290A>G (rs2740574)	Secuenciación y RT-PCR (rhAmp™ SNP®)	(195)
<b>CYP3A4</b> (NM_001202855.3)	Citocromo P450 3A4	c.15389 G>T (rs35599367)	RT-PCR (sondas TaqMan®)	
<b>CYP3A4</b> (NM_001202855.3)	Citocromo P450 3A4	c.1461_1462, insA (rs67666821)	Secuenciación	(196)
<b>CYP2C8</b> (NM_000770.2)	Citocromo P450 2C8	c.416G>A (rs11572080)	PCR-RFLP	(197)
<b>CYP2C8</b> (NM_000770.2)	Citocromo P450 2C8	c.1196A>G (rs10509681)	PCR-RFLP	(198)
<b>POR</b> (NM_000941.3)	Oxidoreductasa del CYP450	c.1508 C>T (rs1057868)	Secuenciación y RT-PCR (rhAmp™ SNP®)	
<b>ABCB1</b> (NM_000927.3)	Glicoproteína-p	c.3435 C>T (rs1045642)	PCR-RFLP y RT-PCR (rhAmp™ SNP®)	(199)
<b>ABCB1</b> (NM_000927.3)	Glicoproteína-p	c.1236 C>T (rs1128503)	PCR-RFLP y RT-PCR (rhAmp™ SNP®)	(200)
<b>ABCB1</b> (NM_000927.3)	Glicoproteína-p	c.2677 G>T (rs2032582)	PCR-RFLP y RT-PCR (sondas TaqMan®)	(201)

<b>PXR</b> <b>(NM_022002.2)</b>	Reptor X de pregnano	c.69789 A>G (rs7643645)	PCR-RFLP y (rhAmp™ SNP®)	RT-PCR	(202)
<b>PXR</b> <b>(NM_022002.2)</b>	Reptor X de pregnano	c.63396 C>T (rs2472677)	PCR-RFLP		(203)
<b>CYP2C19</b> <b>(NM_000769.4)</b>	Citocromo P450 2C19	c.681 G>A (rs4244285)	PCR-RFLP y (rhAmp™ SNP®)	RT-PCR	(204)
<b>CYP2C19</b> <b>(NM_000769.4)</b>	Citocromo P450 2C19	c.636 G>A (rs4986893)	PCR-RFLP		(205)
<b>CYP2C19</b> <b>(NM_000769.4)</b>	Citocromo P450 2C19	c.-80C>T (rs12248560)	PCR-RFLP y (sondas TaqMan®)	RT-PCR	(206)

RT-PCR: Real Time-Polymerase Chain Reaction; PCR-RFLP: Restriction Fragment Length

A continuación, se describe cada una de las metodologías mencionadas

### 5.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction.

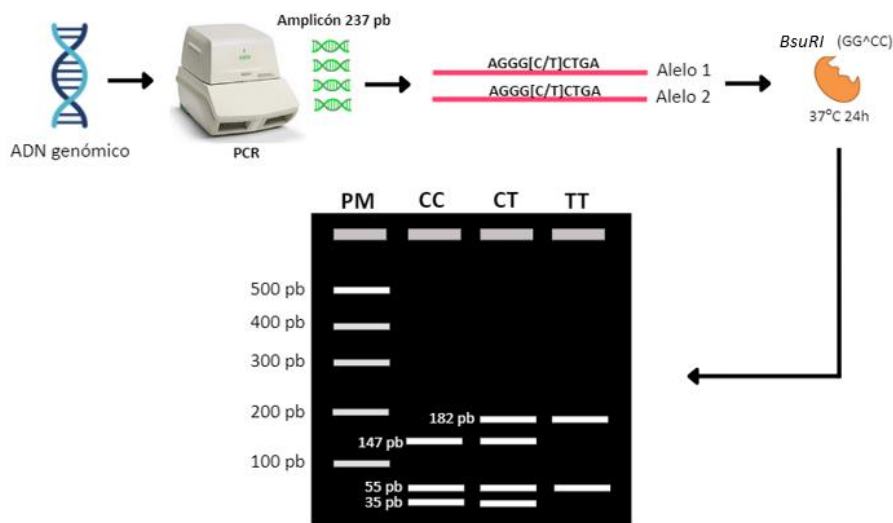
Mediante la metodología de *Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction* (RFLP-PCR, traducido del inglés reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) se genotiparon los polimorfismos *CYP2C8* (rs11572080), *CYP2C8* (rsrs10509681), *ABCB1* (rs1045642), *ABCB1* (rs1128503), *ABCB1* (rs2032582), *PXR* (rs7643645), *PXR* (rs2472677), *CYP2C19* (rs4244285), *CYP2C19* (rs4986893), *CYP2C19* (rs12248560). El análisis se hizo a través de la amplificación de la región de ADN que contiene el polimorfismo (amplicón). Para realizar la reacción de PCR se utilizaron los siguientes reactivos: 250µM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 500nM de cada *primer* o cebador específicos para cada gen), 2mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 1X de *buffer* o tampón y 0,5U de DNA polimerasa (*BIOTAQ™ DNA Polymerase, BIOLINE®*). La concentración de cada uno de los reactivos varió según las condiciones óptimas para la obtención de cada amplicón. Además, se añadieron 1,5µL del DNA aislado previa centrifugación, y agua bidestilada hasta un volumen final de 15µL por muestra. La reacción de PCR se hizo en los termocicladores *PTC100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc®)* y *MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD®)*. Los ciclos de temperatura del termociclador variaron en función del polimorfismo a analizar (Tabla 11).

Se cargó cada producto de PCR en gel de agarosa al 1,5% teñido con *GelRed™ (Biotium®)* junto con el marcador de peso molecular *DNA Molecular Weight Marker XIV -100 Base Pair Ladder (Roche®)* para comprobar que correspondía a la banda esperada, que no mostraba contaminación ni amplificaciones inespecíficas. El gel se sometió a electroforesis para la

separación de bandas con el equipo *Power Pac™ Basic (BIO-RAD®)* y los resultados se visualizaron en el equipo de documentación de geles *Gel Doc™ EZ Imager (BIO-RAD®)*.

Posteriormente, para discernir entre el alelo *wildtype* (o silvestre) y el alelo mutado se incubaron los productos de PCR con endonucleasas de restricción específicas a 37°C durante 24h. Dependiendo del SNP, la endonucleasa seleccionada cortaba para el alelo *wildtype* o para la mutación. Se visualizaron los resultados finales en gel de agarosa al 1,5-2% teñido con *GelRed™ (Biotium®)*, el cual se sometió a electroforesis y visualización como en el paso anterior (Tabla 11).

A modo de ejemplo se muestran las posibilidades de resultados obtenidos para el análisis del polimorfismo rs1128503 del gen *ABCB1* tras la incubación con la enzima de restricción *BsuRI*:



**Figura 18. Patrones de bandas posibles para el SNP rs1128503 obtenido por RFLP-PCR mediante digestión con la endonucleasa *BsuRI*.** Calle 1: marcador de peso molecular (PM) XIV de Roche®; calle 2: resultado para genotipo *wildtype*; calle 3: resultado para genotipo heterocigoto; calle 4: resultado para genotipo homocigoto mutado.

En este caso la endonucleasa *BsuRI* reconoce el patrón GG^CC, por lo que el corte se produce cuando está presente el alelo *wildtype* o silvestre.

**Tabla 11. Primers, condiciones del termociclador y endonucleasas de restricción utilizados para cada uno de los polimorfismos analizados por PCR-RFLP.**

Gen	Variante	Primers	Condiciones termociclador	Enzima	Ref.
<b>CYP2C8</b> <b>(NM_000770.2)</b>	rs11572080	F:5'-AGGCAATCCCCAATATCTC-3' R:5'-CAGGATGCGCAATGAAGAC-3'	94°C 3' (94°C 30'', 55°C 30'', 72°C 30'') x 30 72°C 5'	<i>BseR</i>	(197)
<b>CYP2C8</b> <b>(NM_000770.2)</b>	rs10509681	F:5'-CTTCCGTGCTACATGATGAC-3' R:5'-CTGCTGAGAAAGGCATGAAG-3'	94°C 3' (94°C 20'', 55°C 10'', 72°C 10'') x 38 72°C 5'	<i>XmnI</i>	(198)
<b>ABCB1</b> <b>(NM_000927.3)</b>	rs1045642	F:5'-GATCTGTGAACTCTTGT-3' R:5'-GAAGAGAGACTTACATTAGGC-3'	94°C 10' (94°C 30'', 55°C 40'', 72°C 40'') x 29 72°C 10'	<i>MboI</i>	(200)
<b>ABCB1</b> <b>(NM_000927.3)</b>	rs1128503	F:5'-TTGAATGAAGAGTTTCTGATGTTT-3' R:5'-CTCTGCATCAGCTGGACTGT-3'	94°C 5' (94°C 50'', 64°C 45'', 72°C 50'') x 35 72°C 5'	<i>BsuRI</i>	(201)
<b>ABCB1</b> <b>(NM_000927.3)</b>	rs2032582	F:5'-TGCAGGCTATAGTTCCAGG-3' R:5'-TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG-3'	94°C 5' (94°C 30'', 60°C 30'', 72°C 45'') x 35 72°C 5'	<i>BanI</i>	(202)
<b>PXR</b> <b>(NM_022002.2)</b>	rs7643645	F:5'-CACCATGCTTAGCTACAGCTCTATT-3' R:5'-GGCAAGATCACAACATGGGAAGA-3'	94°C 5' (94°C 30'', 60°C 30'', 72°C 45'') x 35 72°C 5'	<i>BstDSI</i>	(203)
<b>PXR</b> <b>(NM_022002.2)</b>	rs2472677	F:5'-TGCTAGCAGTGCATAAGGGCTCAG-3' R:5'-TCCTGACCTTAGGTGATCCATGCC-3'	94°C 3' (94°C 15'', 60°C 15'', 72°C 30'') x 35 72°C 5'	<i>Hpy188I</i>	(204)
<b>CYP2C19</b> <b>(NM_000769.4)</b>	rs4244285	F:5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3' R:5'-TATCACTTTCATAAAAGCAAG-3'	94°C 10' (94°C 30'', 61°C 40'', 72°C 40'') x 35 72°C 10'	<i>SmaI</i>	(205)
<b>CYP2C19</b> <b>(NM_000769.4)</b>	rs4986893	F:5'-AAATTGTTTCCAATCATTAGCT-3' R:5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3'	94°C 10' (94°C 20'', 58°C 30'', 72°C 20'') x 36 72°C 6'	<i>BamHI</i>	(140)
<b>CYP2C19</b> <b>(NM_000769.4)</b>	rs12248560	F:5'-GCCCTTAGCACCAAATTCTC-3' R:5'-ATTTAACCCCTAAAAAACACG-3'	94°C 1' (94°C 30'', 50°C 30'', 72°C 30'') x 35 72°C 7'	<i>NsiI</i>	(206)

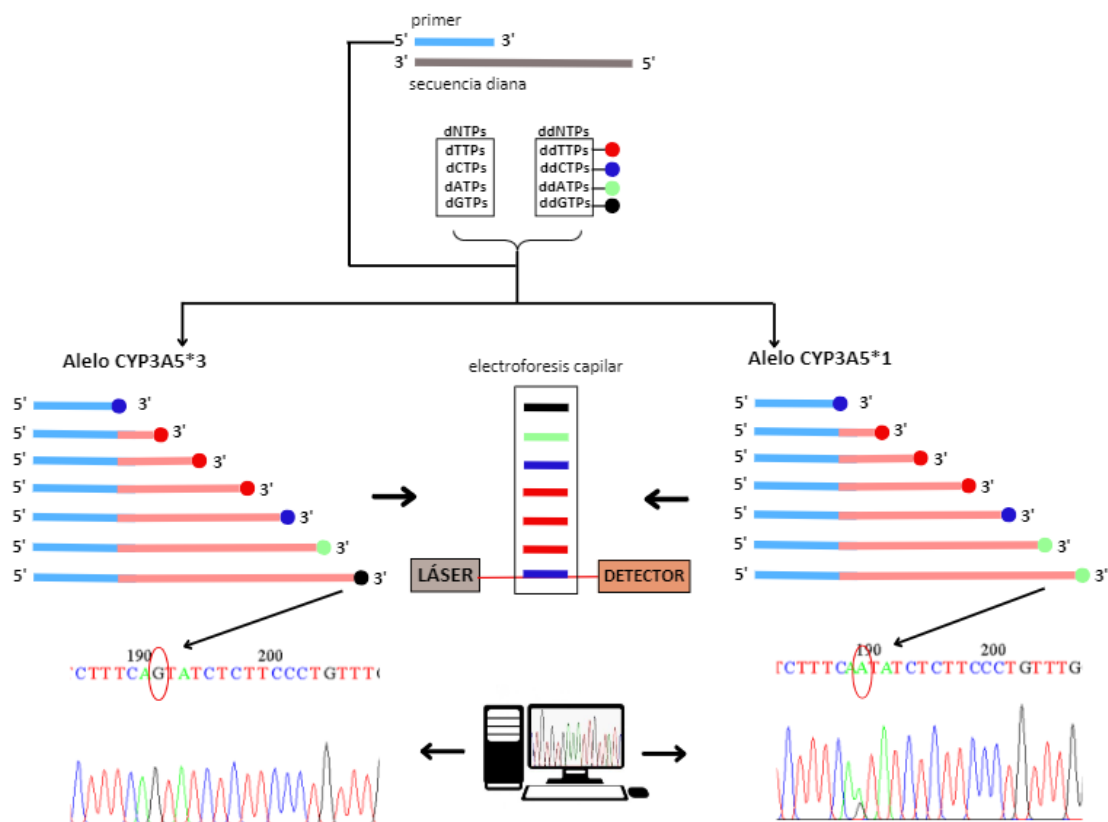
En todos los casos se hizo el análisis por duplicado, contando con un control positivo (idealmente heterocigoto), y uno negativo (ausencia de ADN).



### 5.2.2. Secuenciación Sanger

Mediante la metodología de secuenciación *Sanger* se genotiparon los polimorfismos *CYP3A5* (rs7767469), *CYP3A4* (rs2740574) *CYP3A4* (rs67666821) y *POR* (rs1057868). Esta metodología permite una lectura de la secuencia nucleotídica de la cadena secuenciada. Se basa en el uso de dideoxynucleótidos marcados con fluoróforos como terminadores de la reacción en cadena de la polimerasa, de modo que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles con una diferencia de 1 pb entre ellos. Los fragmentos amplificados se separan mediante electroforesis capilar. La cadena secuenciada en cada caso fue un amplicón que contenía el polimorfismo, obtenido previamente mediante PCR. Dichos amplicones fueron comprobados mediante gel de agarosa al 1,5% teñido con *GelRed™* (*Biotium®*) y sometido a electroforesis (equipo *Power Pac™ Basic* (*BIO-RAD®*)) y posterior visualización (equipo de documentación de geles *Gel Doc™ EZ Imager* (*BIO-RAD®*)) para comprobar que no mostraba contaminación ni amplificaciones inespecíficas. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por Macrogen (Madrid, Spain).

La siguiente imagen muestra a modo de ejemplo el esquema de la metodología de secuenciación *Sanger*, y los resultados obtenidos para cada uno de los alelos del *CYP3A5* (rs7767469):



**Figura 19. Metodología de secuenciación Sanger.** Izquierda: resultados para alelo *CYP3A5\*3* (mutado); derecha: resultados para alelo *CYP3A5\*1* (wildtype).

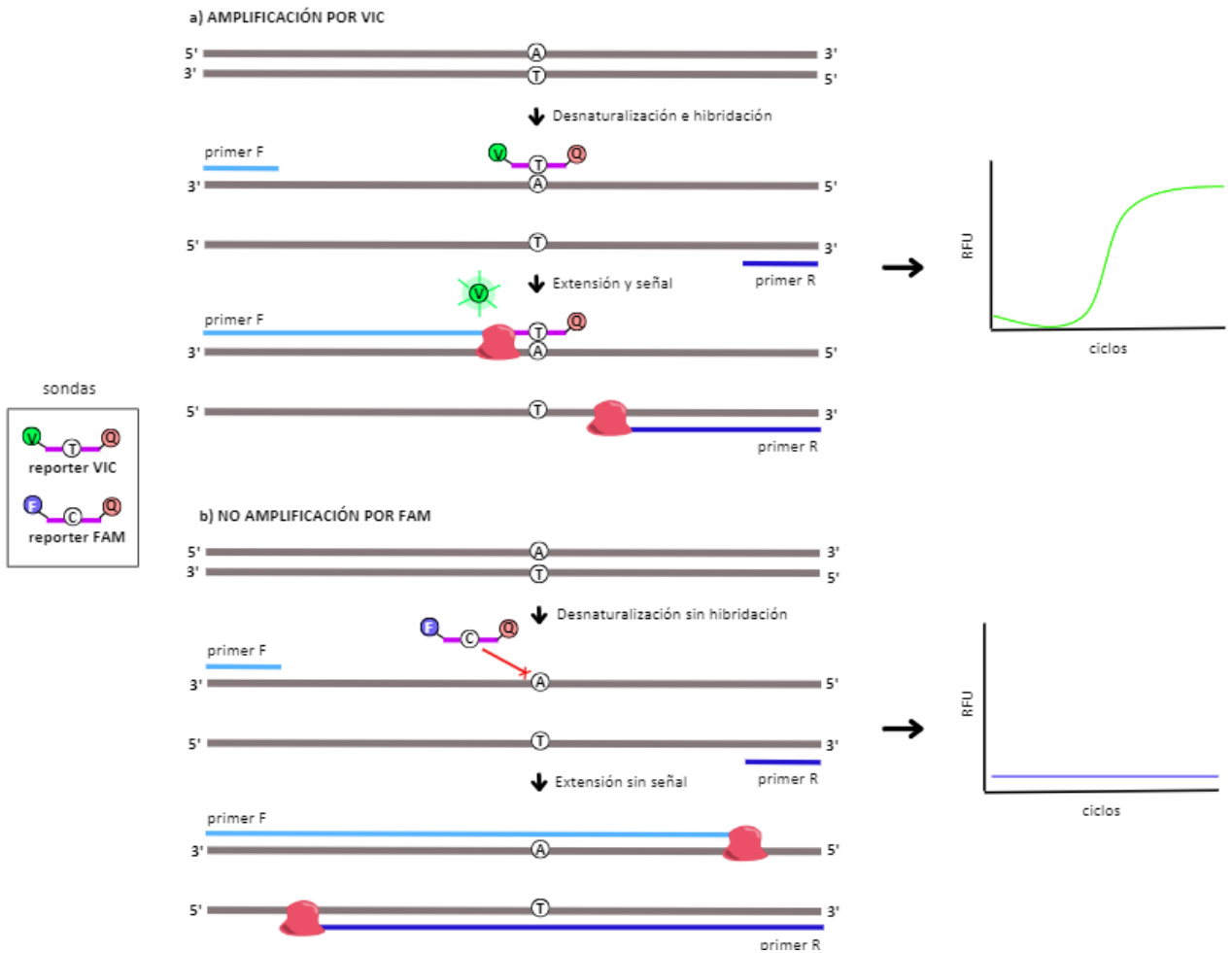
Para la amplificación previa mediante PCR del fragmento que contenía el polimorfismo se utilizaron *primers* específicos que se muestran en la Tabla 12:

**TABLA 12. *Primers* utilizados para la amplificación previa por PCR del fragmento a secuenciar para cada polimorfismo analizado por secuenciación *Sanger*.**

Gen	Variante	<i>Primers</i>	Condiciones termociclador	Ref.
<b>CYP3A5</b> <b>(NM_000777.5)</b>	rs776746	F:5'-ACTGCCCTTG CAGCATTAG-3' R:5'-CCAGGAAGCCAGACTTTGAT-3'	94°C 3' (94°C 30'', 62°C 30'', 72°C 30'') x 35 72°C 7'	(195)
<b>CYP3A4</b> <b>(NM_001202855.3)</b>	rs2740574	F:5'-CAGAAGGGATGACATGCAGA-3' F:5'-GGAAGAGGCTTCTCCACCTT-3'	95°C 10' (95°C 345'', 60°C 45'', 72°C 60'') x 35 72°C 7'	(196)
<b>CYP3A4</b> <b>(NM_001202855.3)</b>	rs67666821	F:5'-GAAGGAGTGTCTCACTCA-3' R:5'-GAGGTCTCTGGTGTCTCAG-3'	94°C 10' (94°C 30'', 52°C 30'', 72°C 90'') x 35 72°C 5'	(199)
<b>POR</b> <b>(NM_000941.3)</b>	rs1057868	F:5'-CATCTGTGCGGTGTTGT-3' R:5'-TGAAGGGCAGGCGGA-3'	94°C 6' (94°C 29'', 59°C 20'', 72°C 29'') x 35 72°C 6'	

### 5.2.3. TaqMan® SNP Genotyping Assay

Mediante la metodología de RT-PCR con sondas *TaqMan® SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU*) se genotiparon los polimorfismos *CYP3A4* (rs35599367), *ABCB1* (rs2032582) y *CYP2C19* (rs1045642). La siguiente imagen muestra el funcionamiento de este método:



**Figura 20. Metodología TaqMan® SNP Genotyping Assay, discriminación entre alelo VIC y FAM.** Primer F: forward; primer R: reverse. Imagen adaptada de (207). a) hibridación de sonda con alelo complementario y emisión de fluorescencia; b) no hibridación de sonda y no emisión de fluorescencia.

Como muestra la Figura 20, en la primera fase se realiza la desnaturalización y separación de las hebras y seguidamente la hibridación de los *primers* (F y R) y las sondas (FAM y/o VIC). Las sondas discriminan entre alelos, siendo una complementaria al alelo *wildtype* y otra al alelo mutado. La asociación de cada sonda al alelo *wildtype* o mutado depende del ensayo. Cada una de las sondas posee un fluoróforo notificador (*reporter*) en su extremo 5' y un *quencher* (Q) en su extremo 3'. Mientras *quencher* y *reporter* están próximos, el primero bloquea la emisión de fluorescencia del segundo. En el caso de que la sonda sea complementaria a la hebra y haya habido hibridación, durante la fase de extensión (Figura 20 a) la Taq Polimerasa provocará la separación de *reporter* y *quencher* por su actividad exonucleasa 5'-3', generando fluorescencia equivalente al color del *reporter*. A medida que avanzan los ciclos, la cantidad de moléculas de ADN amplificadas aumenta exponencialmente y la fluorescencia es detectada a tiempo real por el equipo.

Los reactivos comerciales *TaqMan*<sup>®</sup> *SNP Genotyping Assay* de *Applied Biosystems* incluyen las sondas y *primers* prediseñados para cada SNP, y adicionalmente la Taq Polimerasa *TaqMan Universal PCR Master Mix*. A cada reacción se le añadieron los reactivos comerciales en las cantidades indicadas por el fabricante, 3 µL de DNA y agua bidestilada hasta un volumen final de 10 µL.

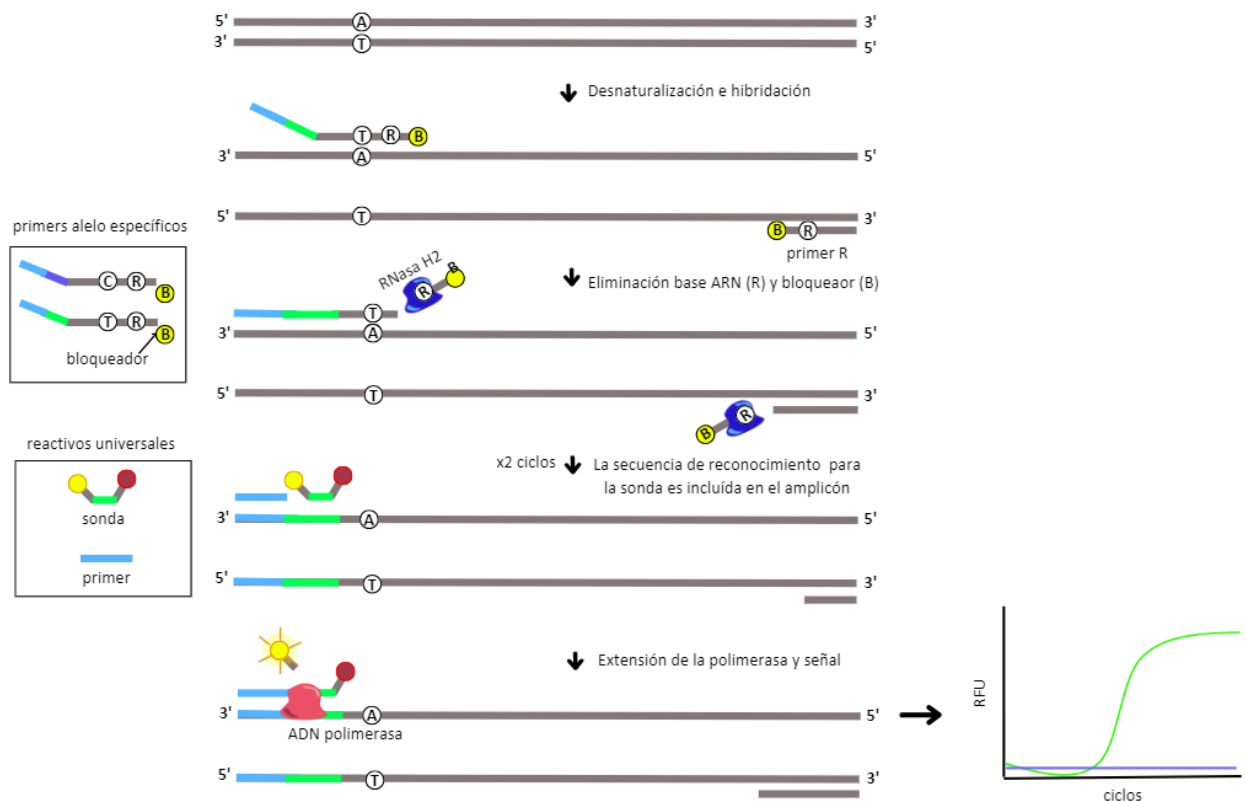
La RT-PCR se realizó en el equipo *CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad*<sup>®</sup>) bajo las siguientes condiciones: activación enzimática a 95°C 10', (desnaturalización a 92°C 15'', hibridación a 59°C 60'', extensión a 68°C 20'') x 50 ciclos. Se utilizaron los fluoróforos FAM<sup>®</sup> (azul) y VIC<sup>®</sup> (verde). En todos los casos se hizo el análisis por duplicado, contando con un control positivo (idealmente heterocigoto), y uno negativo (ausencia de ADN). La siguiente tabla muestra la correspondencia de cada fluoróforo con el alelo que amplifica en los ensayos realizados:

**TABLA 13. Sondas TaqMan<sup>®</sup> empleadas y correspondencia de fluoróforos con cada alelo.**

GEN	VARIANTE	ID ENSAYO	FLUORÓFORO
<i>CYP3A4</i> (NM_001202855.3)	rs35599367	C_59013445_10	FAM alelo *22 (mutado) VIC alelo *1
<i>ABCB1</i> (NM_000927.3)	rs2032582	C_11711720D_40	FAM alelo T (mutado) VIC alelo G
<i>CYP2C19</i> (NM_000769.4)	rs1045642	C_469857_10	FAM alelo *17 (mutado) VIC alelo*1

#### 5.2.4. rhAmp<sup>™</sup> SNP Genotyping System

Mediante la metodología de *rhAmp SNP Genotyping System (IDT, Coralville, IA, USA)* se genotiparon los polimorfismos *CYP3A5* (rs776746), *CYP3A4* (rs2740574), *POR\*28* (rs1057868), *ABCB1* (rs1045642), *ABCB1* (rs1128503), *PXR* (rs7643645), *CYP2C19* (rs4244285). RhAmp<sup>™</sup> se basa en la utilización de *primers* alelo específicos con un grupo bloqueador en el extremo 3' y un único nucleótido de RNA que deben ser eliminados por la enzima Rnasa H2 para que pueda producirse la extensión de la cadena por la ADN polimerasa. Los bloqueadores permiten aumentar la especificidad de la reacción comparado con la PCR convencional. La siguiente imagen muestra el funcionamiento de este método:



**Figura 21. Metodología rhAmp™ SNP Genotyping System mediante discriminación alélica.** Imagen adaptada de (208).

Como se muestra en la imagen, tras la desnaturalización, el primer alelo específico hibrida con la secuencia complementaria de la cadena. Este primer contiene un grupo bloqueador en el extremo 3' (B), y una base nucleotídica de ARN (R). La enzima RNasa H2 se une a los *primers* que han hibridado, eliminando la base de ARN y el grupo bloqueador, lo que permite posteriormente la extensión de la ADN polimerasa. Durante los dos primeros ciclos de amplificación, se incorpora una secuencia de reconocimiento (cola verde) en el amplicón, que continúa presente el resto de ciclos. Esta secuencia es reconocida por un sistema de sondas universales que contienen un *reporter* (fluorescencia) y un *quencher* (inhibidor de fluorescencia). Una vez unidas las sondas, la amplificación de la cadena por la ADN polimerasa conduce a la degradación de estas y generación de señal fluorescente en la longitud de onda del *reporter* correspondiente a las sondas que hayan reconocido por complementariedad de bases un alelo y/o el otro en cada individuo. El sistema detecta la fluorescencia a tiempo real.

Los reactivos comerciales contienen una *rhAmp™ Genotyping Master Mix 2X* (con RNasa H2 y ADN *Taq* polimerasa), *rhAmp™ Reporter Mix 40X* (incluye sondas y primer) y los *primers* alelo específicos *rhAmp™ SNP Assay 20X*. Para cada reacción se incluyeron una combinación de Master Mix y Reporter Mix en un ratio 20:1, 2µL de ADN y agua bidestilada hasta un volumen final de 5µL.

La RT-PCR se realizó en el equipo *CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®)* bajo las siguientes condiciones: activación enzimática a 95°C 10', (desnaturalización a 92°C 10'', hibridación a 60°C 30'', extensión a 68°C 20'')x 40 ciclos. Se utilizaron los fluoróforos FAM® (azul) y *Yakima Tinte Yellow®* (YAK®, amarillo). YAK® tiene una longitud de onda de excitación y emisión similar a VIC® por lo que se detectó la fluorescencia a través de ese canal, generando una señal verde.

En todos los casos se hizo el análisis por duplicado, contando con un control positivo (idealmente heterocigoto), y uno negativo (ausencia de ADN). La siguiente tabla muestra la correspondencia de cada fluoróforo con el alelo que amplifica en los ensayos realizados:

**Tabla 14. Ensayo rhAmp® empleado y correspondencia de fluoróforos con cada alelo.**

<b>Gen</b>	<b>Variante</b>	<b>ID ensayo</b>	<b>Fluoróforo</b>
<b>CYP3A5 (NM_000777.5)</b>	rs776746	Hs.ADME.rs776746.C.1	FAM: A (*1) VIC: G (*3)
<b>CYP3A4 (NM_001202855.3)</b>	rs2740574	N/A	FAM: G (*1B) VIC: A (*1)
<b>POR (NM_000941.3)</b>	rs1057868	Hs.GT.rs1057868.T.1	FAM: C VIC: T
<b>ABCB1 (NM_000927.3)</b>	rs1045642	Hs.ADME.rs1045642.T.1	FAM: T VIC: C
<b>ABCB1 (NM_000927.3)</b>	rs1128503	Hs.ADME.rs1128503.G.11	FAM: T VIC: C
<b>PXR (NM_022002.2)</b>	rs7643645	Hs.GT.rs7643645.G.a1	FAM: A VIC: G
<b>CYP2C19 (NM_000769.4)</b>	rs4244285	Hs.ADME.rs4244285.A.1	FAM: G VIC: A

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®)* version 25 (IBM®, Armonk, NY, USA).

Se calcularon las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas de la población de estudio para realizar el análisis descriptivo. Se realizaron los cálculos para presunción de dos alelos existentes por locus, que generan tres genotipos posibles:

- Frecuencia del alelo p (A)=  $A/2n$
- Frecuencia del alelo q (a)=  $a/2n$
- Frecuencia genotipo  $p^2$  (AA)=  $AA/n$
- Frecuencia genotipo  $2pq$  (Aa)=  $Aa/n$
- Frecuencia genotipo  $q^2$  (aa)=  $aa/n$

Siendo “n” el número de individuos del estudio.

El equilibrio de Hardy-Weinberg postula que en una población lo suficientemente grande donde los apareamientos se producen al azar y no está sometida a fenómenos de mutación, selección o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes una vez alcanzado el equilibrio (209). El no cumplimiento de este equilibrio puede indicar sesgos que afecten a la veracidad de los resultados, tales como errores en el genotipado. Se calcularon las desviaciones de este equilibrio para cada uno de los polimorfismos genotipados mediante la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$  con test exacto de Fisher), siendo un resultado de  $p > 0,05$  indicador de cumplimiento del equilibrio. El valor p indica la probabilidad de que un valor estadístico calculado sea posible dada una hipótesis nula cierta.

Así mismo, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en la población de estudio con las presentes en la población ibérica mediante la prueba  $\chi^2$ . Las frecuencias de la población Española se obtuvieron de la base de datos Ensemble (97).

Por otro lado, se realizó el análisis de asociación entre los alelos/genotipos y las variables clínicas recogidas de los pacientes. Se analizaron los datos a través de pruebas no paramétricas. Las variables categóricas se expresaron como frecuencias y las variables continuas como la media (desviación estandar (DE)), y mediana (rango intercuartílico (IQR)). Los genotipos de los pacientes se trataron como variables policotómicas categóricas e independientes. Los datos nominales fueron analizados por el Test exacto de Fisher (si 2 grupos independientes) o  $\chi^2$  (si  $\geq 3$  grupos independientes). Los datos ordinales y numéricos fueron analizados por el test U de Mann-Whitney (si 2 grupos independientes) o el test H de Kruskal-Wallis (si  $\geq 3$  grupos

independientes). La correlación entre variables numéricas se hizo a través del coeficiente de relación de Spearman. La significancia estadística se aceptó con un nivel de significación del 5% ( $p < 0,05$ ).



# **RESULTADOS**



## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los estudios de TAC y EVE para el tratamiento de TOS y CET respectivamente se describen detalladamente y por separado. Para ambos estudios se desglosa el análisis descriptivo de los datos recogidos, el análisis inferencial realizado entre las variables de interés así como los resultados farmacogenéticos obtenidos.

### 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO CON TACROLIMUS

A continuación, se detalla cada uno de los apartados para el análisis realizado sobre los resultados obtenidos en el estudio de TAC.

#### 1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Veintisiete pacientes con TOS alogénico en tratamiento con TAC fueron finalmente reclutados para el estudio a través de distintas oficinas de farmacia y la Asociación de Trasplantados Hepáticos de Aragón (AETHA). Todos los pacientes menos dos aportaron datos de peso y altura. Se recogió la adherencia al tratamiento, donde cinco pacientes refirieron olvidar muy puntualmente la toma de la medicación (TAC). Todos los pacientes menos uno indicaron la presencia de efectos adversos relacionados con la terapia. Nueve pacientes aportaron datos de niveles en sangre de TAC. La Tabla 15 resume las características demográficas de los pacientes del estudio.

Tabla 15. Datos demográficos de la población de estudio de tacrolimus.

<b>Edad (años) (n=26)</b>		43,71 (25,03); 42 (55)
<b>Género (n=27)</b>	Hombre	10 (37)
	Mujer	17 (63)
<b>Peso (kg) (n=25)</b>		61,64 (17,06); 55 (32,5)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) (n=25)</b>		22,53 (4,25); 21,10 (7,48)
<b>Antecedentes trasplante (n=27)</b>		2 (7,4)
<b>Tipo de trasplante (n=27)</b>	Renal	9 (33,3)
	Hepático	15 (55,6)
	Cardiaco	2 (7,4)
	Pulmonar	1 (3,7)
<b>Más de 1 año post-trasplante (n=27)</b>		26 (96,3)
<b>Casos signo de rechazo (n=27)</b>	Agudo	5 (18,5)
	Crónico	5 (18,5)
	General	9 (33,3)
<b>Casos retrasplante (n=27)</b>		2 (7,4)

Los datos se presentan como media (DE); mediana (IQR) para variables continuas, o n (%) para variables categóricas.

Dos pacientes eran menores de edad, con 13 y 15 años, para los cuales se calculó el percentil para la edad y sexo en lugar del IMC.

Solo había un caso (3,7%) con un obesidad) encontrándose 15 casos (55,5%) con normopeso y ninguno con infrapeso.

La Tabla 16 resume las variables relacionadas con el tratamiento de TAC y otros tratamientos inmunosupresores concomitantes, así como aquellos pautados por patologías o EEAA frecuentes en la toma de inmunosupresores.

**Tabla 16. Variables relacionadas con el tratamiento con tacrolimus.**

<b>Dosis total diaria (mg)</b>	3,90 (2,16); 4 (2,6)	
<b>Dosis/peso (mg·kg<sup>-1</sup>) (n=25)</b>	0,035 (0,034); 0,067 (0,045)	
<b>Co (ng·ml<sup>-1</sup>) (n=9)</b>	4,77 (1,98); 4,20 (2,7)	
<b>Co/dosis (ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) (n=9)</b>	2,48 (3,21); 1,40 (1,2)	
<b>Co/(dosis/peso) (ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>) (n=7)</b>	175,87 (275,6); 83 (80,3)	
<b>Forma liberación TAC</b>	Inmediata	5 (18,5)
	Retardada	22 (81,5)
	AMF	14 (51,9)
	Corticoides	14 (51,9)
	EVE	1 (3,7)
	AntiHTA, incluidos diuréticos	11 (40,7)
	IBP (excluido rabeprazol)	12 (44,4)
	Ácido ursodesoxicólico	4 (14,8)
	Estatinas	4 (14,8)

Los datos se presentan como media (DE); mediana (IQR) para variables continuas, o n (%) para variables categóricas. n=27 salvo indicado.

El análisis de Co, Co/dosis y Co(dosis/peso) solo se realizó para aquellos pacientes de los que se disponía datos. El rango de la dosis total diaria de TAC fue amplio (6,8 mg) con un mínimo de 0,2mg·día<sup>-1</sup> y un máximo de 7mg·día<sup>-1</sup>. Así mismo, en la dosis/peso se encontró un mínimo atípico con 0,002mg·kg<sup>-1</sup>, y tres valores por encima de 0,1mg·kg<sup>-1</sup>. En los niveles ajustados a la dosis, se encontró un valor atípico (9,66 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) correspondiente a la dosis mínima. El promedio de los niveles ajustados a la dosis eliminando este dato es de 1,49 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> (mediana=1,2 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>). Ocurre lo mismo cuando se analizan los niveles ajustados a la dosis por peso, encontrando un valor atípico (797,5 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>) que al ser eliminado resulta en un promedio de 72,26 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> (mediana=77,9 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>).

Asumiendo un rango terapéutico entre 4-8 ng·ml<sup>-1</sup> (estudio *Symphony*), el 44,45% de los pacientes presentaba niveles subterapéuticos.

La frecuencia encontrada de patologías o EEAA relacionados con la terapia inmunosupresora se resume en la Tabla 17.

**Tabla 17. Efectos adversos presentados por los pacientes del estudio.**

<b>Nefrotoxicidad</b>	9 (33,3)
<b>Creatinina (mg·dl<sup>-1</sup>) (n=6)</b>	1,36 (0,47); 1,42
<b>Neoplasias</b>	5 (18,5)
<b>DM</b>	6 (22,2)
<b>Dislipidemia</b>	8 (29,6)
<b>HTA</b>	10 (37)
<b>Función hepática alterada</b>	6 (22,2)
<b>EGI</b>	13 (48,1)
<b>Hipocalcemia</b>	10 (37)
<b>Hipomagnesemia</b>	2 (7,4)
<b>Anemia</b>	8 (29,6)
<b>Trastornos osteomusculares</b>	4 (14,8)
<b>Dolor crónico (cualquier tipo)</b>	12 (44,4)
<b>Hipersensibilidad cutánea</b>	5 (18,5)
<b>Neurotoxicidad</b>	6 (22,2)
<b>Infecciones recurrentes</b>	13 (48,1)
<b>Astenia</b>	2 (7,4)
<b>Número total de EEAA</b>	5,30 (2,57); 5

Los datos se presentan como n (%) para variables categóricas; y media (DE); mediana (IQR) para numéricas. n=27.

Los EEAA más frecuentes entre los pacientes fueron EGI e infecciones recurrentes, seguido de dolor crónico, hipertensión arterial, hipocalcemia y nefrotoxicidad.

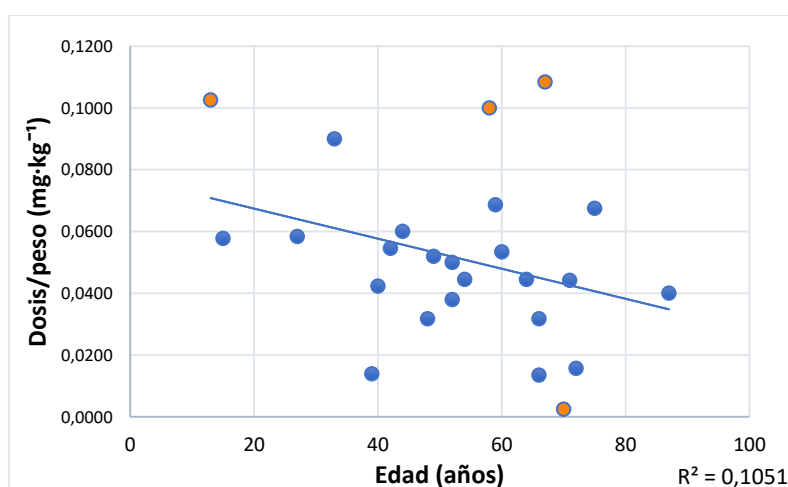
La nefrotoxicidad fue definida por insuficiencia renal aguda/crónica (basándose en aumento/disminución de creatinina y/o TFG en >30% frente a lo establecido), tubulopatía o glomerulopatía. La función hepática alterada se definió por valores alterados de transaminasas hepáticas o diagnóstico previo. La DM, dislipidemia, HTA, hipomagnesemia, hipocalcemia y anemia se definieron por valores analíticos o diagnóstico previo. Neoplasias y trastornos osteomusculares se definieron por diagnóstico previo. Los EGI fuera de lo normal, dolor crónico o recurrente (cualquier tipo incluido muscular, cefaleas y estomacal), hipersensibilidad cutánea, neurotoxicidad (incluido temblores, parestesias y alteraciones visuales), infecciones recurrentes y astenia fueron comunicadas por los pacientes en el documento de recogida de datos.

## 1.2. ANÁLISIS INFERENCIAL

### 1.2.1. Análisis de las variables demográficas y farmacocinéticas

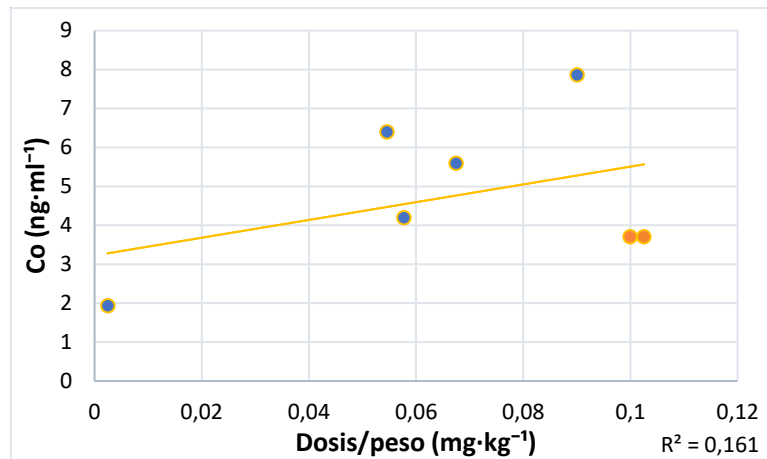
De las formas comerciales de TAC comercializadas en España, solo un paciente tomaba Envarsus®, y otro Modigraf®, siendo el resto Prograf® o Advagraf®. Para el paciente que tomaba Envarsus, se tuvo en cuenta la equivalencia con el resto de las marcas comerciales (1:0,7, mg:mg). No hubo diferencias significativas en la dosis, dosis/peso, Co ni Co/peso entre los grupos que tomaban TAC de liberación inmediata (Prograf® o Modigraf®) o retardada (Advagraf® o Envarsus®) ( $p=0,148$ ,  $p=0,553$ ,  $p=0,120$ ,  $p=0,243$ ,  $p=0,245$  respectivamente).

No se encontraron diferencias significativas en la dosis diaria de TAC, en la dosis diaria/peso ni en los niveles en sangre en función del sexo ( $p=0,639$ ,  $p=0,887$  y  $p=0,286$  respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias en la dosis y niveles en sangre respecto a la edad ( $p=0,136$  y  $p=0,489$ ), sin embargo, se encontró una tendencia casi significativa respecto a la dosis/peso siendo inversamente proporcionales ( $p=0,068$ , coeficiente de correlación de Spearman =  $-0,307$ , correlación débil). En la Figura 22 se muestra la dispersión de la dosis/peso respecto a la edad, observando la tendencia inversamente proporcional. Así mismo, se destacan en naranja los datos extremos, siendo aquellos datos por encima de  $0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y por debajo de  $0,0025 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .



**Figura 22. Dispersión de la dosis/peso ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) comparado con la edad (años) en el estudio de tacrolimus.** \*Uno de los puntos  $>0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  corresponde a la única paciente con trasplante reciente.

Así mismo, no se encontró asociación significativa entre la dosis y el peso ( $p=0,417$ , coeficiente de correlación de Spearman= $0,016$ ). La figura 23 muestra la dispersión de la dosis/peso respecto a la Co, destacando dos valores aislados con un ratio por debajo del resto (en naranja).



**Figura 23. Dispersión de la dosis/peso ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) comparado con niveles en sangre (Co) de tacrolimus.**

El 50% de los pacientes fuera de rango terapéutico ( $\text{Co} < 4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) había sufrido algún tipo de signo de rechazo.

Concretamente los dos pacientes con menor Co/dosis se encontraban con una  $\text{Co} < 4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  y ambos presentaron episodios de signos de rechazo o disfunción del injerto.

En relación a la posible inducción del CYP3A4 por el uso concomitante de corticoides, tampoco se asoció la toma de estos (concretamente prednisona) con diferencias en la dosis ( $p=0,186$ ), dosis/peso ( $p=0,399$ ), Co ( $p=0,384$ ), Co ajustado a la dosis ( $p=0,886$ ) ni Co ajustados a la dosis/peso ( $p=1,000$ ).

### 1.2.2. Análisis de la presencia de efectos adversos

Se compararon las variables demográficas y clínicas de los pacientes de estudio con la frecuencia de EEAA relacionados con la inmunosupresión para determinar si existían diferencias entre grupos. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 18.

**Tabla 18. Comparación de la frecuencia de los efectos adversos más representativos en la terapia inmunosupresora con tacrolimus y las características de los pacientes analizados.**

EEAA	Sexo, n (%)		Edad, años (media)	Peso, kg (media)	IMC, kg·m <sup>-2</sup> (media)	Tipo trasplante, n (%)				Dosis/peso (mg·kg <sup>-1</sup> )	Co/dosis (ng·ml <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )
	Hombre (n=10)	Mujer (n=17)				Renal (n=8)	Hepát (n=15)	Card. (n=2)	Pulm. (n=1)		
<b>Nefrotoxicidad (n=9)</b>	6 (22,2)	3 (11,1)	42,77 (vs 56,35)	70,31 (vs 62,11)	25,04 (vs 23,51)	2 (7,4)	6 (22,2)	1 (3,7)	0	0,044 (vs 0,055)	4,11 (vs 1,26)
<b>(p-valor)</b>	<b>0,020*</b>		0,075	0,140	0,315	0,739				0,194	0,343
<b>Neoplasias (n=5)</b>	3 (11,1)	2 (7,4)	59 (vs 49,90)	68,1 (vs 63,9)	23,40 (vs 24,15)	1 (3,7)	3 (11,1)	1 (3,7)	0	0,045 (vs 0,052)	4,26 (vs 1,15)
<b>(p-valor)</b>	0,208		0,374	0,488	0,818	0,638				0,869	0,250
<b>DM (n=6)</b>	0	6 (22,2)	62,16 (vs 48,5)	60,66 (vs 66,02)	24,35 (vs 23,89)	1 (3,7)	5 (18,5)	0	0	0,044 (vs 0,054)	2,13 (vs 2,54)
<b>(p-valor)</b>	0,054		0,157	0,366	0,828	0,514				0,303	0,500
<b>Dislipidemia (n=8)</b>	2 (7,4)	6 (22,2)	52,66 (vs 51,11)	64,77 (vs 64,71)	24,24 (vs 23,86)	3 (11,1)	3 (11,1)	2 (7,4)	0	0,052 (vs 0,050)	1,22 (vs 3,43)
<b>(p-valor)</b>	0,413		0,849	0,754	0,374	0,115				0,374	0,143
<b>HTA (n=10)</b>	5 (18,5)	5 (18,5)	52,60 (vs 52,66)	72,7 (vs 59,43)	26,09 (vs 22,61)	4 (14,8)	4 (14,8)	2 (7,4)	0	0,055 (vs 0,048)	1,37 (vs 2,93)
<b>(p-valor)</b>	0,189		0,897	<b>0,019*</b>	<b>0,023*</b>	0,161				0,723	0,857
<b>EGI (n=13)</b>	3 (11,1)	10 (37,0)	48,15 (vs 55,15)	57,41 (vs 71,5)	22,85 (vs 25,06)	4 (14,8)	8 (29,6)	1 (3,7)	0	0,049 (vs 0,053)	1,33 (vs 2,94)
<b>(p-valor)</b>	0,205		0,336	<b>0,010*</b>	0,186	0,785				0,538	1,000
<b>Anemia (n=8)</b>	1 (3,7)	7 (25,9)	42,88 (vs 55,56)	56,37 (vs 68,67)	22,88 (vs 24,52)	1 (3,7)	7 (25,9)	0	0	0,071 (vs 0,041)	1,33 (vs 3,55)
<b>(p-valor)</b>	0,128		0,102	0,344	<b>0,031*</b>	0,225				<b>0,023*</b>	0,343
<b>Función hepát. alterada (n=6)</b>	2 (7,4)	4 (14,8)	50,83 (vs 51,90)	57,75 (vs 66,94)	22,68 (24,41)	0	6 (22,2)	0	0	0,074 (vs 0,044)	3,21 (vs 1,66)
<b>(p-valor)</b>	0,668		0,976	0,156	0,400	0,126				0,069	0,686
<b>Neurotoxicidad (n=6)</b>	1 (3,7)	5 (18,5)	48,80 (vs 52,33)	64,6 (vs 64,77)	24,34 (vs 23,91)	2 (7,4)	3 (11,1)	1 (3,7)	0	0,059 (vs 0,049)	0,52 (vs 2,81)
<b>(p-valor)</b>	0,296		0,355	0,687	0,828	0,750				0,437	0,643
<b>Infecciones recurrentes (n=13)</b>	5 (18,5)	8 (29,6)	44,69 (vs 58,61)	62,37 (vs 66,92)	23,15 (vs 24,78)	5 (18,5)	7 (25,9)	0	1 (3,7)	0,059 (vs 0,042)	2,85 (vs 1,00)
<b>(p-valor)</b>	0,500		0,081	0,376	0,270	0,312				0,186	0,857

Los datos se presentan como la media del grupo que presenta dicho EEAA (entre paréntesis, media del grupo que no lo presenta) para variables continuas, o n (%) para variables categóricas. n=26.

\*En negrita, valores de p<0,05 considerados estadísticamente significativos.

Se observaron diferencias significativas en pacientes que presentaban anemia recurrentemente y la dosis/peso, mientras que no se observó para la Co. Así mismo, los pacientes que presentaban anemia tenían significativamente mayor número de EEAA relacionados con la terapia (**p=0,016**).

La presencia de nefrotoxicidad fue significativamente mayor en hombres que en mujeres. Así mismo, existe una tendencia casi significativa en la presencia de DM en mujeres frente a hombres. En cuanto al peso, fue relacionado con la presencia HTA, encontrándose un peso promedio de 13,27 kg más en el grupo de HTA frente a no HTA, y 3,48 puntos de IMC por encima, pasando de normopeso a sobrepeso. Por el contrario, se relacionó la presencia de EGI con menor peso promedio (14,08 kg menos). El resto de EEAA no fue relacionado con edad, sexo o peso, aunque sí se encontró una relación significativa e inversa en el número total de EEAA y la edad



(**p=0,022**, coeficiente de correlación Spearman=-0,398, correlación débil). Respecto a la función renal, no se encontraron diferencias entre la dosis diaria ni dosis/peso y los niveles de creatinina ( $p=0,827$  y  $p=0,111$  respectivamente), aunque estos últimos solo se disponían en seis pacientes. La presencia de EGI (diarrea) no se relacionó con ningún parámetro farmacocinético.

Por otra parte, se analizó la relación de los EEAA descritos con la toma de terapias concomitantes a las que también se les asocia su aparición. Respecto a la toma de corticoides (prednisona), no se encontró asociación con la presencia de trastornos osteomusculares ( $p=0,359$ ), EGI ( $p=0,119$ ) ni DM ( $p=0,248$ ). Sin embargo, sí se encontró una clara asociación significativa con la HTA (**p=0,005**). 9 de 10 (90%) pacientes con HTA tomaban prednisona, sobre un total de 14 pacientes en tratamiento con este fármaco (64,2%). Así mismo, se encontraron mayores dosis promedio de prednisona en pacientes con HTA que en aquellos que tomaban prednisona sin presentar HTA (**p=0,009**, 6,11 mg vs 4,5 mg). La toma de IBP no se relacionó con la presencia de ningún EEAA, pero sí con la toma de prednisona (**p=0,045**) y MFA (**p=0,007**). Las estatinas no se relacionaron con dolores en general ( $p=0,239$ ) ni problemas osteomusculares ( $p=0,489$ ). Por su parte, la toma de AMF no se relacionó con EGI ( $p=0,119$ ), ni cuando se diferencia entre micofenolato mofetilo (Cellcept®) ni AFM recubierto (Myfortic®). Tampoco se relacionó con ningún otro efecto adverso salvo episodios de rechazo agudo (**p=0,012**) donde la totalidad de los casos (5, 18,5%) fueron en pacientes que no tomaban AMF.

### **1.3. ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO**

Los genotipos obtenidos para cada uno de los pacientes del estudio de TAC se presentan en el Anexo IX.

#### **1.3.1. Farmacogenética descriptiva de la población de estudio**

Los 27 pacientes fueron genotipados para todas las variantes polimórficas. A través de la prueba  $X^2$  se comprobó que todas las frecuencias genotípicas cumplían con el HWE. Así mismo, se comprobó del mismo modo que no existían diferencias genotípicas en la población de estudio respecto a la población Ibérica. Las frecuencias genotípicas obtenidas, las esperadas según HWE, y las presentes en la población Ibérica así como los estadísticos  $X^2$  se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19. Prueba  $\chi^2$  para la detección de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y de la frecuencia genotípica observada en la población Ibérica respecto a la cohorte de tacrolimus.**

Variante (número rs)	Genotipo	Frecuencia observada n (%)	HWE		Población Ibérica*	
			Frecuencia esperada n (%)	Prueba $\chi^2$ (valor-p)	Frecuencia esperada n (%)	Prueba $\chi^2$ (valor-p)
<b>CYP3A5*3</b> (rs776746)	AA	0 (0,000)	0,148 (0,005)	0,172 (0,917)	1 (0,009)	0,302 (0,859)
	AG	4 (0,150)	3,703 (0,137)		14 (0,131)	
	GG	23 (0,850)	23,148 (0,860)		92 (0,860)	
<b>CYP3A4*1B</b> (rs2740574)	AA	25 (0,930)	25,037	0,0399 (0,980)	101 (0,944)	N/A
	AG	2 (0,070)	1,925		6 (0,056)	
	GG	0 (0,000)	0,037		0 (0,000)	
<b>CYP3A4*22</b> (rs35599367)	CC	25 (0,930)	25,037	0,039 (0,980)	99 (0,925)	N/A
	CT	2 (0,070)	1,925		8 (0,075)	
	TT	0 (0,000)	0,037		0 (0,000)	
<b>CYP3A4*20 (Ins A)**</b> (rs67666821)	No Ins	27 (1,000)	27 (1,000)	N/A	1953 (0,988)	N/A
	No Ins/Ins	0 (0,000)	0 (0,000)		24 (0,012)	
	Ins/Ins	0 (0,000)	0 (0,000)		0 (0,000)	
<b>POR*28</b> (rs1057868)	CC	13 (0,481)	13,370 (0,495)	0,116 (0,943)	54 (0,505)	0,057 (0,9715)
	CT	12 (0,445)	11,259 (0,417)		46 (0,430)	
	TT	2 (0,074)	2,370 (0,090)		7 (0,065)	
<b>ABCB1 (3435 C&gt;T)</b> (rs1045642)	CC	8 (0,300)	8,333 (0,308)	0,0675 (0,966)	32 (0,299)	6,000 (,0,199)
	CT	14 (0,520)	13,333 (0,493)		51 (0,477)	
	TT	5 (0,190)	5,333 (0,197)		24 (0,224)	
<b>ABCB1 (1236 C&gt;T)</b> (rs1128503)	CC	7 (0,260)	8,333 (0,308)	1,080 (0,582)	40 (0,374)	1,125 (0,535)
	CT	16 (0,590)	13,333 (0,493)		53 (0,495)	
	TT	4 (0,15)	5,333 (0,197)		14 (0,131)	
<b>ABCB1 (2677 G&gt;T/A)</b> (rs2032582)	GG	9 (0,330)	10,083 (0,373)	0,769 (0,680)	37 (0,346)	0,111 (0,945)
	GT/GA	15 (0,560)	12,833 (0,475)		53/ 4 (0,495/0,037)	
	TT	3 (0,110)	4,083 (0,151)		12 (0,112)	
<b>PXR (c,69789 A&gt;G)</b> (rs7643645)	AA	9 (0,330)	8,333 (0,308)	0,270 (0,873)	43 (0,402)	2,799 (0,246)
	AG	12 (0,440)	13,333 (0,493)		53 (0,495)	
	GG	6 (0,220)	5,333 (0,197)		11 (0,103)	
<b>PXR (c,63396 C&gt;T)</b> (rs2472677)	CC	7 (0,260)	4,481 (0,165)	4,030 (0,133)	17 (0,159)	2,381 (0,304)
	CT	8 (0,300)	13,037 (0,482)		47 (0,439)	
	TT	12 (0,440)	9,481 (0,350)		43 (0,402)	
<b>CYP2C19*2</b> (rs4244285)	GG	19 (0,700)	18,750 (0,694)	0,120 (0,941)	76 (0,710)	4,034 (0,133)
	GA	7 (0,260)	7,5 (0,277)		31 (0,290)	

	AA	1 (0,040)	0,75 (0,030)		0 (0,000)	
<b>CYP2C19*3</b>	GG	27 (1,000)	27 (1,000)	N/A	107 (0,100)	N/A
<b>(rs4986893)</b>	GA	0 (0,000)	0 (0,000)		0 (0,000)	
	AA	0 (0,000)	0 (0,000)		0 (0,000)	
<b>CYP2C19*17</b>	CC	20 (0,740)	19,592 (0,725)	0,385	65 (0,607)	1,763
<b>(rs12248560)</b>	CT	6 (0,223)	6,814 (0,252)	(0,8249)	38 (0,355)	(0,414)
	TT	1 (0,037)	0,592 (0,020)		4 (0,037)	

N/A: no aplica, solo un genotipo obtenido.

\*La frecuencia esperada se ha obtenido en la base de datos Ensembl (97) basado en la fase 3 del "1000 Genomes Project".

\*\*La frecuencia esperada para este alelo se ha obtenido de (140).

Para las variantes *CYP3A4\*20* y *CYP2C19\*3* no se pudo calcular debido a que solo se obtuvieron genotipos *wildtype*.

### 1.3.2. Relación de la farmacogenética con las variables farmacocinéticas

Se analizó la existencia de diferencias entre los distintos genotipos y las variables farmacocinéticas recogidas. Para el análisis del gen *ABCB1*, se agruparon adicionalmente los tres polimorfismos estudiados en haplotipos según su presencia en homocigosis *wildtype* (CC-GG-CC), heterocigosis (CT-GT-CT) o homocigosis en mutación (TT-TT-TT).

No se encontraron diferencias entre genotipos y el sexo, edad o peso de manera que pudieran afectar a los resultados. La significación estadística para cada polimorfismo se muestra en la Tabla 20.

**Tabla 20. Significación estadística para cada polimorfismo respecto a los datos farmacocinéticos de tacrolimus.**

Polimorfismo	Dosis	Dosis/peso	Co	Co/dosis	Co/(dosis/peso)
<b>CYP3A5*3</b>	0,095	0,203	0,500	0,056	0,095
<b>CYP3A4*1B</b>	0,068	<b>0,027*</b>	0,500	0,056	0,095
<b>CYP3A4*22</b>	0,821	0,807	N/A	N/A	N/A
<b>CYP3A4*20</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>POR*28</b>	0,736	0,626	0,522	0,334	0,381
<b>ABCB1 (C3435T)</b>	0,256	<b>0,027*</b>	0,760	0,305	0,325
<b>ABCB1 (C1236T)</b>	0,264	0,877	0,225	0,291	0,317

<b>ABCB1 (G2677T)</b>	0,111	<b>0,026*</b>	0,441	0,154	0,134
<b>PXR (A69789G)</b>	0,967	0,728	0,269	0,926	0,915
<b>PXR (C63396T)</b>	0,051	<b>0,045*</b>	0,431	0,192	0,157
<b>CYP2C19*2 **</b>	0,222	0,073	0,667	0,667	N/A
<b>CYP2C19*3</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>CYP2C19*17</b>	0,308	1	0,667	0,667	N/A

\*En negrita, valores de  $p \leq 0,05$  considerados estadísticamente significativos.

\*\*los datos para el *CYP2C19* muestran los resultados para el grupo de pacientes que toma IBPs distintos a rabeprazol.

N/A: no aplica, para aquellas variantes en las que no había más que un grupo genotípico.

No se encontraron diferencias significativas en portadores del alelo *CYP3A4\*22* respecto a la dosis o dosis/peso; sin embargo, los individuos heterocigotos presentaban una dosis y dosis/peso más bajas (3,16 mg vs 2,75 mg y  $0,051 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vs  $0,045 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivamente).

Sí que se encontraron diferencias significativas en la dosis/peso ( $p=0,027$ ), y una tendencia respecto a la Co/dosis ( $p=0,056$ ) entre portadores del alelo *CYP3A4\*1B* y no portadores. Las Figuras 24 y 25 muestran los diagramas de cajas y bigotes de la dosis ajustada al peso y Co/dosis para los dos grupos de genotipos del *CYP3A4* (rs2740574).

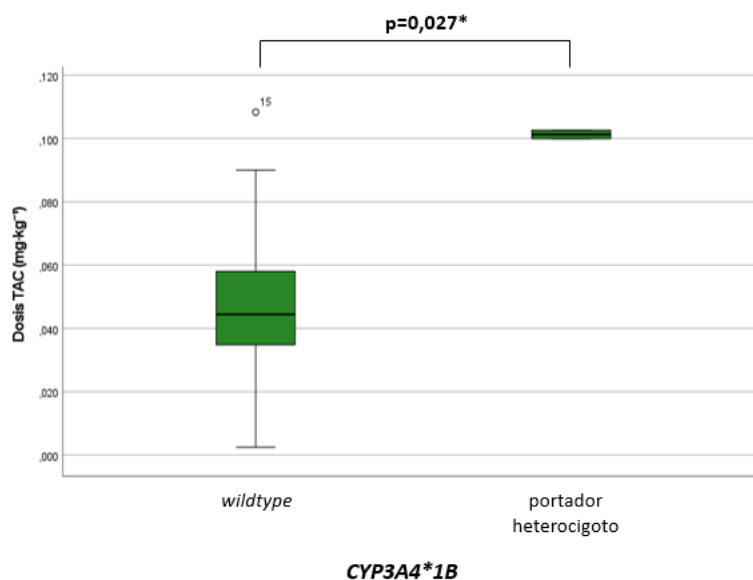
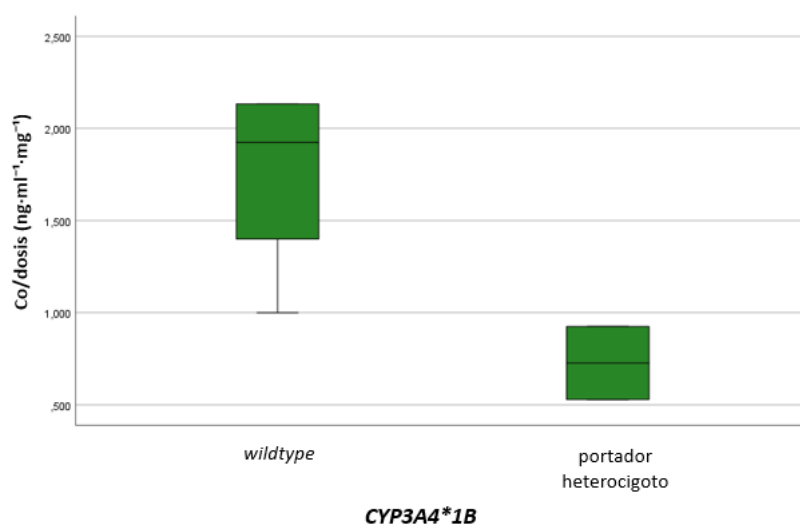


Figura 24. Diagrama de cajas de la dosis/peso de tacrolimus para cada grupo genotípico del SNP rs2740574.



**Figura 25. Diagrama de cajas de la Co/dosis de tacrolimus para cada grupo genotípico del SNP rs2740574.**

\*Para la mejor visualización de los datos en este diagrama se ha eliminado el dato atípico.

Cuando se utiliza la dosis sin ajustarse al peso, o la Co/(dosis/peso) sigue existiendo una tendencia significativa pero en menor magnitud ( $p=0,068$  y  $0,095$  respectivamente). Respecto a la Co no se encontraron diferencias ( $p=0,500$ ). Los dos pacientes portadores del alelo *CYP3A4\*1B* eran simultáneamente portadores del alelo *CYP3A5\*1*. Adicionalmente, solo otros dos pacientes eran portadores *CYP3A5\*1* sin ser portadores *CYP3A4\*1B*. Analizando el *CYP3A5*, no se encontraron diferencias significativas, pero si tendencia a haberlas en la dosis ( $p=0,095$ ), Co/dosis ( $0,056$ ), y Co/(dosis/peso) ( $p=0,095$ ); no encontrándose en la Dosis/peso ( $p=0,203$ ) y Co ( $p=0,500$ ). La Tabla 21 muestra los estadísticos descriptivos calculados para cada combinación de genotipos.

**Tabla 21. Comparación de las variables farmacocinéticas entre combinaciones genotípicas de *CYP3A5* y *CYP3A4* en la cohorte de tacrolimus.**

<b>CYP3A4 (rs2740574)</b>	<b>CYP3A5 (rs776746)</b>		<b>n</b>	<b>media</b>	<b>DE</b>
<i>Wildtype</i> (*1/*1)	Heterocigoto (*1/*3) (n=2)	Dosis (mg)	2	3,5	0,707
		Dosis (mg·kg <sup>-1</sup> )	2	<b>0,047</b>	0,004
	Homocigoto mutado (*3/*3) (n=23)	Dosis (mg)	23	2,89	1,542
		Dosis (mg·kg <sup>-1</sup> )	21	<b>0,047</b>	0,025
		Co (ng·ml <sup>-1</sup> )	7	5,221	2,198
		Co/Dosis (ng·ml <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	7	<b>2,883</b>	3,02
Heterocigoto (*1/*1B)	Heterocigoto (*1/*3) (n=2)	Co/(Dosis/peso) (ng·ml <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	5	231,60	316,77
		Dosis (mg)	2	5,5	2,121
		Dosis (mg·kg <sup>-1</sup> )	2	<b>0,101</b>	0,001
		Co (ng·ml <sup>-1</sup> )	2	3,70	0,000
		Co/Dosis (ng·ml <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	2	<b>0,726</b>	0,280
		Co/(Dosis/peso) (ng·ml <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	2	36,53	0,654

En el grupo de pacientes *CYP3A5\*1/\*3-CYP3A4\*1/\*1* presentó una dosis media de 3,5 mg, por encima del genotipo más frecuente en la población, *CYP3A5\*3/\*3-CYP3A4\*1/\*1*, con una media de 2,89 mg. Aquellos pacientes heterocigotos para ambos genes, *CYP3A5\*1/\*3-CYP3A4\*1/\*1B* presentaron de forma destacada una mayor dosis, siendo un promedio de 5,5 mg. Teniendo en cuenta los valores atípicos (Tabla 21) mencionados anteriormente de un paciente que presentaba una dosis excepcionalmente baja en el grupo *CYP3A5\*3/\*3-CYP3A4\*1/\*1*, cuando se elimina este dato el promedio de dosis diaria se iguala al grupo *CYP3A5\*1/\*3-CYP3A4\*1/\*1* (3,01 mg), eliminando las diferencias entre estos grupos.

Ajustando la dosis al peso, dejaron de observarse diferencias entre pacientes *CYP3A5\*1/\*3-CYP3A4\*1/\*1* y pacientes *CYP3A5\*3/\*3-CYP3A4\*1/\*1* (genotipo frecuente), tanto en presencia o ausencia del dato atípico (media 0,049 mg·kg<sup>-1</sup>), remarcándose la diferencia en el grupo *CYP3A5\*1/\*3-CYP3A4\*1/\*1B*, que presentaba más del doble de mg·kg<sup>-1</sup> que los otros dos grupos. Si se ajustan los datos descartando el paciente con menos de 12 meses de trasplante (n=1) la dosis ajustada al peso resulta en 0,044 mg·kg<sup>-1</sup> para *CYP3A5\*3/\*3-CYP3A4\*1/\*1*.

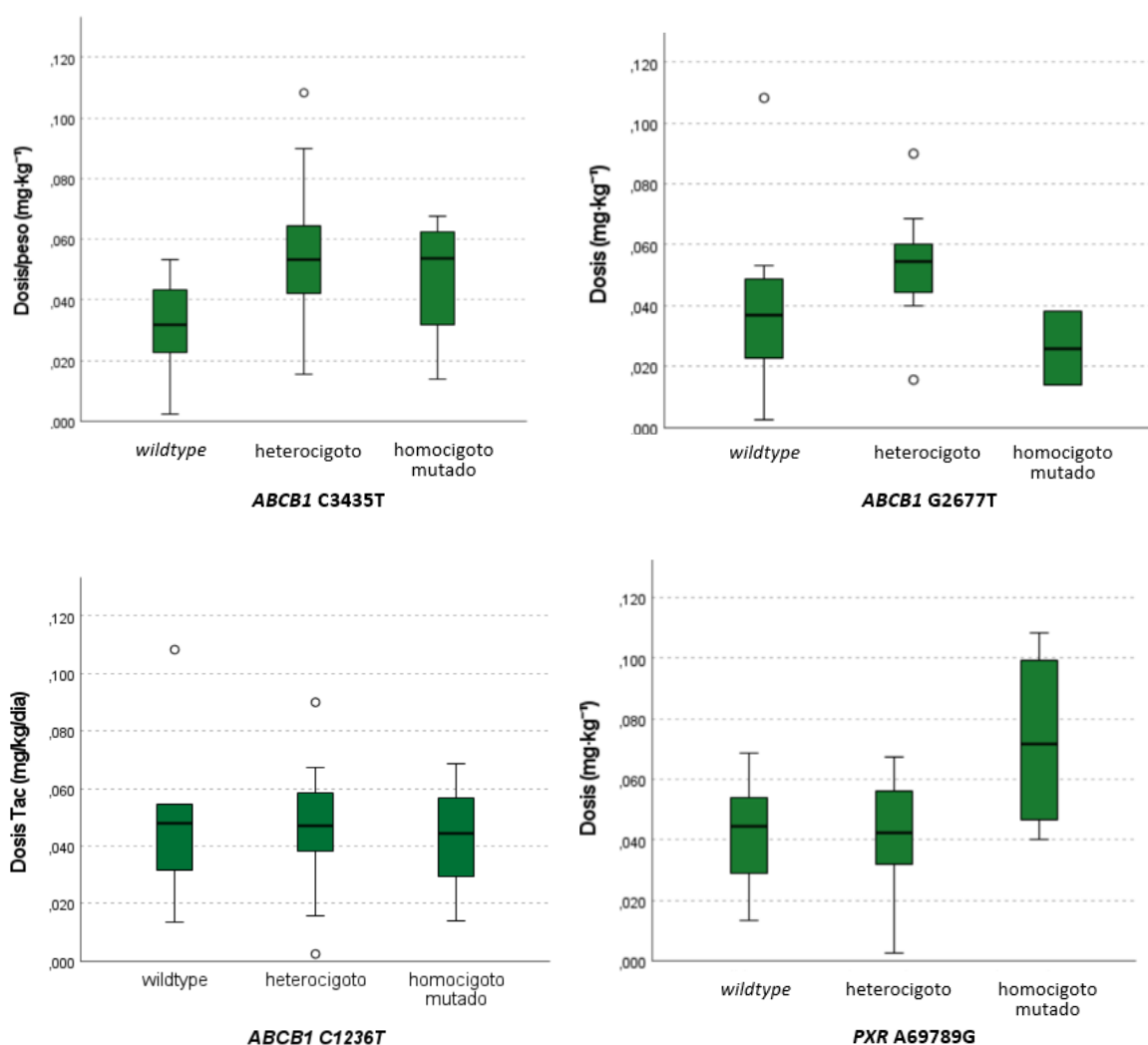
Respecto a Co, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, pero al comparar los promedios de grupos existen claras diferencias, que se ven remarcadas al eliminar el dato atípico del grupo *CYP3A5\*3/\*3-CYP3A4\*1/\*1* (promedio 6,01 ng·ml<sup>-1</sup>). Respecto a Co ajustado a la dosis y a la dosis/peso existe una tendencia casi significativa que se aprecia claramente al observar los promedios entre grupos, incluso eliminando el dato atípico (Co/dosis promedio 1,75 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>; Co/(dosis/peso) promedio 90,13 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>).

Respecto al gen *ABCB1*, en los SNPs C3435T y G2677T se observaron diferencias significativas respecto a la dosis/peso (**p=0,27** y **p=0,26**). Analizando los datos, se encontró un menor promedio de dosis ajustada al peso en genotipos TT (0,025 mg·kg<sup>-1</sup>) para el G2677T que en GT (0,06 mg·kg<sup>-1</sup>) o GG (0,040mg·kg<sup>-1</sup>). Sin embargo, para el alelo C3435T, se encontró mayor dosis ajustada al peso en portadores CT (0,062 mg·kg<sup>-1</sup>), que en TT (0,047 mg·kg<sup>-1</sup>) o CC (0,031 mg·kg<sup>-1</sup>). Aunque no se encontraron diferencias significativas para el alelo C1236T (p=0,877), los portadores TT presentaban menor dosis ajustada al peso frente a CT y CC. Ajustando los datos para eliminar el efecto del *CYP3A4\*1B*, se mantuvo la tendencia estadística para el G2677T (p=0,06), mientras que para el C3435T no (p=0,111). Las dosis ajustadas al peso disminuyeron tras el ajuste para portadores CT en los tres SNPs y para el haplotipo TTT, manteniéndose las menores dosis en sujetos TT para las variantes G2677T y C1236T.

Respecto al gen *PXR* también se encontraron diferencias significativas en la dosis/peso (**p=0,045**) en la variante A69789G, mientras que para la variante C63396T no fueron significativas

( $p=0,728$ ). Analizando los grupos de A69789G, los portadores GG tenían significativamente mayor dosis/peso ( $0,082 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), que los AG ( $0,041 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), o AA ( $0,042 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Dado que esta variante parece influenciar la expresión del *ABCB1*, se ajustaron los resultados para genotipos *ABCB1* G2677T y *CYP3A4*, perdiéndose la significación estadística ( $p=0,264$ ).

La Figura 26 muestra el diagrama de cajas para la dosis ajustada al peso para las variantes mencionadas.



**Figura 26. Diagrama de cajas de la dosis/peso de tacrolimus para los polimorfismos del gen *ABCB1* y A69789G del gen *PXR* en sujetos no portadores del alelo *CYP3A4\*1B*.**

Para el resto de los polimorfismos analizados, no se encontraron diferencias entre genotipos y variables farmacocinéticas. Concretamente no se encontraron diferencias entre genotipos *CYP2C19* en el grupo de pacientes que tomaban IBPs, ni en la muestra total del estudio. Tampoco se encontraron para el gen *POR*, ya sea respecto a los genes *CYP3A4* y *CYP3A5* o en la muestra total de estudio.

### 1.3.3. Relación de la farmacogenética con la presencia de efectos adversos

Se analizaron las diferencias entre los genotipos de los genes analizados frente a la presencia de efectos adversos relacionados con la terapia. Se encontraron diferencias ( $p=0,046$ ) en portadores del alelo *CYP3A4\*1B*, donde el 100% de estos presentaban daño hepático frente a un 18,18% en los *wildtype*. La misma diferencia se encontró respecto al *PXR A69789G* ( $p=0,015$ ) donde el 66,66% de los pacientes que manifestaban daño hepático eran homocigoto mutados, frente al 8,33% de heterocigotos o 12,5% *wildtype*. Cruzando ambas variantes, el 66,66% de los casos de daño hepático eran portadores de la combinación *CYP3A4\*1/\*1B-PXR 69789GG* (Tabla 22), siendo todos trasplantados hepáticos.

**Tabla 22.** Combinación de los polimorfismos *CYP3A4\*1B* y *PXR A69789G* en la presencia de daño hepático en los pacientes del estudio con tacrolimus.

<i>CYP3A4*1B</i>	<i>PXR A69789G</i>	Daño hepático		
		Sí	No	Total
<i>Wildtype</i>	<i>Wildtype</i>	1	7	8
	Heterocigoto	1	11	12
	Homocigoto mutado	2	2	4
<b>Heterocigoto</b>	Homocigoto mutado	2	0	2

\*Los datos se presentan como n para cada casilla.

En pacientes expresores del *CYP3A5* no portadores del alelo *CYP3A4\*1B* no se observó daño hepático, siendo ambos *PXR\*3* homocigotos *wildtype*.

En la variante *A69789G* del gen *PXR* también se encontraron diferencias significativas en la presencia de infecciones recurrentes ( $p=0,016$ ), estando presentes en un 100% de los homocigotos mutados (6 casos) frente a un 41,66% de los heterocigotos (5 casos de 12 portadores), y 25% de los *wildtype* (2 casos de 8 portadores totales).

Respecto al gen *ABCB1*, hubo diferencias significativas ( $p=0,029$ ) entre genotipos de la variante *G2677T* presentando el nefrotoxicidad el 100% de los homocigotos mutados frente al 37,5% de los sujetos *wildtype*. Para el resto de las variantes no se obtuvieron diferencias.

Se encontraron diferencias significativas ( $p=0,035$ ) en la presencia de EGI entre pacientes portadores del alelo T del SNP *C1236T* del *ABCB1* y no portadores. Concretamente, un 100% de los homocigotos mutados presentaban efectos adversos GI, frente a un 53,33% de los heterocigotos, y tan solo un 16,66% de los *wildtype*. Se observó la misma tendencia en la variante *G2677T* ( $p=0,079$ ) donde el mismo porcentaje de homocigotos mutados y heterocigotos



presentaban EGI, frente a un 25% de los *wildtype*. Sin embargo, respecto al último SNP del haplotipo, C3435T, no se encontraron diferencias tan marcadas ( $p=0,269$ ), aunque la presencia de EGI seguía predominando en portadores del alelo T (40% en TT, 64,3% CT y 28,5% CC). Analizando las diferencias entre haplotipos, se obtuvo que los portadores del haplotipo en homocigosis mutado o heterocigosis presentaban EGI en un 64,7% frente a los portadores del haplotipo *wildtype*, con un 28,5% ( $p=0,048$ ).

Adicionalmente, se encontró diferencias entre genotipos de la variante C1236T del gen *ABCB1* y la presencia de dolores ( $p=0,047$ ), presentándose en el 100% de los homocigotos mutados (4 casos) frente a  $\leq 50\%$  para el resto de los genotipos. Respecto al haplotipo del gen *ABCB1*, se observó una tendencia a la existencia de diferencias en la presencia de astenia ( $p=0,055$ ) presentando ambos pacientes con este EEA el haplotipo mutado en hetero u homocigosis.

Finalmente, respecto al gen *POR* se encontraron diferencias en la presencia de neoplasias ( $p=0,009$ ) entre homocigotos para el alelo *POR\*28* (2 casos, 100%), y la presencia del alelo en heterocigosis o ausencia (1 caso, 8,33% y 2 casos, 16,66% respectivamente).

## 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO CON EVEROLIMUS

Los resultados obtenidos en el estudio de EVE en pacientes con CET se detallan a continuación.

### 2. 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Diez pacientes pediátricos con diagnóstico de CET y en tratamiento con EVE fueron reclutados para el estudio. La Tabla 23 resume las características demográficas y farmacológicas de los pacientes en el momento de la recogida de datos para el estudio.

**Tabla 23. Datos demográficos y farmacológicos de la población de estudio con complejo de esclerosis tuberosa.**

<b>Edad (años)</b>		8,9 (4,58); 9,5 (10)
<b>Género</b>	Hombre	3 (30)
	Mujer	7 (70)
<b>Peso (kg)</b>		40 (19,51); 41,9 (37,7)
<b>Altura (cm)</b>		134,84 (27,4); 142 (57,7)
<b>Percentil por edad</b>		79,70 (24,14); 85,5 (20)
<b>Valoración percentil</b>	Normopeso	4 (40)
	Sobrepeso	3 (30)
	Obesidad	3 (30)
<b>ASC</b>		1,2 (0,42); 1,27 (0,87)
<b>Manifestación CET</b>	SEGA	9 (90)
	RAML	4 (40)
	Epilepsia	7 (70)
	Déficit cognitivo	3 (30)
	Trastornos conducta	4 (40)
	Nódulos hipocrómicos	5 (50)
	Angiomiolipoma hepático	2 (20)
	Hamartoma de retina	1 (10)
	linfedema	1 (10)

Los datos se presentan como media (DE); mediana (IQR) para variables continuas, o n (%) para variables categóricas. n=10.

Al ser población pediátrica, se valoró el estado nutricional por el percentil según sexo y edad en vez del IMC, presentando un 60% de los pacientes sobrepeso u obesidad. EVE fue pautado en la mayoría de los pacientes para tratar el SEGA (80%) seguido de epilepsia (20%), aunque casi todos presentaban varias manifestaciones de la enfermedad.

Se halló el ASC a través de la fórmula de Dubois. Se calculó la dosis/ASC y la dosis/ASC ajustada al tipo indicación para la que EVE fue prescrito (SEGA, RAML o epilepsia), teniendo en cuenta la edad y la presencia de fármacos inductores (a partir de ahora, dosis/ASC ajustada), tal como se indica para el establecimiento de la dosis inicial en ficha técnica. Los cálculos se hicieron siguiendo los siguientes criterios, basándose en las indicaciones de la EMA:

- Cálculo ASC (Dubois):  $ASC = (P0,425 \times A0,725) \times 0,007184$ ; siendo P=peso (kg) y A=altura (cm)
- Indicación SEGA:
  - Dosis/ASC ajustada= dosis actual/ASC/4,5
- Indicación epilepsia:
  - Menores de 6 años:
    - Dosis/ASC ajustada= dosis actual/ASC/6
    - Dosis/ASC ajustada=dosis actual/ASC/9 si coadministración de inductores del CYP3A4 o gp-p.
  - Mayores de 6 años:
    - Dosis/ASC ajustada= dosis actual/ASC/5
    - Dosis/ASC ajustada=dosis actual/ASC/8 si coadministración de inductores del CYP3A4 o gp-p.

Los pacientes tomaban EVE bajo las marcas comerciales Afinitor® o Votubia®, siendo comprimidos de liberación inmediata.

La Tabla 24 detalla el ASC, estado nutricional, tipo de manifestación de CET (en negrita indicación para la que fue prescrito EVE), dosis diaria de EVE, y dosis/ASC ajustada para cada uno de los pacientes del estudio.

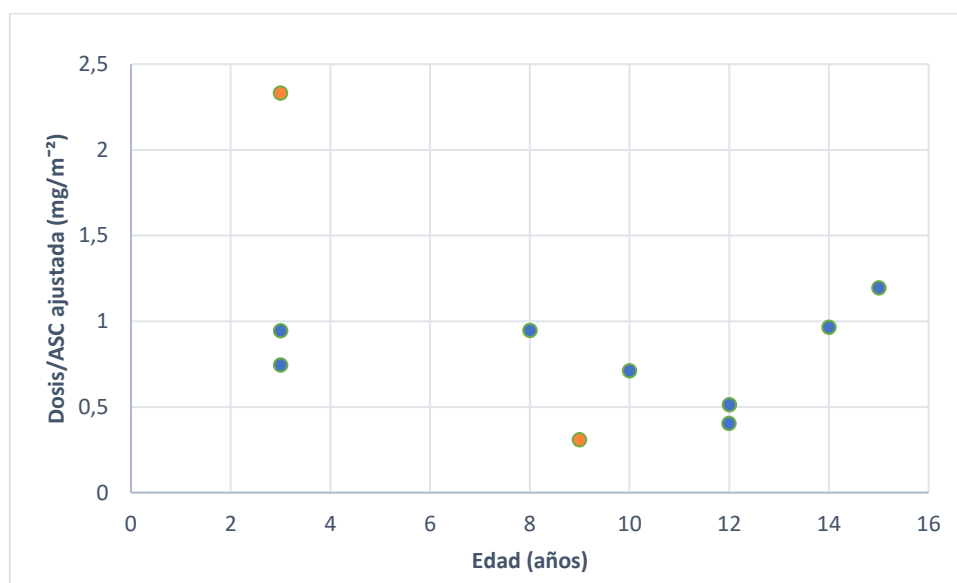
**Tabla 24. Características clínicas de los pacientes con complejo de esclerosis tuberosa, dosis de everolimus y dosis/ASC ajustada.**

Paciente (sexo)	Edad (años)	ASC	Estado nutricional	Manifestación TSC	Dosis diaria (mg)	Dosis/ASC ajustada ( $mg \cdot m^{-2}$ )
1 (♀)	12	1,73	Obesidad	<b>SEGA</b> , Epilepsy	4	0,51
2 (♀)	3	0,74	Obesidad	<b>SEGA</b> , Epilepsy	12	2,33
3 (♀)	3	0,58	Normopeso	<b>SEGA</b>	3	0,74
4 (♀)	10	1,56	Sobrepeso	<b>SEGA</b> , RAML, Epilepsy	5	0,71
5 (♂)	14	1,73	Sobrepeso	<b>SEGA</b> , RAML, Epilepsy, ID, CD	7,5	0,96
6 (♀)	15	1,40	Normopeso	<b>SEGA</b> , RAML, Epilepsy, ID	7,5	1,19
7 (♀)	9	1,02	Sobrepeso	<b>SEGA</b> , RAML, <b>Epilepsy</b> , ID, CD	,5	0,30
8 (♂)	8	1,17	Obesidad	<b>SEGA</b> , CD	5	0,94
9 (♀)	3	0,71	Normopeso	<b>Epilepsy</b>	6	0,94
10 (♂)	12	1,38	Normopeso	<b>SEGA</b> , CD	2,5	0,40

Los datos se presentan como media (DE); mediana (IQR) para variables continuas, o n (%) para variables categóricas. n=10.

Dos pacientes presentaron valores extremos de dosis/ASC ajustada. Concretamente, una paciente de 3 años presentó un valor extremo superior de  $2,33 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ , con la dosis diaria más alta de la cohorte (12 mg). En el extremo opuesto, una paciente de 9 años presentaba un valor de  $0,30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ , y la mínima dosis diaria de la cohorte (2,5 mg).

La Figura 27 muestra la dispersión respecto a la edad de la dosis/ASC ajustada a los  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$  indicados por ficha técnica según edad, pauta de EVE (SEGA o epilepsia) y presencia de inductores del CYP3A4 de los pacientes de estudio.



**Figura 27. Dispersión de la dosis/ASC ajustada de everolimus, respecto a la edad y presencia de fármacos inductores según indicaciones de ficha técnica.**

A pesar del ajuste, pueden observarse dichos valores mencionados por encima y por debajo del resto de la cohorte (en naranja).

Así mismo, otras variables relacionadas con el tratamiento de EVE y otros fármacos concomitantes se resumen en la Tabla 25.

**Tabla 25. Variables relacionadas con el tratamiento con everolimus.**

<b>Dosis total diaria (mg)</b>	5,5 (2,93); 5 (4,6)	
<b>Dosis/peso (<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	0,185 (0,168); 0,124 (0,180)	
<b>Dosis/ASC (<math>\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}</math>)</b>	5,37 (4,31); 4,29 (3,73)	
<b>Dosis/ASC ajustada (<math>\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}</math>)</b>	0,97 (0,57); 0,84 (0,54)	
<b>Tiempo en tratamiento con EVE (meses)</b>	17,5 (17,1); 12,5 (25)	
<b>Mejoría de los síntomas con EVE</b>	4 (40)	
<b>Terapia concomitante</b>	Antiepilépticos	9 (90)
	Antipsicóticos	4 (40)
	Terapia hormonal	1 (10)
<b>Fármacos que interaccionen vía CYP3A4</b>	Inhibidores	1 (10)
	Inductores	7 (70)
	Sustratos	7 (70)

Los datos se presentan como media (DE); mediana (IQR) para variables continuas, o n (%) para variables categóricas. n=10.

Existían grandes desviaciones de la dosis entre pacientes que no eran dependientes de la edad, peso, ASC ni sexo. 7 pacientes llevaban más de un año en tratamiento con EVE, y solo uno de reciente incorporación. Este último no pudo evaluar la mejora de los síntomas asociados a CET desde la toma de EVE, mientras que 4 pacientes reportaron mejoría y otros 5 no. 9 pacientes tomaban tratamiento antiepiléptico y 4 antipsicóticos/ansiolíticos entre los que se incluían levetiracetam, vigabatrina, oxcarbacepina, biviacetam, clobazam, clonazepam, perampanel, topiramato, rufinamida y ácido valproico, risperidona, levomepromazina y ripripazol. Solo un paciente estaba en terapia concomitante con un inhibidor leve del CYP3A4 (ácido valproico). 7 pacientes estaban en terapia concomitante con inductores leves del CYP3A4 (oxcarbamepina, topiramato, rufinamida y/o clobazam) en mono o biterapia. 7 pacientes estaban en terapia concomitante con sustratos del CYP3A4 (oxcarbamepina, topiramato, perampanel, clobazam, clonazepam y aripiprazol) en mono, bi o triterapia. Todos los pacientes referían buena adherencia al tratamiento salvo uno.

Respecto a los EEAA, se recogieron todos aquellos relacionados con la terapia inmunosupresora con EVE. En la Tabla 26 se recoge la incidencia para cada uno.

**Tabla 26. Efectos adversos derivados del tratamiento inmunosupresor con everolimus en los pacientes de estudio.**

<b>Efecto adverso</b>	<b>n (%)</b>
<b>Infecciones respiratorias</b>	3 (30)
<b>Hipercolesterolemia</b>	1 (10)
<b>Linfedema</b>	1 (10)
<b>Cefaleas</b>	1 (10)
<b>Aftas/mucositis</b>	2 (20)
<b>Astenia</b>	1 (10)
<b>Desarreglo menstrual</b>	2 (20)

El EEAA más prevalente fue la presencia las infecciones respiratoria, seguido de aftas o mucositis y desarreglo menstrual. Ninguno describió la presencia de neoplasias o problemas renales asociados a la medicación. Adicionalmente, tres pacientes refirieron no presentar ningún efecto adverso, uno de ellos debido al poco tiempo en tratamiento con EVE.

## **2.2. ANÁLISIS INFERENCIAL**

Se analizó la presencia de diferencias significativas en las variables farmacocinéticas de EVE entre grupos, siendo estos definidos por las variables demográficas. También se analizaron las diferencias en la incidencia de EEAA en función de las variables farmacocinéticas y demográficas.

### **2.2.1. Análisis de las variables demográficas y farmacológicas**

No se encontraron diferencias significativas entre la dosis diaria de EVE (mg) ( $p=0,818$ ), dosis/peso ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ( $p=0,305$ ) ni dosis/ASC ajustada ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) ( $p=0,909$ ) con respecto al sexo. Se observó una relación significativa entre la dosis/peso respecto a la edad ( **$p=0,036$** ) con una tendencia lineal inversa y moderada (coeficiente de correlación Spearman= $-0,591$ ), pero no con la dosis diaria ( $p=0,463$ ) ni la dosis/ASC justada ( $p=0,446$ ). Se comprobó que la edad tenía una relación significativa lineal y directa con el ASC ( **$p=0,001$** ; coeficiente de correlación Spearman= $0,843$ ), ya que se tienen en cuenta los rangos de edad para el cálculo de dosis inicial de EVE en función del ASC. Sin embargo, no se encontró asociación entre la dosis diaria y el peso ( $p=0,407$ ), ni el ASC ( $p=0,407$ ). No se encontraron diferencias en la dosis ( $p=0,510$ ), dosis/peso ( $p=0,794$ ) ni la dosis/ASC ajustada ( $p=0,296$ ) en función de la manifestación de CET para la que fue pautado EVE (SEGA, RAML o epilepsia refractaria), siendo este otro de los criterios a la hora de establecer de la dosis inicial de EVE junto con el ASC.

Finalmente, tampoco se encontraron diferencias en la dosis, dosis/peso ni la dosis/ASC ajustada o en función de la presencia de inductores, inhibidores o sustratos del CYP3A4 ( $p>0,05$ ). Este criterio también debe tenerse en cuenta para el establecimiento de la dosis inicial de EVE.

### **2.2.2. Análisis de la presencia de efectos adversos**

Se compararon las variables demográficas y clínicas de los pacientes con la frecuencia de EEAA relacionados con la terapia con EVE para determinar si existían diferencias entre grupos. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 27.

**Tabla 27. Comparación de la frecuencia de los efectos adversos reportados en la terapia con everolimus y las características de los pacientes con complejo de esclerosis tuberosa.**

EEAA	Sexo		Edad, años	Peso, kg	Percentil	Tipo de manifestación			Tratamiento		Dosis/peso (mg·kg <sup>-1</sup> )	Dosis/ASC ajustada (mg·m <sup>-2</sup> )
	Hombre (n=3)	Mujer (n=7)				SEGA (n=9)	RAML (n=4)	Epilepsia (n=7)	Antiepilépticos (n=9)	Antipsicóticos /ansiolíticos (n=4)		
Infecciones resp. (n=3) (p-valor)	1	2	8,67	35,76	63	3	2	2	2	2	0,143	0,671
	0,240		0,908	0,667	0,383	0,785		0,274	0,435	1	0,569	
Hipercolesterolemia (n=1) (p-valor)	0	1	3	13	18	1	0	0	0	0	0,231	0,743
	0,778		0,216	0,117	0,117	0,492		0,111	0,556	0,384	0,862	
linfedema (n=1) (p-valor)	0	1	10	55	92	1	1	1	1	0	0,091	0,710
	0,778		0,860	0,384	0,602	0,492		0,889	0,556	0,602	0,602	
Cefaleas (n=1) (p-valor)	0	1	12	68,9	96	1	0	1	1	0	0,058	0,512
	0,778		0,480	0,384	0,600	0,492		0,889	0,556	0,233	0,384	
Aftas/mucositis (n=2) (p-valor)	0	2	7,5	44,5	97	2	2	2	2	0	0,327	1,421
	0,583		0,691	0,602	0,068	0,526		0,778	0,278	0,794	0,602	
Astenia (n=1) (p-valor)	0	1	12	68,9	96	1	0	1	1	0	0,058	0,512
	0,778		0,480	0,118	0,384	0,755		0,889	0,556	0,223	0,384	
Desarreglo menstrual (n=2) (p-valor)	0	2	12,5	51	77	2	2	2	2	0	0,125	0,952
	0,583		0,185	0,296	0,602	0,335		0,778	0,278	1	0,558	

\*Los datos se presentan como media para variables continuas, o n para variables categóricas.

No se encontraron diferencias en la presencia de EEAA en función del sexo, edad, peso, percentil, tipo de manifestación de CET, tratamiento con antiepilépticos o antipsicóticos/ansiolíticos, dosis/peso ni dosis/ASC ajustada.

### 2.3. ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO

Se genotipó a todos los pacientes para cada uno de los polimorfismos descritos en el estudio. Los resultados obtenidos se presentan en el Anexo X. A continuación se detalla el análisis descriptivo de los resultados genotípicos obtenidos, así como la relación de cada una de las variantes respecto a las variables farmacocinéticas de EVE o incidencia de EEAA.

#### 2.3.1. Farmacogenética descriptiva de la población de estudio

Los 10 pacientes fueron genotipados para todas las variantes polimórficas. A través de la prueba X<sup>2</sup> se comprobó que todas las frecuencias genotípicas cumplieran con el HWE. Así mismo, se comprobó del mismo modo si existían diferencias genotípicas en la población de estudio respecto a la población Ibérica. Las frecuencias genotípicas obtenidas, las esperadas según HWE, y las presentes en la población Ibérica así como los estadísticos X<sup>2</sup> se muestran en la tabla 28.

Tabla 28, Prueba X<sup>2</sup> para la detección de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y de la frecuencia genotípica observada en la población Ibérica respecto a la cohorte del complejo de esclerosis tuberosa.

Variante (número rs)	Genotipo	Frecuencia observada n (%)	HWE		Población Ibérica*	
			Frecuencia esperada n (%)	Prueba X <sup>2</sup> (valor-p)	Frecuencia esperada n (%)	Prueba X <sup>2</sup> (valor-p)
<b>CYP3A5*3</b> (rs776746)	AA	0	0,025 (0,25)	0,027 (0,986)	1 (0,9)	1,819 (0,402)
	AG	1 (10)	0,95 (9,5)		14 (13,1)	
	GG	9 (90)	9,025 (90,25)		92 (86,0)	
<b>CYP3A4*1B</b> (rs2740574)	AA	9 (90)	9,025 (90,25)	0,027 (0,986)	101 (94,4)	N/A
	AG	1 (10)	0,95 (9,5)		6 (5,6)	
	GG	0	0,025 (0,25)		0	
<b>CYP3A4*22</b> (rs35599367)	CC	9 (90)	9,025 (90,25)	0,027 (0,986)	99 (92,5)	N/A
	CT	1 (10)	0,95 (9,5)		8 (7,5)	
	TT	0	0,025 (0,25)		0	
<b>CYP3A4*20 (Ins A)**</b> (rs67666821)	No Ins	10 (100)	10 (100)	N/A	1953 (98,8)	N/A
	No Ins/Ins	0	0		24 (1,2)	
	Ins/Ins	0	0		0	
<b>CYP2C8</b> (416 G>A) (rs11572080)	GG	7 (70)	7,225 (72,25)	0,311 (0,855)	77 (72%)	19,49 (<0,001)
	GA	3 (30)	2,55 (25,5)		28 (26,6%)	
	AA	0	0,225 (2,25)		2 (19%)	
<b>POR*28</b> (rs1057868)	CC	5 (50)	3,6 (36)	3,402 (0,182)	54 (50,5)	23,52 (<0,001)
	CT	2 (20)	4,8 (48)		46 (43,0)	
	TT	3 (30)	1,6 (16)		7 (6,5)	
<b>ABCB1 (3435 C&gt;T)</b> (rs1045642)	CC	1 (10)	1,6 (16)	0,625 (0,731)	32 (29,9)	12,476 (0,001)
	CT	6 (60)	4,8 (48)		51 (47,7)	
	TT	3 (30)	3,6 (36)		24 (22,4)	
<b>ABCB1 (1236 C&gt;T)</b> (rs1128503)	CC	2 (20)	2,5 (25)	0,4 (0,818)	40 (37,4)	13,956 (<0,001)
	CT	6 (60)	5 (50)		53 (49,5)	
	TT	2 (20)	2,5 (25)		14 (13,1)	
<b>ABCB1 (2677 G&gt;T/A)</b> (rs2032582)	GG	2 (20)	2,5 (25)	0,4 (0,818)	37 (34,6)	13,695 (<0,001)
	GT/GA	6 (60)	5 (50)		53/ 4 (49,5/3,7)	
	TT	2 (20)	2,5 (25)		12 (11,2)	
<b>PXR (c,69789 A&gt;G)</b> (rs7643645)	AA	2 (20)	2,5 (25)	0,4 (0,818)	43 (40,2)	10,632 (0,004)
	AG	6 (60)	5 (50)		53 (49,5)	
	GG	2 (20)	2,5 (25)		11 (10,3)	
	CC	0	1,225 (12,25)	2, 899 (0,234)	17 (15,9)	



<b>PXR (c,63396 C&gt;T) (rs2472677)</b>	CT	7 (70)	4,55 (45,5)	47 (43,9)	23,362
	TT	3 (30)	4,2 (42)	43 (40,2)	(<0,001)

N/A: no aplica, solo un genotipo obtenido.

\*La frecuencia esperada se ha obtenido en la base de datos Ensembl (97), basado en la fase 3 del "1000 Genomes Project".

\*\*La frecuencia esperada para este alelo se ha obtenido de (140).

Todas las variantes cumplían con el HWE. Para la variante *CYP3A4\*20* no se pudo calcular el HWE debido a que solo se obtuvieron genotipos *wildtype*. Las frecuencias genotípicas encontradas en la población de estudio presentaban diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a las presentes en la población Ibérica.

### 2.3.2. Relación de la farmacogenética con las variables farmacocinéticas

Se analizó la presencia de diferencias entre grupos genotípicos de cada variante y la dosis de EVE, dosis/peso y dosis/ASC ajustada. Los resultados del valor p para el estadístico utilizado se detallan en la Tabla 29.

**Tabla 29. Significación estadística (valor-p) para cada polimorfismo respecto a los datos farmacocinéticos de everolimus.**

Polimorfismo	Dosis	Dosis/peso	Dosis/ASC ajustada
<b>CYP3A5*3</b>	0,598	0,223	0,384
<b>CYP3A4*1B</b>	0,598	0,223	0,384
<b>CYP3A4*22</b>	0,160	0,384	0,117
<b>CYP3A4*20</b>	N/A	N/A	N/A
<b>CYP2C8</b>	0,546	0,655	0,655
<b>POR*28 (G416A)</b>	0,893	0,221	0,450
<b>ABCB1 (C3435T)</b>	0,558	0,441	0,652
<b>ABCB1 (C1236T)</b>	0,340	0,234	0,178
<b>ABCB1 (G2677T)</b>	0,340	0,234	0,178
<b>PXR (A69789G)</b>	0,247	0,964	0,234
<b>PXR (C63396T)</b>	0,645	0,425	0,732

N/A: no aplica, para aquellas variantes en las que no había más que un grupo genotípico.

No se encontraron diferencias entre genotipos para ninguna de las variables relacionadas con la dosis de EVE. La variante que mayor tendencia presentó a mostrar diferencias significativas fue el *CYP3A4\*22* respecto a la dosis y dosis/ASC ajustada. Concretamente, el paciente portador de esta variante presentó la dosis más baja de la cohorte (2,5 mg), así como la dosis/ASC ajustada más baja ( $0,30 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), siendo un 63,58% menos que la mediana de la cohorte. El paciente que presentaba la dosis y dosis/ASC ajustada más altas (12 mg y  $2.33 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  respectivamente) era el único portador de la combinación de las variantes C63396T del gen *PXR* y *POR\*28* en homocigosis.

Las variantes G2677T y C1236T del gen *ABCB1* también tenían tendencia a presentar diferencias significativas entre grupos respecto a la dosis/ASC ajustada, en particular respecto al genotipo *wildtype* ( $p=0,092$ ). Estas variantes se encontraron en un desequilibrio de ligamiento del 100% en la cohorte. Sin embargo, no se encontró dicha tendencia para la variante C3435T. Analizando la dosis y dosis/ASC ajustada entre grupos se observó que existía una tendencia para todas las variantes del gen *ABCB1* es una dosis/ASC ajustada mayor para el genotipo heterocigoto. Para la variante C3435T, además el genotipo *wildtype* tiene la menor dosis/ASC. Analizando las variantes agrupadas en haplotipos, el haplotipo *wildtype* presentaba la menor dosis y dosis/ASC ajustada (promedio de 3,75 mg y  $0,509 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  respectivamente) seguido del haplotipo en homocigosis (TTT, 4mg y  $0,844 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  respectivamente), y el haplotipo en heterocigosis (6,58 mg y  $1,058 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  respectivamente).

La Figura 28 muestra el diagrama de cajas y bigotes de la dosis/ASC ajustada para ambas variantes.

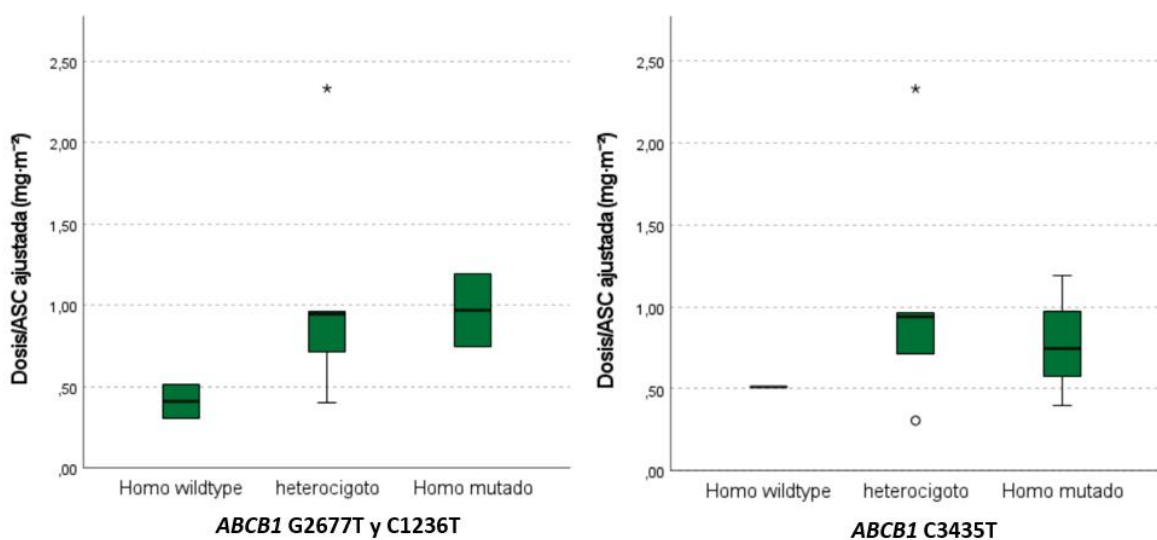


Figura 28. Diagrama de cajas y bigotes de la dosis/ASC ajustada para las variantes G2677T y C3435T de everolimus.

Respecto al análisis para el paciente portador de las variantes *CYP3A4\*1B-CYP3A5\*1* se constató que no se existían diferencias farmacocinéticas relevantes respecto al resto de pacientes.

### **2.3.3. Relación de la farmacogenética con la presencia de efectos adversos**

Se analizaron las diferencias entre grupos genotípicos de los polimorfismos analizados en la incidencia de EEAA con la terapia de EVE. Así mismo, la presencia de hipercolesterolemia no se relacionó con ninguna variante en concreto, existiendo cierta tendencia significativa a existir diferencias frente a las variantes G2677T y C1236T del gen *ABCB1* ( $p=0,108$  para ambas), pero si existiendo diferencias cuando se dividía a la cohorte entre portadores y no portadores del haplotipo TT-TT-TT del gen *ABCB1* en homocigosis ( **$p=0,035$** ). No se encontraron diferencias significativas para la variante *POR\*28* ( $p=0,274$ ), aunque el único paciente con hipercolesterolemia presentaba genotipo *POR\*28/\*28*. En cuanto al SNP *CYP3A4\*22* no se encontraron diferencias en la presencia de infecciones respiratorias ( $p=0,200$ ), pero sí cuando se trataban concretamente de neumonía ( **$p=0,035$** ), presentando dicho efecto adverso el único paciente portador del alelo *CYP3A4\*22*.

Por otro lado, la presencia de astenia y cefaleas presentaba diferencias entre genotipos C3435T del gen *ABCB1* ( **$p=0,007$**  para ambos). El único paciente con estos EEAA era así mismo el único portador del genotipo *wildtype*. Finalmente, hubo diferencias en la presencia de aftas entre portadores de los alelos *CYP3A4\*1B* y *CPYP3A5\*1* ( **$p=0,035$** ), ya que el único portador de estos alelos prestaba este EEAA.



# **SUMMARY OF RESULTS**



## SUMMARY OF RESULTS

### 1. STUDY OF TACROLIMUS IN A COHORT OF 27 TRANSPLANT PATIENTS

In the tacrolimus cohort, significant differences were observed in patients with recurrent anaemia and weight-adjusted dose ( $p=0.023$ ), while none were observed for blood levels (Co). Also, patients with anaemia had significantly more therapy-related adverse effects ( $p=0.016$ ).

Regarding pharmacogenetic analysis, four patients with *CYP3A5\*1* genotype (*CYP3A5* expressors) were found in the study cohort, of which two were also *CYP3A4\*1B* carriers. Significant differences in tacrolimus weight-adjusted dose ( $p=0.027$ ), and a trend regarding dose-adjusted Co adjusted ( $p=0.056$ ) were found between *CYP3A4\*1B* allele carriers and non-carriers (Figures 24 and 25). No significant differences were found for weight-adjusted dose in *CYP3A5\*1* carriers. Comparing groups, *CYP3A5\*1-CYP3A4\*1B* individuals had a higher total dose and weight-adjusted dose than *CYP3A5\*1-CYP3A4\*1* carriers and *CYP3A5* non-expressors (5.5 mg and  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  versus 3.5mg and  $0.047 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and 2.9 mg and  $0.047 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectively). Specifically, both *CYP3A4\*1B* carriers had the highest weight-adjusted dose and the lowest dose-adjusted Co in the cohort (Figure 23).

For the *ABCB1* gene, significant weight-adjusted dose differences were observed at SNPs C3435T and G2677T ( $p=0.27$  and  $p=0.26$ ). Analysing the data, a lower average weight-adjusted dose was found in TT genotypes ( $0.025 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for G2677T than in GT ( $0.06 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or GG ( $0.040 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). However, for the C3435T allele, a higher weight-adjusted dose was found in CT carriers ( $0.062 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) than in TT ( $0.047 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or CC ( $0.031 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) carriers. Adjusting the data to remove the effect of *CYP3A4\*1B*, the statistical trend was maintained for G2677T ( $p=0.06$ ), whereas for C3435T it was not ( $p=0.111$ ) (Figure 26). For the *PXR* gene, significant differences in weight-adjusted dose ( $p=0.045$ ) were also found for the A69789G variant, which disappeared when adjusting for remove the *CYP3A4\*1B* allele effect.

In the analysis of adverse effects, statistical differences were found ( $p=0.046$ ) in carriers of the *CYP3A4\*1B* allele. 100% of carriers had liver damage compared to 18.18% in wildtype patients. The same difference was found for *PXR* A69789G ( $p=0.015$ ) where 66.66% of patients showing liver damage were homozygous mutated, compared to 8.33% heterozygous or 12.5% wildtype. Crossing both variants, 66.66% of the patients presenting liver damage were carriers of the *CYP3A4\*1/\*1B-PXR* 69789GG combination (Table 22). All were liver transplant recipients.

Regarding the *ABCB1* gene, there were significant differences ( $p=0.029$ ) between genotypes for the G2677T variant, with 100% of the homozygous mutants showing nephrotoxicity compared to 37.5% of the wildtype subjects. No differences were obtained for the rest of polymorphisms.

Also significant differences ( $p=0.035$ ) were found in the presence of gastrointestinal effects between T allele carriers of the C1236T *ABCB1* SNP and non-carriers. The same trend was observed for the G2677T variant ( $p=0.079$ ). Focusing on haplotypes, it was found that 64,7% of carriers of the heterozygous or homozygous mutated haplotype had gastrointestinal compared to 28,5% of carriers for the wildtype haplotype ( $p=0.048$ ).

## 2. STUDY OF EVEROLIMUS IN A COHORT OF 10 PAEDIATRIC PATIENTS WITH TUBEROUS SCLEROSIS

For the study of the cohort of everolimus, the dose/ASC adjusted for the type of tuberous sclerosis indication (RAML, SEGA or epilepsy) and the presence of CYP3A4 inducers was calculated (hereafter, adjusted dose/ASC). Large inter-patient variations in adjusted dose/ASC were observed, with two extreme values (Figure 27): one patient with an upper end adjusted dose/ASC value of  $2.33 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ , and the highest daily dose in the cohort (12 mg); and another patient at the opposite extreme, with an adjusted dose/ASC value of  $0.30 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ , and the lowest daily dose in the cohort (2.5 mg).

No differences were found in dose ( $p=0.510$ ), weight-adjusted dose ( $p=0.794$ ) or adjusted dose/ASC ( $p=0.296$ ) according to the manifestation of tuberous sclerosis for which everolimus was prescribed (SEGA, RAML or refractory epilepsy), nor according to the presence of CYP3A4 inducers, inhibitors or substrates ( $p>0.05$ ). Both of these, together with ASC are criteria for establishing the initial dose of everolimus in tuberous sclerosis complex.

No differences were found between genotypes for any of the everolimus dose-related variables. The variant with the highest statistic tendency was *CYP3A4*\*22 with respect to dose and dose/adjusted ASC. Specifically, the patient with this variant had the lowest everolimus total dose in the cohort (2.5 mg) as well as the lowest adjusted dose/ASC ( $0.30 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), being a 63.58% lower than the median. Likewise, the patient with the highest dose and adjusted dose/ASC (12 mg and  $2.33 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  respectively) was the only carrier of the combination of the *PXR* C63396T and *POR*\*28 variants in homozygosis. This combination was not found in the tacrolimus cohort.



Analysing *ABCB1* gene, it was observed that there was a trend for all *ABCB1* SNPs to higher adjusted dose/ASC for the heterozygous genotype (Figure 28).

Finally, in relation to adverse effects, significant differences were observed between carriers and non-carriers of the TT-TT-TT haplotype of the *ABCB1* gene in homozygosis (**p=0.035**) and the presence of hypercholesterolaemia, as well as for *CYP3A4*\*22 carriers and pneumonia (**p=0.035**).



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La investigación llevada a cabo ha evaluado los factores demográficos, clínicos y genéticos que contribuyen a predecir o explicar la respuesta inmunosupresora en pacientes en tratamiento con TAC y EVE para TOS y CET respectivamente. Estos factores han sido valorados como posibles causantes de las diferencias individuales observadas en la respuesta terapéutica.

A continuación, se va a detallar en cada uno de los siguientes apartados la discusión de los resultados obtenidos para cada estudio respecto a ambos fármacos.

### 1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE TACROLIMUS EN PACIENTES CON TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO.

En el estudio realizado en pacientes con TOS en tratamiento con TAC se evaluó la asociación de las variables farmacocinéticas, la respuesta terapéutica y la presencia de EEAA con distintas variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas.

#### 1.1. EDAD, SEXO, PESO Y FALTA DE ADHERENCIA.

En la terapia inmunosupresora del paciente trasplantado, normalmente las dosis de inicio son superiores a las de mantenimiento ya que se busca una alta inmunosupresión inicial para evitar el rechazo agudo del injerto. En el uso de TAC como prevención del rechazo del injerto, las guías de práctica clínica establecen unas dosis de inicio recomendadas basadas en el peso del paciente y en función de la presencia o no de otros fármacos inmunosupresores. Así mismo, las dosis recomendadas varían en función del tipo de trasplante. Las dosis iniciales recomendadas son superiores para la profilaxis de rechazo del injerto renal frente al hepático, y estas superiores al cardiaco y pulmonar. Respecto a la edad y sexo no se establecen diferencias salvo en el caso de la población pediátrica en el que las dosis por peso son superiores frente a la población adulta. En la terapia de mantenimiento, la dosis de TAC debe ser ajustada hasta alcanzar unos niveles valle dentro del rango terapéutico, normalmente entre 5 y 15 ng·ml<sup>-1</sup>, aunque según el consenso europeo de expertos se acota a 5-10 ng·ml<sup>-1</sup> si >12 meses post-trasplante hepático, renal o cardiaco, en ausencia o combinación con AMF o corticoides (210). Sin embargo, el estudio *Symphony* predefinió el rango 4-8 ng·ml<sup>-1</sup> como las concentraciones objetivo para lograr la mejor función del aloinjerto y reducción de EEAA manteniendo la efectividad(211). En casos de combinación con fármacos mTOR, como EVE, los niveles objetivo se reducen a 3-7 ng·ml<sup>-1</sup>. Sin embargo, tanto los requerimientos de dosis como de niveles objetivo varían ampliamente entre zonas, principalmente diferenciadas por la etnia del paciente (212).

A pesar de que existen estas diferencias en los requerimientos de TAC, se observan grandes variaciones interindividuales entre individuos, que, aunque se ven acentuadas cuando se comparan sujetos pertenecientes a diferentes etnias, también se dan entre sujetos pertenecientes a la misma. Como se ha mencionado anteriormente, la dosis de fármaco es ajustada por el médico en función de la respuesta observada y los niveles objetivo (rango terapéutico). Así mismo, alrededor de un 30% de los pacientes sufren fluctuaciones intraindividuales, es decir, en sus propios niveles sanguíneos de TAC, aun tomando la misma dosis oral. Entre las causas de las variaciones intraindividuales se encuentra la falta de adherencia, la irregularidad horaria en las tomas, la interferencia con alimentos y otros fármacos. Varios estudios en trasplantados renales han asociado estas variaciones a una menor supervivencia del injerto, mayor riesgo de rechazo y peor función renal. Entre las causas se encuentra la fluctuación por debajo del límite crítico de inmunosupresión ( $4\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (213).

En nuestro estudio, casi todos los pacientes (96,2%) llevaban trasplantados más de 12 meses, por lo que las dosis y concentración en sangre objetivo correspondían a las indicadas para terapia de mantenimiento. La mayor parte fueron trasplantes hepáticos seguido de renales.

La edad podría influir en la farmacocinética de TAC debido a la disminución del tamaño hepático, flujo sanguíneo y la actividad metabólica del CYP450 que se genera fisiológicamente con el aumento de la edad. Concretamente, se ha observado mayor efecto sobre el CYP3A4 y la aclaración de fármacos metabolizados por esta vía, disminuyendo entre un 30-50% en mayores de 65 años en comparación con adultos jóvenes. El menor efecto sobre el CYP3A5 puede reflejarse en su mayor presencia extrahepática frente a su expresión en hígado(214). En nuestro análisis, no se encontraron diferencias en la  $\text{Co ni Co/dosis}$  de TAC en función de la edad, por lo que no se podría concluir que es un factor determinante en la población del estudio.

Sin embargo, se encontraron diferencias cercanas a la significación en la dosis/peso, teniendo una relación inversa (aunque débil), es decir, los pacientes más jóvenes presentaban una dosis/peso mayor. Esto tiene sentido si se tiene en cuenta que en la población pediátrica las dosis/peso pautadas suelen ser mayores que en adultos por el metabolismo aumentado de los primeros. Sin embargo, tan solo había dos pacientes pediátricos dentro del estudio (13 y 15 años), y solo uno de ellos presentaba una dosis/peso superior a  $0,1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

El sexo también parece determinar la actividad CYP450, siendo para algunos citocromos como el CYP1A2 más activo en hombres, mientras que en otros como el CYP3A4 la actividad es mayor en mujeres (215). En nuestro estudio, como era de esperar, hubo diferencias en el peso entre ambos sexos, presentándose mayor promedio en hombres. Sin embargo, no se encontraron

diferencias en la dosis ajustada al peso ni en los niveles en sangre entre sexos, ni aún ajustando por rangos de edad, por lo que tampoco se puede concluir que el sexo fuera un factor determinante en la población del estudio. Respecto al estado nutricional, algunos ensayos han concluido que la presencia de obesidad se asocia a un metabolismo CYP3A4 disminuido (216). Pocos ensayos han estudiado la influencia de la composición corporal diferenciando entre masa grasa y masa libre de grasa en la farmacocinética de TAC. Concretamente, el estudio llevado a cabo por Storset et al. (2014) determinó que el volumen de distribución de TAC estaba más relacionado con la masa libre de grasa que con el peso corporal total per se, indicando que la extensión de la distribución tisular de TAC puede determinarse principalmente mediante la unión a proteínas en tejidos magros, pudiendo llevar a una sobredosificación en pacientes con obesidad al no tenerse en cuenta (217). En nuestro estudio no se encontraron diferencias entre el estado nutricional (basado en el IMC o percentil para la edad y sexo en <18 años) y la dosis, niveles en sangre u otro parámetro farmacocinético; si bien es cierto que tan solo un paciente presentaba obesidad. No se obtuvieron otros valores relativos a la composición corporal, por lo que no se pudo evaluar la influencia de la masa libre de grasa.

Por otra parte, uno de los problemas sorprendentemente frecuentes es la falta de adherencia de los pacientes trasplantados respecto al tratamiento inmunosupresor. Esto se asocia a la politerapia que suelen tener estos pacientes, además de los EEAA asociados al tratamiento inmunosupresor. La adherencia suele ser mayor durante los 6 primeros meses post-trasplante, pero posteriormente se reduce de forma importante, habiendo sido relacionada con causas de rechazo mediados por anticuerpos (23). En nuestro estudio, cinco pacientes refirieron olvidar la toma de TAC de forma muy puntual e involuntaria. No se relacionó con la presencia de signos de rechazo o casos de retrasplante. Si bien es cierto, que la recogida de datos sobre adherencia tiene sus limitaciones ya que los pacientes muchas veces no son sinceros al respecto.

## **1.2. TIEMPO POST-TRASPLANTE, FUNCIÓN HEPÁTICA Y DIARREA.**

La monitorización de los niveles sanguíneos tiene sentido cuando se asume que la presencia de niveles de TAC en rango se relaciona con una efectividad terapéutica óptima y la ausencia de efectos adversos; sin embargo, esto no siempre es así. Así mismo, a pesar del control rutinario, una parte importante de los pacientes se encuentra en niveles sub o supraterapéuticos. En nuestro estudio, el 44,45% de los pacientes de los que se obtuvieron niveles valle no estaban dentro del rango terapéutico. Por lo tanto, a pesar de la estrecha monitorización que se requiere para este fármaco, la existencia de variabilidad puede desencadenar la presencia de ineffectividad terapéutica o EEAA. Concretamente, todos estaban por debajo del rango

terapéutico y ninguno presentaba niveles supraterapéuticos. A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas entre la presencia de niveles subterapéuticos de TAC y haber sufrido signos de rechazo del injerto (agudo o crónico), el 50% de los pacientes fuera de rango había sufrido algún tipo de signo de rechazo. Concretamente los dos pacientes con menor Co/dosis se encontraban con una  $Co < 4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  y ambos presentaron episodios de signos de rechazo o disfunción del injerto.

Como se ha mencionado, la dosis inicial de TAC post-trasplante se pauta en función del peso y tipo de injerto recibido, debiendo ser ajustada posteriormente en función de los niveles objetivo y la evolución terapéutica; sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en la dosis ni dosis/peso en función del tipo de injerto. Tampoco se encontró una asociación entre la dosis y el peso, por lo que las modificaciones llevadas a cabo hasta obtener la dosis de mantenimiento se vieron influenciadas por otros parámetros. Entre las posibles causas que afectan a la variabilidad en la farmacoterapia con TAC, se han descrito diferentes covariables (218). Una de las covariable más importantes descrita es el genotipo para el citocromo *CYP3A5*, el cual se discutirá más adelante (apartado 1.6.1.). El tiempo post-trasplante es otro factor determinante, mostrando un efecto importante sobre el aclaramiento de TAC en el periodo agudo post-trasplante, el cual se ve aumentado paulatinamente hasta aproximadamente un mes tras la cirugía. El impacto es dos veces superior en el trasplante hepático sobre el renal. La mejora en el aclaramiento se debe a una regeneración progresiva del hígado que conduce a una progresión de la función hepática documentada por el aumento de la motilidad gastrointestinal y las funciones metabólicas (218). Sin embargo, este factor es descartado en nuestro estudio por presentar todos los pacientes salvo uno, un tiempo post-trasplante superior a un año. La paciente que había sido trasplantada recientemente presentaba la dosis/peso de inicio indicada para su tipo de trasplante ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , siendo trasplante hepático).

Por otro lado, la función hepática también ha sido relacionada con la biodisponibilidad oral de TAC, donde pacientes con disfunción hepática presentaban mayor biodisponibilidad por una reducción del efecto de primer paso hepático comparación con pacientes con función hepática normal. Sin embargo, nuestro estudio, no se relacionó ninguna variable farmacocinética con la función hepática.

La presencia de diarrea también parece influir sobre la biodisponibilidad oral a fármacos, ya que produce un tránsito intestinal acelerado que se relaciona con menores niveles de algunos fármacos como es el caso de ciclosporina (219). Sin embargo, es interesante el caso de TAC donde varios estudios relacionan la diarrea con unos niveles en sangre de TAC hasta tres veces



superiores, llegando a producir toxicidad. El mecanismo por el que sucede este fenómeno es supuestamente una función alterada de la gp-p y CYP3A4 intestinales producidos por la inflamación e infección asociadas a la diarrea, permitiendo una mayor absorción de TAC a través de intestino e incluso colon (49). Los pacientes que presentaban diarrea en nuestro estudio presentaban niveles sanguíneos de TAC ligeramente superiores a los pacientes sin diarrea, pero sin ser diferencias destacables. Tampoco se tienen datos sobre la presencia concreta de diarrea durante la toma de los niveles sanguíneos.

Finalmente, una de las limitaciones de la rutina de práctica clínica en el paciente trasplantado con TAC es la monitorización terapéutica a través de los niveles valle en sangre entera. Aunque muchos estudios muestran buena correlación entre la  $C_0$  y el AUC de TAC, la parte activa de fármaco corresponde a la fracción libre en plasma, no teniendo que ser directamente proporcional a los niveles de TAC en sangre. Esto es así, ya que medir los niveles de TAC en plasma conlleva mayores dificultades y no se han establecido procedimientos estandarizados. Como se ha discutido anteriormente, el hematocrito es un factor determinante de esta relación. Así mismo, los niveles de albumina y la glicoproteína ácida alfa-1, proteínas a las que se une TAC en >98% en plasma, también afectan a su disposición de TAC. Pero más allá, la proporción de fármaco que verdaderamente produce la acción terapéutica es aquella que atraviesa la membrana linfocitaria para ejercer su acción a nivel citosólico. El paso de TAC al interior celular está condicionado por la gp-p, proteína que se expresa en la membrana celular de linfocitos. Por tanto, factores que afecten a la expresión y actividad de esta proteína serán determinantes en la efectividad terapéutica final. En este sentido, bajo una inhibición o mínima expresión de esta proteína es posible observar una acción inmunosupresora óptima e incluso presentar EEAA con niveles valle de TAC subterapéuticos; así como presentar riesgo de rechazo por una inmunosupresión insuficiente ante niveles en rango terapéutico de TAC bajo una inducción o sobreexpresión de esta proteína. Ciertos fármacos han demostrado actuar como inductores o inhibidores de la gp-p, aunque existen muchos otros mecanismos como la intervención de factores de transcripción o la presencia de polimorfismos genéticos que afectan a la secuencia de aminoácidos de esta proteína, los cuales se discutirán posteriormente.

### **1.3. HEMATOCRITO Y PROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

Por otro lado, el valor del hematocrito también suele ser relevante, el cual representa el volumen de sangre entera ocupado por los eritrocitos, siendo especialmente importante ya que TAC se une extensamente a estos (>98%). La concentración en sangre total es la concentración promedio ponderada de las fracciones de plasma (parte activa) y eritrocitos. Un cambio en el

hematocrito afectará a la concentración en sangre, sin afectar la concentración plasmática libre (farmacológicamente activa). Por tanto, un hematocrito bajo da como resultado una exposición más baja en sangre total y, por lo tanto, puede interpretarse incorrectamente como un mayor aclaramiento aparente de TAC en sangre total, mientras que realmente las concentraciones plasmáticas permanecen sin cambios. El hematocrito tiende a cambiar en el período posterior al trasplante renal, encontrándose niveles bajos tras la cirugía y aumentando sustancialmente durante los primeros meses posteriores al trasplante mientras se produce la recuperación del riñón y aumentan los niveles de eritropoyetina. Este no es un factor delimitante en nuestro estudio ya que casi todos los pacientes llevaban más de un año trasplantados. Sin embargo, el hematocrito puede verse afectado igualmente en el periodo a largo plazo post-trasplante, como por ejemplo en casos de anemia, pudiendo afectar a la eficacia terapéutica de TAC. Algunos autores concluyen que niveles de hematocrito fuera del valor óptimo (aproximadamente 36-48% para mujeres, 43-52% para hombres y 30-44% para niños) pueden ser críticos en la eficacia terapéutica, ya que puede conducir a reajustes de dosis inadecuados. De hecho, algunos estudios han desarrollado fórmulas para calcular y ajustar el efecto del hematocrito sobre la concentración de TAC, haciendo estimaciones sobre un valor de hematocrito normalizado del 40 o 45% (220). Una limitación de nuestro estudio es la falta de datos respecto al hematocrito, aunque sí se disponían de datos sobre la predisposición a anemia como EEAA, la cual podría ser indicador de un hematocrito bajo. Ciertos estudios recomiendan el uso de fórmulas de reajuste en función del hematocrito en pacientes trasplantados con anemia, ya que se trata de un EEAA frecuente tras el trasplante(220). Así mismo, el tratamiento inmunosupresor puede producir o agravar la anemia por sus efectos antiproliferativos y una peor respuesta eritropoyética medular (221). En nuestro estudio, no se relacionó estadísticamente la anemia con los niveles de TAC en sangre mientras sí que se encontraron diferencias significativas con la dosis/peso, donde los pacientes que presentaban anemia tenían mayor promedio, concretamente un 41,3% más. Esto concuerda con lo anteriormente descrito, donde los niveles de TAC tienden a verse subestimados, conduciendo a un aumento de la dosis para alcanzar el supuesto rango terapéutico, y aumentando de esta manera la fracción libre de fármaco. Concretamente, de los pacientes que presentaban anemia, aquellos con mayor dosis/peso presentaban significativamente mayor número de EEAA, pudiéndose deber a la toxicidad inducida por una fracción libre de fármaco aumentada.

Por otro lado, dado que el 99 % del TAC en el plasma se une a las proteínas, principalmente a la albúmina y a la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1, variaciones en estas proteínas también podrían

influenciar la fracción libre de fármaco. Sin embargo, ciertos estudios no demuestran relación al respecto (217). En nuestro estudio, no se recogieron datos sobre proteínas plasmáticas.

#### **1.4. TRATAMIENTOS CONCOMITANTES**

Solo hubo un paciente con EVE, el cual presentaba una dosis/peso de las más bajas encontradas, concordando con los menores niveles en sangre objetivo que se buscan en pacientes con terapia mTOR concomitante. No se disponían de niveles en sangre de este paciente para corroborarlo.

El micofenolato mofetilo (éster profármaco del ácido micofenólico) se asocia a EGI descritos en ficha técnica como muy frecuentes. Posteriormente, se desarrolló la sal sódica del AMF con cubierta entérica para disminuir los EGI asociados a este principio activo, sin embargo, la incidencia de estos sigue siendo alta, y ambas formulaciones están comercializadas actualmente en España, bajo las marcas comerciales de Cellcept® y Myfortic® respectivamente (222). En nuestro estudio aproximadamente la mitad de la población tomaba AMF, bien Cellcept® o como Myfortic®, no relacionándose con EGI ni cuando se diferenciaba entre ambas marcas. Cabe mencionar que, aunque usualmente se asocia la presencia de EGI al AMF, TAC ha sido asociado de manera independiente a la presencia de estos EEAA en pacientes trasplantados (223). Por otro lado, en nuestra cohorte sí que se asoció la toma de AMF con episodios de rechazo agudo donde la totalidad de los casos de rechazo fueron en pacientes que no tomaban MFA. Esta relación puede reflejar la sinergia inmunosupresora en aquellos pacientes con terapia combinada de TAC+AMF, ya que realmente se persiguen las dosis en sangre de TAC para pacientes con o sin MFA.

Por su parte, gran parte de los pacientes con TOS toman corticoides como inmunosupresión de apoyo en el periodo a corto plazo post-trasplante siendo algunas veces retirados paulatinamente, pero muchas otras se encuentran en la terapia crónica del paciente trasplantado a largo plazo. Es conocido que esta familia de fármacos tiene varios EEAA relacionados como la retención hídrica y consecuente aumento de la tensión arterial, osteoporosis, úlcera gastroduodenal y aumento de la resistencia a la insulina, entre otros (224). Normalmente, el fármaco de elección es la prednisona oral. En nuestro estudio, se relacionó la toma de prednisona con la presencia de HTA. Concretamente, el 90% de los pacientes con esta patología tomaban prednisona, y así mismo, el promedio de dosis de los pacientes que tomaban el fármaco era mayor en aquellos que presentaban HTA frente a los que no, mostrando su efecto hipertensivo. Aunque TAC presenta menos incidencia de HTA que ciclosporina, es probable que suponga un efecto sinérgico junto a prednisona potenciando la hipertensión arterial en estos pacientes.

Es frecuente que la terapia inmunosupresora se asocie a la toma de IBP para la profilaxis de úlceras gástricas y duodenales, producidas principalmente por estos dos fármacos (188). El principal IBP, en el 83,3% de los casos omeprazol. La toma de IBP tampoco se relacionó con ningún EEAA, pero sí con la toma de prednisona y de AMF. En nuestro estudio, el 64,3% de los pacientes que tomaban prednisona tomaban IBPs, y 71,4% de los pacientes que tomaban MFA tomaban IBPs

Por último, la toma de estatinas no se vio relacionada con la presencia de dolores ni problemas osteomusculares, un EEAA común en pacientes que toman estos hipolipemiantes (225).

#### **1.4.1. Sustratos, inhibidores e inductores de CYP3A4 y gp-p**

Los pacientes con TOS generalmente son pacientes polimedicados, además de por la terapia dirigida a la profilaxis del rechazo del injerto, por la inclusión de fármacos concomitantes enfocados a paliar o tratar los EEAA adyacentes que habitualmente aparecen por la terapia inmunosupresora, así como otras patologías propias del paciente. No es difícil por tanto, que se incluyan fármacos que actúen como inhibidores o inductores de los citocromos metabolizadores de TAC (CYP3A5, CYP3A4) o de sus proteínas de transporte (gp-p). Así mismo, la presencia de sustratos de estas mismas proteínas puede producir una interacción competitiva por su unión, sobre todo si se pautan a altas dosis. Entre los fármacos frecuentemente pautados en pacientes con TOS y que son sustratos del CYP3A4 se encuentran las estatinas (agentes hipolipemiantes), EVE y las benzodiazepinas (agentes sedantes y ansiolíticos); mientras que EVE y prednisona son sustratos de la gp-p. En nuestro estudio, ninguno de estos fármacos demostró influencia en los parámetros farmacocinéticos o la incidencia de EEAA.

Por su parte, la presencia de inhibidores e inductores influye directamente sobre la función metabólica del CYP, provocando un aumento o disminución del metabolismo de TAC. Los corticoides se han asociado a una inducción del CYP3A4. En nuestro estudio, 14 pacientes tomaban prednisona y no hubo asociación de esta con una inducción enzimática, si bien es cierto que dicha inducción se asocia más a dexametasona que prednisona.

En cuanto a los inhibidores, los IBP han demostrado inhibir la actividad tanto del CYP3A4 como de gp-p, además de ser sustratos de ambos (55). Esta inhibición difiere en magnitud entre diferentes IBP, siendo rabeprazol la opción más segura por su metabolismo no enzimático y menor inhibición de estas proteínas (54). Siendo que gran parte de los pacientes trasplantados tienen pautado algún IBP, en su mayor parte omeprazol, es posible que se puedan producir interacciones farmacológicas por esta vía. Omeprazol es metabolizado principalmente por el citocromo CYP2C19, y en menor medida por el CYP3A4. Cuando se presenta un CYP2C19

alterado o afuncional, el metabolismo de omeprazol se desplaza al CYP3A4, generando una interacción con TAC por esta vía. Se han descrito casos previos de esta interacción, y se concluye que rabeprazol supone una opción más segura (226).

Es frecuente que los antivirales sean inhibidores potentes del CYP3A4, debiendo tener especial precaución cuando estos son pautados. En el momento de la recogida de datos del estudio, ningún paciente estaba en tratamiento con antivirales, salvo uno con lamivudina. Concretamente este fármaco no es metabolizado ni induce o inhibe el CYP3A4, suponiendo una opción segura (227).

### **1.5. EFECTOS ADVERSOS**

No se encontraron diferencias en la Co/dosis respecto a ningún EEAA; sin embargo, los resultados pudieron no ser concluyentes debido al bajo número de casos de los que se disponía niveles en sangre dentro de cada subgrupo

En el estudio se observó que la edad estaba directamente relacionada con la presencia de EEAA de la medicación, presentándose menor número conforme aumentaba la edad. Este resultado es contrario a lo que se esperaba encontrar ya que gran parte de los EEAA relacionados con TAC son patologías con alta incidencia en la población adulta no trasplantada como la HTA, dislipidemia y presencia de dolores o trastornos osteomusculares.

En nuestro estudio se observó una diferencia significativa en la presencia de nefrotoxicidad en función del sexo, siendo más frecuente en hombres. En general, se sabe que existen diferencias de género en las enfermedades renales y se ha observado que la enfermedad renal crónica progresa más rápidamente en hombres que en mujeres. Se cree que una de las razones por las que las mujeres presentan una enfermedad renal más leve es la influencia de hormonas femeninas. Los estrógenos influyen en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, inhibiendo la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y disminuyendo la angiotensina II renal, la cual se asocia a efectos nefroprotectores. Un estudio reciente de Nakata et al. (2022) corroboró que los hombres son más propensos a la nefrotoxicidad inducida por TAC que las mujeres (228). Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente descrito, aunque no se puede asegurar la relación de los niveles de estrógenos con una protección frente a la nefrotoxicidad inducida por TAC a falta de más datos.

En cuanto al peso, se relacionó la presencia HTA con un peso promedio 13,3kg superior al grupo sin HTA. Esta diferencia de pesos entre grupos suponía la transición de un estado nutricional promedio de normopeso, a sobrepeso en los pacientes con HTA. La relación entre el peso y la

presión arterial está bien establecida. A pesar de que existen diferencias entre distintas fuentes, se prevé un aumento promedio de 4 mmHg en la tensión arterial sistólica por cada 4,5kg de ganancia de peso corporal (229). Esto supone unas cifras de 11,82 mmHg superiores en el grupo con mayor peso corporal, siendo la presión sistólica óptima de 120 mmHg.

## 1.6. CONSIDERACIONES SOBRE LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

Tras lo anteriormente descrito, se podría decir:

- A pesar de la monitorización de los niveles en sangre de TAC, gran parte de los pacientes se encuentran fuera del rango terapéutico. Antes de realizar un reajuste de dosis debe tenerse en cuenta la adherencia del paciente, la existencia de anemia, el hematocrito o niveles de albúmina bajos, o presencia inductores enzimáticos ya que puede producirse toxicidad si no se tienen en cuenta estos parámetros.
- Cuando se encuentren niveles altos del fármaco en sangre, previamente a realizar un ajuste de dosis debe tenerse en cuenta la función hepática, presencia de EGI como diarrea, inhibidores enzimáticos, interacciones medicamentosas por competición u otras patologías que puedan generar una disfunción en el metabolismo.

## 1.7. FARMACOGENÉTICA

### 1.7.1. Genotipo de *CYP450* (metabolismo tacrolimus)

La farmacogenética ha evolucionado considerablemente durante los últimos años en el campo de la inmunosupresión. Existen numerosos artículos científicos enfocados a describir la relación de polimorfismos genéticos con la farmacocinética de TAC, más que con la farmacodinamia. A pesar de ello, establecer la relación genotipo-fenotipo de variantes aisladas es difícil, y existen controversias en los resultados para la mayoría de los polimorfismos descritos. El gen que con diferencia ha sido más ampliamente estudiado y se han establecido conclusiones más sólidas es el *CYP3A5*. Incluso, se ha incluido el SNP más representativo de este gen (*CYP3A5\*3*) en diversas guías farmacoterapéuticas validadas por sociedades internacionales, como es CPIC (101).

El alelo *CYP3A5\*3* se asocia a una enzima afuncional, afectando en gran medida al fenotipo metabolizador del individuo (230). En general, se clasifica a los individuos *CYP3A5\*1/\*1* como metabolizadores rápidos, a los *CYP3A5\*1/\*3* como metabolizadores intermedios y a los *CYP3A5\*3/\*3* como metabolizadores pobres o no expresores de la enzima. Sin embargo, la frecuencia alélica varía enormemente entre etnias, siendo minoritario en España (7,2%), mientras que en los asiáticos ronda el 33% o en los africanos el 82% (97). Las dosis recomendadas

para sujetos no portadores de esta variante son 1,5-2 veces superiores a las recomendadas para sujetos portadores sin expresión enzimática. La Co/dosis se reduce a la mitad en el caso de CYP3A5-expresores frente a no expresores, tanto a corto plazo como 12 meses post-trasplante (231).

Es por eso, que en la práctica clínica cuando no se conoce el genotipo del paciente, se ha demostrado la necesidad de mayor número de reajustes de dosis y tiempo hasta llegar a niveles terapéuticos de TAC post-trasplante en portadores del alelo *CYP3A5\*1* frente a no expresores, tanto en adultos como en población pediátrica (232,233). En un estudio realizado en España en 400 trasplantados renales con un rango objetivo de TAC en sangre de 5-10 ng·ml<sup>-1</sup> reflejó que tras un año de tratamiento, la dosis necesaria para portadores del alelo *CYP3A5\*3* era de 0,08mg·kg<sup>-1</sup> mientras que para no-expresores se reducía a 0,05 mg·kg<sup>-1</sup> (112). Recientemente, un estudio GWAS en 251 trasplantados renales chinos que evaluaba más de 773.000 SNPs, concluyó que la edad, sexo, hematocrito y genotipo *CYP3A5\*3* explicaban una intervariabilidad en los niveles de TAC del 37,34% (234). Adicionalmente, dos variantes del citocromo *CYP3A4* han demostrado, con gran evidencia al respecto, afectar a la farmacocinética de TAC: el *CYP3A4\*1B* y *CYP3A4\*22*. Algunos estudios clasifican la combinación de genotipos *CYP3A5* y *CYP3A4* para distinguir entre fenotipos metabolizadores. Cuando se incluyen las variantes *CYP3A5\*3*, *CYP3A4\*1B* y *CYP3A4\*22*, se describen los siguientes fenotipos: metabolizadores intermedios o normales (portadores de al menos un alelo *CYP3A5\*1*), metabolizadores lentos (portadores de dos alelos *CYP3A5\*3* o al menos un alelo *CYP3A4\*22*) y metabolizadores rápidos (portadores de al menos un alelo *CYP3A4\*1B*) (167).

El SNP *CYP3A4\*1B* se ha relacionado con una mayor actividad enzimática, y por tanto un fenotipo metabolizador rápido, requiriendo mayores dosis en estos pacientes para alcanzar el rango terapéutico objetivo, sobre todo en el largo tiempo post-trasplante (235). A pesar de que su asociación no está tan establecida como el *CYP3A5\*3*, existen numerosos estudios llevados a cabo sobre esta variante mostrando su influencia en la farmacoterapia de TAC, aunque algunos no llegan a demostrar asociación (114). Esta variante, tiene todavía menos incidencia en la población española que la *CYP3A5\*3*, teniendo una frecuencia alélica del 2,8%. Se ha demostrado que existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre estos dos SNPs (236). Por ello, ciertos estudios atribuyen el efecto del alelo *CYP3A4\*1B* a un metabolismo aumentado generado por la presencia conjunta del *CYP3A5\*1* (130,131). Sin embargo, un estudio de Hamadeh et al. (2018) en el que se administró TAC intravenoso evitando el primer paso metabólico intestinal, demostró que el genotipo *CYP3A5* no tenía influencia significativa comparado con el *CYP3A4*, sugiriendo que la localización del *CYP3A5* es predominante en tejidos extrahepáticos como los

intestinos frente al hígado (167). Así mismo, varios autores han determinado que la influencia del *CYP3A4\*1B* sobre la farmacocinética de TAC es independiente del genotipo *CYP3A5*(128,237). Es posible que la frecuencia genotípica observada en distintos colectivos sea responsable de las variaciones encontradas entre estudios. En una revisión de Tavira et al. (2014), se mostró como en trasplantados renales de España, Japón y Francia, existían diferencias significativas en la dosis ajustada al peso en función del genotipo *CYP3A5*, pero así mismo existían grandes diferencias en la dosis ajustada al peso para el mismo genotipo *CYP3A5* entre estos tres países, siendo mayor en Francia que en Japón y estos que en España (107).

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas entre expresores del *CYP3A5* y no expresores; sin embargo, sí que se encontraron para portadores del alelo *CYP3A4\*1B* (n=2), los cuales eran así mismo portadores *CYP3A5* en heterocigosis debido al desequilibrio de ligamiento presente entre estas dos variantes. Acorde a esto, se podría clasificar a los pacientes del estudio en expresores del *CYP3A5* portadores (metabolizadores rápidos) y no portadores del alelo *CYP3A4\*1B* (metabolizadores intermedios); y *CYP3A5* no expresores (metabolizadores lentos). Atendiendo a esta clasificación, se vieron grandes diferencias entre grupos. Mientras que basándose en la literatura previa se esperaba una dosis ajustada al peso menor para metabolizadores rápidos e intermedios frente a lentos, no se observaron diferencias entre estos dos últimos. La dosis ajustada al peso para metabolizadores lentos e intermedios fue 0,047 mg·kg<sup>-1</sup> para ambos grupos. Sin embargo, sí que se observaron claras diferencias respecto al grupo metabolizador rápido, los cuales presentaban una dosis promedio de 0,101 mg·kg<sup>-1</sup>, siendo más de dos veces superior. Se observaron las mismas diferencias cuando se comparó la dosis sin ajustar al peso. Cuando se comparó los niveles en sangre ajustados a la dosis, se observaron diferencias cercanas a la significación entre portadores del alelo *CYP3A4\*1B* y no portadores. Comparando los promedios entre grupos se observaron cuatro veces menos ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> en portadores del alelo *CYP3A4\*1B* frente a no portadores. Cabe mencionar la existencia de un dato atípico en el grupo de pacientes *CYP3A4\*1B* no portadores, que al ser eliminado resultó en un promedio 2,5 veces menor en portadores *CYP3A4\*1B*. Aunque ciertos estudios han demostrado la independencia del polimorfismo *CYP3A4\*1B* respecto al *CYP3A5\*3* en la determinación de dosis de TAC, suelen mostrar así mismo la asociación para este último SNP. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias entre expresores *CYP3A5* y no expresores cuando se estudió en independencia del *CYP3A4\*1B*. Concretamente, solo se obtuvieron tres pacientes con dosis ajustadas al peso superiores a 0,10 mg·kg<sup>-1</sup>, siendo dos los portadores *CYP3A4\*1B* y un tercero el único paciente con trasplante reciente, lo cual justifica la mayor dosis ajustada al peso que presentaba. Como se mencionó anteriormente respecto a este paciente, se



trataba de un trasplantado hepático por lo que la dosis ajustada al peso era acorde a las dosis de inicio recomendadas para tipo de TOS. Los pacientes portadores *CYP3A4\*1B*, además de presentar la dosis ajustada al peso más alta del estudio, eran los únicos individuos con niveles/dosis por debajo de  $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Así mismo, se encontraban fuera del rango terapéutico ( $<4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), y ambos habían presentado episodios de signos de rechazo o disfunción del injerto.

Comparando con el estudio de Tavira en 400 trasplantados españoles, las diferencias en la dosis ajustada al peso entre expresores y no expresores del *CYP3A5* tras más de 12 meses post-trasplante eran similares a las de nuestra cohorte ( $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vs  $0,044 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para no expresores y  $0,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vs  $0,074 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para expresores). Aunque como se ha mencionado, el aumento de dosis ajustada al peso en el grupo expresor está enmascarado por el desequilibrio de ligamiento del *CYP3A4\*1B*.

Respecto al *CYP3A4\*22*, se asocia esta variante a un metabolismo enzimático disminuido y por tanto un fenotipo metabolizador lento. En población pediátrica también se asoció la presencia del alelo *CYP3A4\*22* con una necesidad de una dosis un 30% menor respecto al alelo *wildtype* (238). Así mismo, este polimorfismo ha demostrado su contribución al metabolismo de TAC de forma independiente al genotipo *CYP3A5*(239,240). En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas en la dosis o dosis ajustada al peso en sujetos con el alelo *CYP3A4\*22*; sin embargo, los individuos heterocigotos presentaban una dosis y dosis/peso ligeramente más bajas ( $3,16 \text{ mg}$  vs  $2,75 \text{ mg}$  y  $0,051 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vs  $0,045 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivamente). Los resultados encajan con la hipótesis de un fenotipo metabolizador enlentecido y menor dosis necesaria para alcanzar niveles objetivo.

### **1.7.2. Genotipo de *ABCB1* (transporte tacrolimus)**

Los implicación de los polimorfismos del gen *ABCB1* en la terapia de TAC ha sido ampliamente investigada aunque generando resultados contradictorios (241,242). La asociación entre los parámetros farmacocinéticos de TAC y el genotipo/haplotipo *ABCB1* sigue siendo un tema de debate. La mayor parte de los estudios llevados a cabo coinciden en que los SNPs por separado, o la presencia del haplotipo mutado en su conjunto resultan en una actividad disminuida de la gp-p, determinando un flujo de sustratos hasta dos veces menor en enterocitos intestinales (165,243). El conocimiento de la estructura haplotípica de los SNPs en fuerte desequilibrio de ligamiento proporciona más información que los SNPs individuales sobre la asociación de genes candidatos con respuestas a fármacos y podría ser de mayor valor para predecir la actividad de gp-p; sin embargo, no siempre se encuentra asociación cuando se estudian los posibles

haplotipos mientras que sí se hace para las variantes individuales (244). Un reciente metaanálisis sobre 16 estudios estableció que el genotipo TT del SNP C3435T estaba relacionado con menores dosis ajustadas al peso, y la presencia de al menos un alelo T, a unos mayores niveles/dosis ajustados al peso (245). Sin embargo, a día de hoy su implicación en la farmacocinética de TAC no queda del todo esclarecida, y algunos autores señalan que ciertos factores de confusión pueden desempeñar un papel importante en estos resultados contradictorios. Por ello, el objetivo de ciertos estudios ha sido evaluar el efecto de este gen en ausencia de expresión de *CYP3A5* (242). Así mismo, una revisión sistemática reciente puso de manifiesto que el efecto del gen *ABCB1* sobre TAC depende de la etnia, ya que para algunos colectivos se pudo demostrar asociación mientras que para otros no (245). Concretamente, en 98 trasplantados hepáticos españoles no se demostró influencia para el gen *ABCB1* sobre los requerimientos de dosis de TAC, mientras que sí para el *CYP3A5* (246).

En nuestra cohorte del estudio se observaron dosis ajustadas al peso significativamente menores en sujetos TT para el SNP G2677T, mientras que para portadores CT y CC las diferencias eran menores. Aunque no hubo significación estadística, los promedios eran así mismo menores en sujetos TT frente a CT y estos frente a CC para el SNP C1346T. Por el contrario, para el SNP C3435T no se encontró esta tendencia, sino que se encontraron diferencias significativas con menores promedios dosis/peso para portadores CC seguidos de TT. Cuando se eliminó el efecto del alelo *CYP3A4\*1B*, se remarcaban más las diferencias respecto al genotipo TT en los dos primeros polimorfismos, y así mismo para la presencia del haplotipo en homocigosis (TTT). Estos resultados son acordes a la mayoría de los estudios publicados respecto al gen *ABCB1*, aunque como se ha comentado, su relación no queda del todo establecida. Concretamente, Hamadeh et al. (2018), observaron las mismas conclusiones respecto al G2677T cuando se administró TAC intravenoso para eliminar el efecto del *CYP3A5* extrahepático (predominante) (167). Como conclusión, la menor expresión y actividad de la gp-p producida por la presencia de estos polimorfismos, conlleva a un menor eflujo de TAC al lumen intestinal, tracto biliar y renal, incrementando la cantidad de fármaco que alcanza o permanece en el torrente sanguíneo y por tanto la necesidad de menores dosis orales.

Si bien es cierto que la evidencia parece indicar con mayor inclinación que las mutaciones en este gen se relacionan mayormente con niveles intracelulares de fármaco en tejidos específicos y la incidencia de EEAA. De nuevo, Hamadeh et al. (2018) asociaron la presencia del alelo T del SNP G2677T a un riesgo 7 veces mayor de padecer EEAA, mientras que no se veía influenciado por el resto de variantes del *ABCB1* o *CYP3A* (167). En la misma línea, Hawwa et al. (2009) demostraron la asociación del haplotipo TTT con nefrotoxicidad en trasplantados hepáticos a 6

meses post-trasplante, mientras que concretamente la variante G2677T fue la que mostró mayor riesgo a 12 meses post-trasplante basado en una reducción significativa de la TFG (244). El SNP C3435T también ha sido relacionado con mayor presencia de nefrotoxicidad en trasplantados renales, pero solo en caso de presencia del alelo T en el donante (210). En otros casos no se encontró asociación, si bien es cierto que la población de estudio era india y solo el 40% de los individuos eran no expresores del CYP3A5 (247). En nuestra cohorte, el SNP G2677T se relacionó con presencia de nefrotoxicidad, mientras que para las otras variantes del gen *ABCB1* u otros genes no mostraron relación, en concordancia con los estudios anteriormente descritos. El 100% de los sujetos TT presentaban nefrotoxicidad con unos niveles de creatinina altos, frente al 37,5% de los GG. La hipótesis de estos resultados es la protección frente a la exposición de agentes externos que ejerce la gp-p sobre las células renales, que se ve alterada con la presencia de este polimorfismo.

Por otra parte, se encontraron diferencias entre portadores del haplotipo *ABCB1* en heterocigosis u homocigosis en presencia de EGI frente al haplotipo *wildtype*, presentándose en un 64,7% en los primeros frente a un 28,5% en los últimos. Específicamente, se observó de manera clara en el SNP C1236T donde todos los sujetos TT frente a un 16,66% de los CC presentaban dicho EAAA. Dicha tendencia también se observó para el SNP G2677T, y fue mayor para mujeres en ambos casos. En el caso de C3435T, aunque no significativo, la presencia de EGI seguía predominando en portadores del alelo T. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde el haplotipo TTT se asoció a mayores EGI además de dislipidemia (160).

### **1.7.3. Genes relacionados con la expresión y actividad de CYPs y glicoproteína-P**

Los genes *PXR* y *POR* han sido relacionados en múltiples estudios con variaciones en la expresión y/o actividad de los CYP3A y la gp-p. En nuestra cohorte, no se observaron diferencias entre grupos genotípicos y parámetros farmacocinéticos de TAC, salvo para la variante A69789G del gen *PXR*. Este polimorfismo se ha visto involucrado en una disminución en expresión y actividad de las proteínas mencionadas en la literatura previa, mientras que no fue así en nuestro estudio. Sin embargo, cuando se ajustaron los datos para eliminar el efecto anteriormente descrito del polimorfismo *CYP3A4\*1B*, las diferencias significativas entre genotipos del A69789G desaparecieron, pudiendo argumentarse que el efecto estaba enmascarado por la presencia del alelo *CYP3A4\*1B*.

El otro SNP analizado del gen *PXR*, C63396T, se ha visto relacionado en la literatura con una expresión aumentada del CYP3A y gp-p. Esta variante no mostró diferencias entre grupos, aunque pudo observarse que el paciente portador *CYP3A4\*1B* con genotipo TT para esta

variante tenía unos niveles ajustados a la dosis menores que el portador *CYP3A4\*1B* genotipo CT, presentando ambos la misma dosis ajustada al peso. Aunque solo se disponía de dos datos comparativos, los resultados apuntan a una sinergia en el fenotipo metabolizador rápido para este citocromo cuando se presenta la variante C63396T en homocigosis en portadores *CYP3A4\*1B*. Existen pocos estudios hasta el momento y sería necesario un mayor número de muestra para comprobarlo.

Respecto a la incidencia de EEAA, en nuestro estudio se observó que tanto el polimorfismo *CYP3A4\*1B* como el *PXR* A69789G estaban asociados a daño hepático en nuestra cohorte. Cruzando ambos genotipos, se vio que la mayoría de los individuos que presentaban dicho EEAA portaban la combinación *CYP3A4\*1/\*1B-PXR* 69789GG. Aunque los mecanismos responsables de la lesión hepática mediada por *PXR* necesitan más investigación, ciertos estudios han demostrado que la activación de *PXR* puede aumentar la expresión de los genes diana de este factor transcripcional, incluidos los que codifican enzimas hepáticas, transportadores y otras enzimas involucradas en vías biosintéticas, lo que conduce a la acumulación de metabolitos tóxicos o sustancias endógenas intermedias en el hígado. Hay que tener en cuenta que el *PXR* no solo regula el metabolismo de los fármacos sino también el metabolismo energético hepático, la gluconeogénesis, la glucogenólisis, la oxidación de ácidos grasos, la cetogénesis, la lipogénesis, la actividad de la hormona tiroidea y la inflamación, entre otros (248,249).

Aunque en la literatura previa la variante A69789G parece estar relacionada con una disminución en la expresión del gen *PXR*, en nuestra cohorte los resultados son los opuestos (178). Así mismo, otros autores han obtenido los mismos resultados relacionando el genotipo GG con daño hepático inducido por fármacos y niveles de transaminasas elevados (250,251).

## **1.8. CASO DE INTERACCIÓN CON OMEPRAZOL**

Tras el análisis de las variantes sobre la cohorte de 27 pacientes, se realizó el estudio concreto de un paciente donde se detectó una posible interacción entre TAC y omeprazol que se presenta y discute a continuación:

### **1.8.1. Presentación del caso:**

Paciente varón de 16 años con TOS renal desde hace 46 meses que presentaba EEAA derivados de la medicación. El paciente estaba en tratamiento con TAC 0,5 mg (Prograf®) (2-0-1) correspondiente a 0,024 mg·kg<sup>-1</sup>, prednisona (5 mg al día), MFA 360 mg (1-0-1) y omeprazol 20 mg (1-0-0). No tenía antecedentes familiares de TOS ni otras enfermedades concomitantes. El

nivel óptimo de TAC en sangre para este paciente según el nefrólogo debía ser de 4-8 ng·ml<sup>-1</sup> (estudio *Symphony*). A pesar de los continuos reajustes de dosis (de 2 a 3,5 mg diarios), los niveles de TAC en sangre presentaban grandes fluctuaciones no siguiendo una relación lineal con respecto a la dosis oral (rango 0,74-5,16 ng·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>; r<sup>2</sup>=0,0124). Cuando se inició la terapia con TAC, los niveles séricos de creatinina aumentaron proporcionalmente a la dosis de TAC produciendo una insuficiencia renal crónica moderada, estadio 3, (FG mínimo estimado de 32, ml<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>1,73m<sup>2</sup>, al tomar 2 mg de TAC al día). La Figura 29 muestra la evolución en el tiempo de las concentraciones mínimas de TAC y los niveles séricos de creatinina según la dosis oral de TAC.

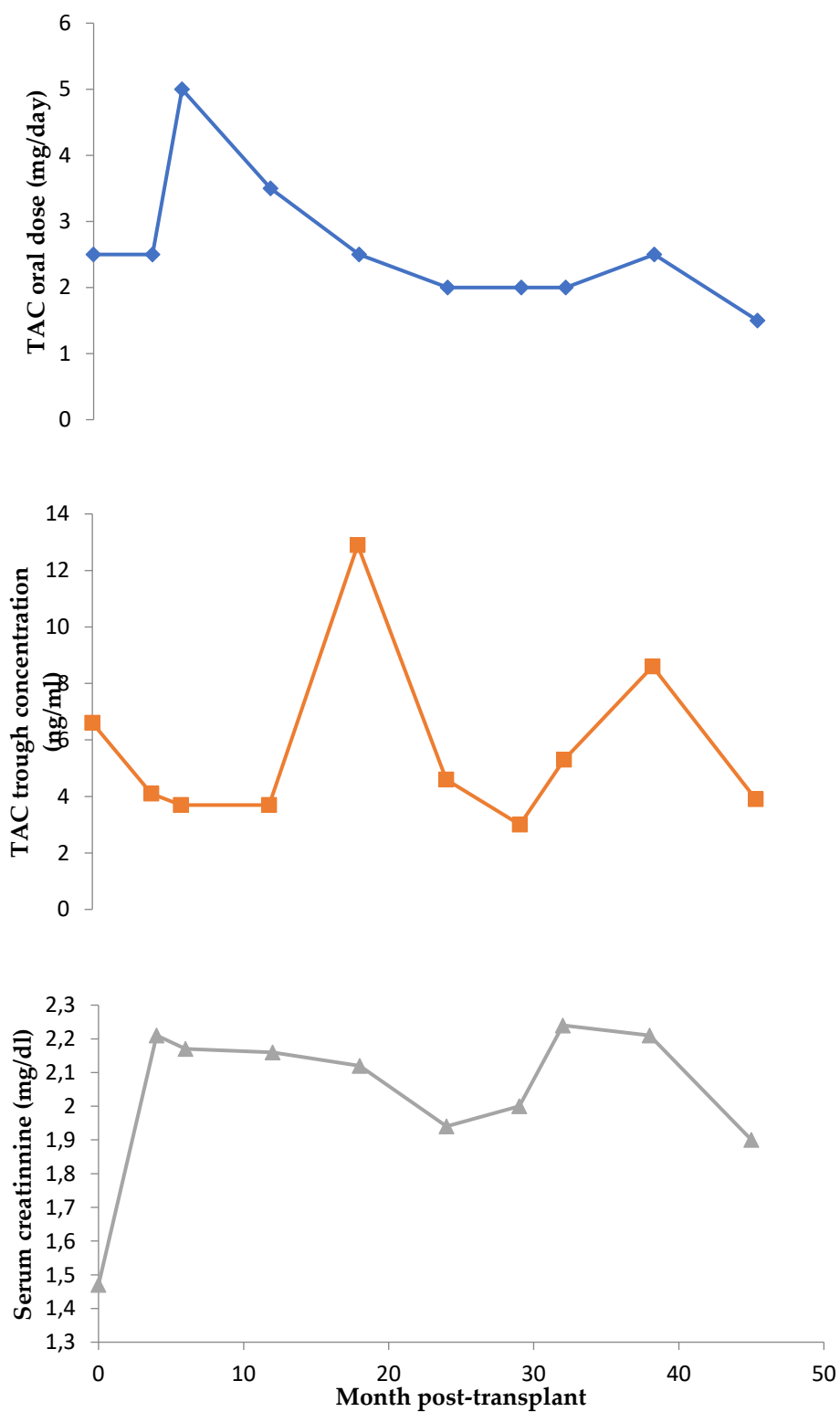
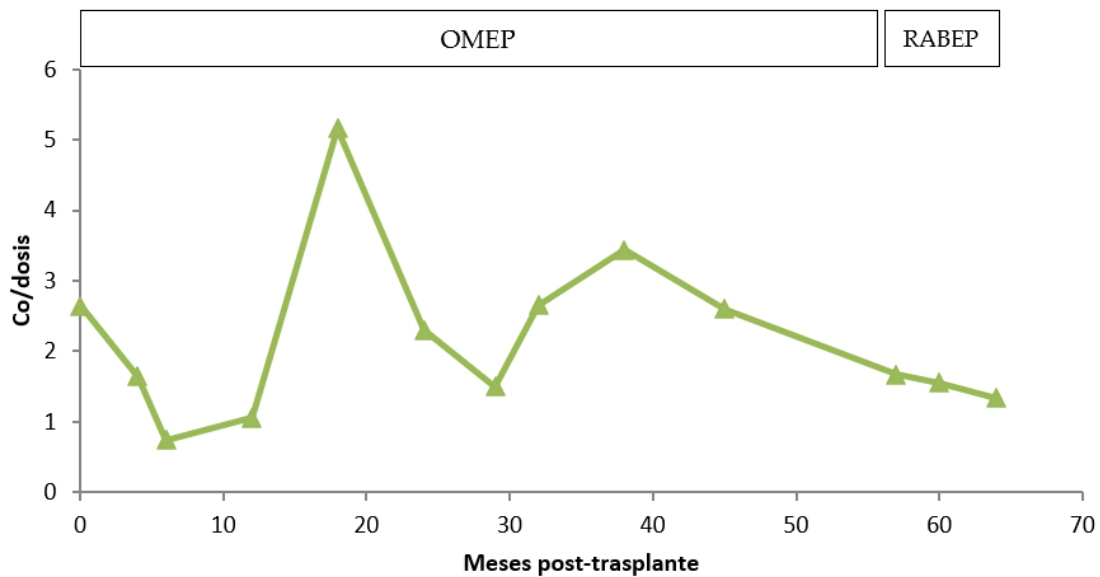


Figura 29. Evolución temporal de Co ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), niveles de creatinina sérica ( $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ ) y dosis ( $\text{mg}$  al día).

Así mismo, tras el trasplante, el paciente padecía dolor muscular recurrente e importantes episodios de diarrea, algunos acabando en hospitalización.

Ante la sospecha de una posible interacción entre omeprazol y TAC, el nefrólogo cambió el IBP a rabeprazol. Tras el cambio, el ratio Co/dosis disminuyó y siguió una tendencia lineal (Figura 30).



**Figura 30. Comparativa de la evolución de la Co/dosis a lo largo del tiempo con omeprazol y rabeprazol.**

Tras el análisis genético se descartó la presencia de las variantes *CYP2C19\*2* y *CYP2C19\*3* del *CYP2C19*, así como aquellas relacionadas con los genes *CYP3A5* y *CYP3A4*. El paciente resultó ser portador del haplotipo TT-TT-TT para el gen *ABCB1*.

### 1.8.2. Discusión del caso:

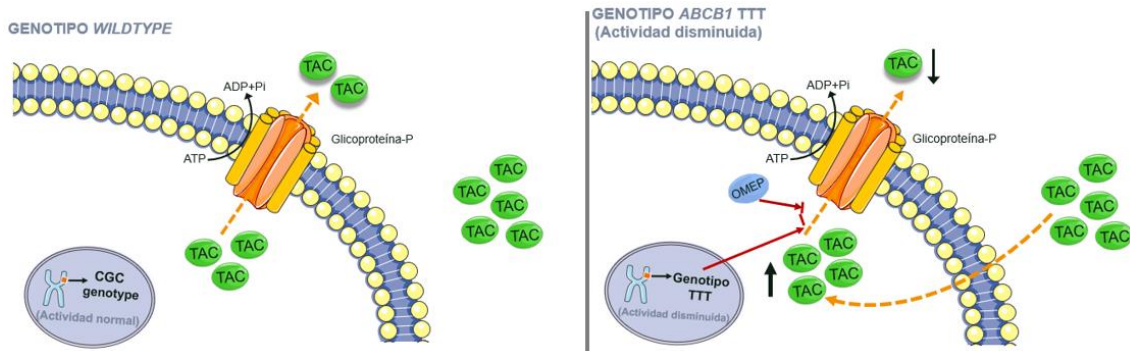
Durante el periodo inicial tras el trasplante renal normalmente se produce una variación de los valores de hematocrito, siendo bajos tras la cirugía y aumentando sustancialmente durante los primeros meses posteriores al trasplante, mientras se produce la recuperación del riñón y aumentan los niveles de eritropoyetina. No está claro cómo la farmacocinética de TAC durante este período se explica por alteraciones en el hematocrito, aunque parece que bajos niveles de hematocrito se asocian a bajos niveles de TAC en sangre mientras que la fracción libre de fármaco no disminuye. Así mismo, los pacientes jóvenes tienen una menor afinidad de unión del fármaco a proteínas plasmáticas, con una mayor fracción libre con respecto a sangre total (252). Este fenómeno conlleva reajustes erróneos de dosis y la aparición de consecuentes EEAA, como ya se ha demostrado en casos publicados (253). En nuestro paciente, estas variables podrían ser las causantes de la disminución en los niveles sanguíneos de TAC a pesar del incremento en la dosis oral durante primeros meses post-trasplante. Sin embargo, la presencia de EEAA en concentraciones dentro del rango terapéutico en el post-trasplante a largo plazo necesita una explicación adicional.

Debido a la mejoría de los EGI y la disminución de la creatinina tras el cambio a rabeprazol, se buscó otra causa que justificara la interacción de TAC con omeprazol. Tras descartar polimorfismos en el gen *CYP2C19* que pudieran desviar el metabolismo de omeprazol hacia el CYP3A4 generando una competición enzimática, se analizaron el resto de las variantes polimórficas involucradas en la farmacocinética de TAC. El paciente resultó presentar el haplotipo del gen *ABCB1* en homocigosis, el cual ha demostrado, incluido en nuestra cohorte, estar asociado a menores dosis ajustadas al peso, y así mismo mayores niveles ajustados a la dosis. Concretamente este paciente presentaba una dosis ajustada al peso baja ( $0,024 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) con los niveles ajustados a la dosis más altos de la cohorte ( $2,13 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Así mismo, la presencia del haplotipo TTT ha sido asociada a EGI en la literatura, comprobándose en nuestra cohorte aunque se vio asociada principalmente al alelo TT de C1236T (160).

Omeprazol ha demostrado ser inhibidor y sustrato de la gp-p y CYP3A4 (55,226). Otros casos de estudio similares también han demostrado una interacción TAC-omeprazol en pacientes *CYP2C19 wildtype*, secundario a la inhibición de CYP3A4 y g-pg por parte de omeprazol (53,254). En concreto, el realizado por Maguire et al. (2012) consideraba a rabeprazol como una mejor opción en receptores de trasplante renal respecto a otros IBP debido a que no genera inhibición p-gp intestinal y consecuente aumento de la biodisponibilidad oral de TAC (188). Recientemente, una revisión extensa sobre predictores de la variabilidad farmacocinética de TAC mostró que los IBP (omeprazol, lansoprazol, esomeprazol) pueden aumentar la concentración de TAC hasta 2 o 3 veces, recomendándose el rabeprazol como una alternativa más segura (54). Así mismo, un caso clínico reciente mostró un aumento y fluctuación en los niveles de TAC en presencia de omeprazol y el haplotipo TTT, que disminuyeron tras la interrupción del IBP, concluyendo que tener en cuenta ambos factores es necesario a la hora de establecer la dosis de TAC (255).

En resumen, en nuestro paciente la inhibición de la gp-p producida por omeprazol potenciaba la menor actividad de esta proteína derivada de los polimorfismos genéticos, generando un aumento de los niveles en sangre ajustados a la dosis y la incidencia de EEAA (diarrea, dolores musculares y aumento de creatinina), tal y como se refleja en la Figura 31.





**Figura 31.** Inhibición de la actividad de la glicoproteína-P producida por el haplotipo TTT del gen *ABCB1* y la interacción con omeprazol. Elaboración propia.

Tras el cambio a rabeprazol y la menor inhibición de la gp-p, los niveles ajustados a la dosis disminuyeron, así como los EGI y los niveles de creatinina, mejorando la función renal.

Como conclusión del caso, se demuestra que considerar la genética individual y politerapia de los pacientes trasplantados desde un punto de vista de medicina personalizada es un punto importante para optimizar la farmacoterapia inmunosupresora y evitar la presencia de EEA medicamentosos. El omeprazol es el IBP más prescrito para la profilaxis de la úlcera gástrica y duodenal en tratamientos inmunosupresores a largo plazo, y ha demostrado en esta y otras ocasiones ser un foco de interacciones farmacológicas inesperadas (53,188,211,254).

## **2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE EVEROLIMUS EN PACIENTES CON COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA**

En el estudio realizado en pacientes con CET en tratamiento con EVE se evaluó la asociación de las variables farmacocinéticas, la respuesta terapéutica y la presencia de EEAA con distintas variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas.

### **2.1. EDAD, SEXO Y PESO**

Para el estudio y comparación de las variables de EVE en el tratamiento de CET, se calculó la dosis/ASC ajustada, siendo la dosis ajustada al ASC y el tipo de indicación principal para la que se prescribió EVE en dicho paciente, teniendo en cuenta los rangos de edad indicados en ficha técnica así como la presencia de inductores en el caso de epilepsia. En base a esto, se presumía una dosis/ASC ajustada igual a 1 en caso de que no hubiera habido reajustes de dosis realizados por discrepancia de la respuesta terapéutica esperada. Sin embargo, se encontraron grandes desviaciones entre pacientes que no eran dependientes de la edad, peso, ASC, sexo, indicación de EVE ni presencia de inductores, siendo estos criterios para el establecimiento de la dosis inicial. Cabe destacar que un 60% de los pacientes presentaba obesidad. Concretamente, dos pacientes presentaron valores extremos de dosis/ASC ajustada: un extremo superior de 2,33  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$  correspondiente a la dosis diaria más alta de la cohorte (12 mg), y un extremo inferior de 0,30  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$  correspondiente así mismo a la mínima dosis diaria de la cohorte (2,5 mg).

Finalmente, no se encontraron diferencias entre las variables demográficas y la presencia de EEAA. Autores previos que analizaron las variantes demográficas implicadas en la terapia con EVE en pacientes trasplantados renales, concluyeron que ni la edad, sexo, etnia, hematocrito, albumina, altura, peso, IMC, ASC, masa magra ni enfermedades concomitantes afectaban a la farmacocinética de EVE (121,256). Otros estudios sí que mostraron relación entre la exposición sistémica de EVE y los niveles de alanina aminotransferasa, el peso y la edad, relacionando este último con la reducción en la capacidad de metabólica del hígado observada durante el envejecimiento (257,258). Sin embargo, estos estudios fueron en pacientes trasplantados adultos donde la media de edad y peso no son extrapolables a nuestra cohorte.

### **2.2. TRATAMIENTOS CONCOMITANTES Y EFECTOS ADVERSOS**

Los pacientes de la cohorte estaban polimedicados debido a la naturaleza multifactorial de la enfermedad. Todos los pacientes estaban en tratamiento en mono, bi o triterapia con antiepilépticos y/o antipsicóticos/ansiolíticos menos uno. Algunos de estos fármacos concomitantes eran así mismos sustratos o inductores leves del CYP3A4. Solo un paciente estaba

en tratamiento con un inhibidor del CYP3A4, el ácido valproico, siendo el paciente con menor dosis/ASC ajustada del estudio.

A pesar de la politerapia, no se relacionó la presencia de estos fármacos con las variables farmacocinéticas de EVE ni la presencia de EEAA. Estudios previos solo relacionaron la comedición con ciclosporina con intervariabilidad en la farmacocinética de EVE, pero no la presencia de EEAA (121).

### **2.3. FARMACOGENÉTICA**

Las frecuencias genotípicas encontradas en la población de estudio presentaban diferencias significativas respecto a las presentes en la población Ibérica, probablemente debido al pequeño tamaño muestral, aunque sí que se observaba mayor frecuencia de alelos mutados para las variantes de los genes *ABCB1*, *POR* y *PXR*.

No se encontró significación estadística para ninguno de los polimorfismos analizados respecto a las variables farmacocinéticas de TAC. La falta de significación se atribuye al pequeño tamaño muestral consecuente al limitado acceso a la población pediátrica de esta enfermedad rara. Por ello, se obtuvo una baja frecuencia absoluta para cada genotipo en la muestra poblacional y es probable que se alteraran las frecuencias relativas observadas respecto a las frecuencias de referencia (población ibérica). Así mismo, son escasos los estudios farmacogenéticos que evalúan las implicaciones farmacocinéticas y terapéuticas en EVE respecto a otros tratamientos inmunosupresores (p.ej. tacrolimus, sirolimus o ácido micofenólico). Concretamente, dentro de la exhaustiva revisión bibliográfica llevada a cabo, no se encontraron estudios farmacogenéticos existentes sobre la enfermedad de CET, y menos sobre el uso de EVE como indicación en el tratamiento de CET sobre población pediátrica. Es por ello por lo que el estudio de esta cohorte tiene mayor sentido desde un enfoque de medicina personalizada de precisión. Estos datos implican mayor complejidad para la realización de este trabajo, pero así mismo la novedad de ser el primer estudio retrospectivo al respecto.

#### **2.3.1. Genotipo CYP450 (metabolismo de everolimus).**

Respecto al análisis de las variantes genéticas analizadas en el estudio, donde se observó mayor tendencia a la existencia de diferencias entre grupos es en la presencia del alelo *CYP3A4\*22* respecto a la dosis y dosis/ASC ajustada. Esta variante ha sido relacionada en la literatura previa con una expresión disminuida del CYP3A4 hepático, mostrando amplia concordancia entre estudios (104). La evidencia es mayor para otros fármacos mientras que para EVE apenas se han llevado a cabo tres ensayos apuntando a la influencia de este polimorfismo en trasplantados

renales, y cáncer de mama, renal y pancreático (122,137,138). De ellos, el realizado por Pascual et al. (2017) demostró por primera vez en pacientes españolas de cáncer de mama metastásico la repercusión de este SNP sobre la farmacocinética de EVE, donde las pacientes portadoras mostraban 2,7 mayor concentración en sangre comparado con las no portadoras (138). Aunque no existen referencias de la influencia de esta variante sobre la terapia de CET, es cierto que el rango de dosis oral para el tratamiento de las diferentes manifestaciones de la enfermedad es más cercano al utilizado en cáncer de mama frente al trasplante renal u otro tipo de trasplantes (137). Específicamente, la dosis media utilizada es el doble en el caso de su aplicación en cáncer de mama frente al trasplante renal, pudiendo ser un factor determinante del mayor efecto encontrado en estos pacientes, y pudiendo ser extrapolable en el caso de CET. Así mismo, el estudio donde se hallaron estos resultados fue el único realizado sobre población española (frente a neerlandeses y franceses). Cabe mencionar que la mayoría de los estudios realizados sobre esta variante son centroeuropeos debido a su nula frecuencia alélica en África y Este Asiático, y escasa en el Sur Asiático y América; aunque la media europea tan solo es del 5% (97). Concretamente en nuestro estudio, solo se encontró un paciente portador de la variante *CYP3A4\*22* en heterocigosis. Este paciente presentaba una dosis/ASC ajustada de  $0,30 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ , siendo la más baja encontrada (63,55% menor que la mediana, 66% que el promedio de la cohorte), así como la dosis oral más baja, 2,5mg. Además, era el único paciente en tratamiento concomitante con un inhibidor leve del CYP3A4 (ácido valproico), aunque así mismo estaba co-tratado con dos inductores leves (rufinamida y clobazam).

Esta paciente fue el único que tuvo que interrumpir su tratamiento con EVE en varios periodos debido a la presencia de EEA graves. La primera vez se debió a una neumonía grave que obligó al paciente suspender el tratamiento con EVE durante más de 12 meses, tal como se indica el protocolo de actuación en la ficha técnica para en caso de neumonitis de Grado 3-4 (Criterios de Terminología Común del Instituto Nacional del Cáncer) (87). Se propone que la fisiopatología de la neumonitis asociada a inhibidores de mTOR está mediada por la toxicidad directa del fármaco y/o la toxicidad inmunológica, ya que se ha observado alveolitis linfocítica en biopsias de pulmón de pacientes afectados (259). La segunda interrupción se produjo por una reacción cutánea severa. La presencia de EEA acentuados ante una dosis oral baja concuerda con el fenotipo metabolizador lento mostrado ante la presencia del alelo *CYP3A4\*22*, el cual pudo verse potenciado por la toma de ácido valproico. Estos resultados se ven respaldados por un metaanálisis sobre la exposición y seguridad de EVE, donde se concluyó que un aumento sustancial en la exposición sistémica a EVE aumentaba el riesgo de eventos pulmonares grado >3 en 1,9 veces (260).

Respecto a las variantes *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3* presentadas conjuntamente en otro de los pacientes, no se observaron diferencias en la dosis ni dosis/ASC ajustada respecto al resto de la cohorte. Este dato contrasta con lo hallado en el estudio de TAC, si bien es cierto que la literatura solo se encontró un estudio de EVE relativo al alelo *CYP3A4\*1B*, mostrando poca o ninguna evidencia al respecto (120). Así mismo las variantes relacionadas con el CYP3A4 parecen mostrar mayor repercusión frente a las variantes del CYP3A5 por la mayor implicación metabólica del primer citocromo sobre EVE a diferencia de TAC (85).

### **2.3.2. Genotipo de *ABCB1* (transporte de everolimus)**

Cinco estudios clínicos en la literatura han estudiado los efectos de los polimorfismos genéticos del gen *ABCB1* en la farmacocinética de EVE con pacientes trasplantados, concretamente sobre un total de 175 receptores de trasplante renal, 96 cardíaco y 65 pulmonar. Aunque en estos estudios solo se evaluaron los niveles en sangre de EVE, ninguno de los polimorfismos analizados demostró afectarlos significativamente (118,121,172,258). En 2014, el Comité Científico de Medicamentos Inmunosupresores de la Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico de Medicamentos y Toxicología Clínica convocó una reunión de expertos internacionales para acordar recomendaciones sobre la monitorización terapéutica de EVE y su uso óptimo en la práctica clínica tanto en su indicación para el trasplante como otras patologías (261). Dentro de las conclusiones de este informe, no se recomendó el genotipado del gen *ABCB1* previo al inicio de la terapia con EVE; sin embargo, recalcaron la importancia de mayor evidencia sobre este gen en el paso de EVE a través de la membrana linfocitaria, ya que existen pocos datos al respecto (174). En nuestro estudio, a pesar de no obtenerse resultados estadísticamente significativos, se vio una tendencia a presentar diferencias entre genotipos y la dosis y dosis/ASC ajustada de las variantes G2677T y C1236T, las cuales se encontraban al 100% en desequilibrio de ligamiento en la cohorte de estudio, mientras que no era así para la variante C3435T. Concretamente, se obtuvieron menores dosis y dosis/ASC ajustadas para el genotipo *wildtype* seguido del genotipo TT en los tres SNPs. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en la cohorte de TAC para estas variantes. Sin embargo, el único estudio encontrado en la literatura que obtuvo resultados significativos respecto al haplotipo TTT y la farmacocinética de EVE, concluyó que la presencia de al menos un haplotipo TTT resultaba en una reducción de un 21% en la biodisponibilidad oral de EVE, debido a una absorción disminuida. Este estudio se realizó sobre 42 adultos con carcinoma de tiroides con una dosis oral de 10 mg diarios, sustancialmente mayor que las dosis para TOS, pudiendo explicar en parte la significación de los resultados obtenidos (173). Estos resultados son acordes a los obtenidos en nuestra cohorte, donde los haplotipos en heterocigosis y homocigosis presentaban mayores dosis y dosis/ASC ajustadas respecto al

haplotipo *wildtype*, secundarias a una biodisponibilidad disminuida. Las diferencias encontradas en la influencia de los SNPs del gen *ABCB1* sobre la farmacocinética de TAC y EVE puede ser atribuida al cambio conformacional del sitio de unión a sustrato que han demostrado producir estos polimorfismos sobre la estructura de la gp-p, afectando de diferente manera a la especificidad de la proteína por cada uno de estos fármacos.

Respecto a la presencia de EEAA, se encontraron diferencias entre haplotipos *ABCB1*, donde portadores del haplotipo TTT tenían mayor incidencia de hipercolesterolemia que los CGC. En un estudio previo de Venuto et al. (2015) se encontraron resultados similares aunque fue realizado sobre TAC y ciclosporina, y no EVE. En el estudio se relacionó el haplotipo TTT con mayor incidencia de dislipidemia, concretamente mayor colesterol total, cLDL y menor cHDL, incluso cuando se ajustaban los datos a la toma de estatinas y prednisona (160).

### **2.3.3. Genes relacionados con la expresión y actividad de CYPs y glicoproteína-P**

En relación a los genes involucrados en la modificación de la expresión y actividad del CYP3A y gp-p, se encontró que el paciente que presentaba la dosis y dosis/ASC ajustada más altas (12 mg y  $2.33 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  respectivamente) era el único portador de la combinación de las variantes C63396T del gen *PXR* y *POR\*28* en homocigosis. Este paciente tenía pautado EVE para el tratamiento de SEGA. En el ensayo EXIST-1 para la aprobación de EVE en esta patología, se pautó una dosis/ASC (sin ajuste) media de  $4,5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  con el objetivo de mantener unos niveles en sangre de  $5\text{-}7 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  tras los reajustes de dosis necesarios (262). El paciente mostraba una dosis/ASC (sin reajuste) de  $16,32 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ , muy por encima de la dosis inicial recomendada, sugiriendo que se había realizado un significativo reajuste de dosis para alcanzar el rango terapéutico en sangre. A pesar de la elevada dosis, no presentaba EEAA salvo aftas bucales.

La combinación de los polimorfismos de los genes *POR* y *PXR* encontradas en este paciente, no se encontró en ningún paciente más ni en la cohorte de TAC. Ambas variantes han sido identificadas en pacientes con una mayor actividad del CYP3A4 (177). En un estudio reciente, el alelo *POR\*28* fue relacionado con menores niveles ajustados a la dosis en relación a ciclosporina y TAC, pero no se pudo demostrar para el caso de EVE, aunque el promedio era menor en sujetos TT y además, existía una tendencia casi significativa ( $p=0,07$ ) para este genotipo respecto a menor tiempo dentro del rango terapéutico (187). En el mismo estudio, se asoció esta variante a la presencia de hipertrigliceridemia, un EEAA mostrado en EVE debido a su efecto en la modulación de la expresión de la lipoproteína lipasa. Aunque nuestros resultados no mostraron significación estadística en esta relación, el único paciente con dislipidemia era portador *POR\*28* en homocigosis.

### 3. LIMITACIONES

La limitación principal de ambos estudios ha sido el pequeño tamaño muestral obtenido, sobre todo en el caso de EVE al tratarse de una enfermedad rara. Esto ha dificultado la comparación entre grupos ya que para algunas variables no había suficiente muestra representativa en todos ellos. Del mismo modo, hubiera enriquecido la investigación disponer de los datos de monitorización de los niveles de los fármacos en sangre de todos los pacientes, así como valores de creatinina y TFG. Este factor ha limitado el análisis estadístico para estas variables, siendo solo realizado para aquellos pacientes de los que se presentaba dichos datos. Por tanto, ha influido en los resultados obtenidos pudiendo no ser representativa para la totalidad de la muestra de estudio. Adicionalmente, hubiera sido de utilidad disponer de valores de hematocrito y proteínas plasmáticas, factores que como se ha comentado pueden influir en la farmacoterapia. En cuanto a la farmacogenética, el estudio de una pequeña muestra poblacional desde un enfoque de medicina personalizada se ve dificultado para aquellos genes en los que existe controversia en la literatura científica, o aquellos en los que los resultados generan diferentes conclusiones según el fármaco estudiado.





# **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Tras la discusión de resultados de esta tesis se puede concluir:

- La presencia de anemia se relacionó con mayores dosis ajustadas al peso, y mayor número de efectos adversos en la cohorte de pacientes trasplantados en tratamiento con tacrolimus.
- En la dosificación de everolimus para los pacientes con complejo de esclerosis tuberosa debe tenerse en cuenta el área de superficie corporal, especialmente en el caso de pacientes con pediátricos con sobrepeso, muy prevalente en la cohorte de pacientes analizada.
- En las interacciones farmacológicas con tacrolimus, el omeprazol, frecuentemente pautado junto con la terapia inmunosupresora, puede ser una fuente de las mismas si el metabolismo por CYP2C19 está alterado. Rabeprazol parece una alternativa más segura por presentar un metabolismo mayoritariamente no enzimático.
- La toma de prednisona a largo plazo y el sobrepeso se asociaron a presencia de hipertensión arterial en los pacientes trasplantados tratados con tacrolimus.
- La presencia de fármacos concomitantes que puedan ser inductores o inhibidores de gp-p y CYP3A4 debe ser tenida en cuenta a la hora de la dosificación de everolimus.
- La evidencia sobre la influencia de la farmacogenética en la farmacocinética de tacrolimus es más amplia que en el caso de everolimus, aunque en algunos casos los resultados son contradictorios. No hay estudios farmacogenéticos previos realizados sobre pacientes pediátricos con complejo de esclerosis tuberosa que sigan un tratamiento con everolimus.
- Las frecuencias genotípicas obtenidas para las variantes analizadas (*CYP3A5*, *CYP3A4*, *ABCB1*, *PXR* y *POR*) en la cohorte de pacientes trasplantados de órgano sólido en terapia con tacrolimus concuerdan en su mayoría con las encontradas en la población ibérica.
- En el caso de everolimus, se han identificado y analizado los genes que habían demostrado influir en la respuesta terapéutica a fármacos similares a everolimus: *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *ABCB1*, *PXR* y *POR*.
- Resultaron relevantes para la dosificación de tacrolimus el alelo *CYP3A4\*1B*, con mayores dosis ajustadas al peso y menores niveles ajustadas a la dosis, y la presencia del haplotipo del gen *ABCB1*, con menores dosis ajustadas al peso, especialmente el genotipo TT para el SNP G2677T.
- En la dosificación de everolimus, el polimorfismo *CYP3A4\*22* junto con la presencia de un fármaco inhibidor del CYP3A4 parecen estar involucrados en una disminución de la actividad

metabólica de este citocromo, siendo necesarias menores dosis de fármaco y menores dosis ajustadas al área de superficie corporal. Además, la combinación de las variantes *POR\*28* y *PXR C63396T* en homocigosis parecen producir un aumento indirecto de la actividad metabólica, siendo necesarias mayores dosis de fármaco y mayores dosis ajustadas al área de superficie corporal. Finalmente, el haplotipo del gen *ABCB1* en hetero u homocigosis parece estar relacionado con menor biodisponibilidad oral, y mayores dosis de fármaco necesarias.

- En relación a los efectos adversos de tacrolimus, el genotipo mutado del SNP G2677T del gen *ABCB1* se asoció con la presencia de nefrotoxicidad, el haplotipo *ABCB1* en homocigosis o heterocigosis con la presencia de efectos adversos gastrointestinales y la presencia de la combinación *CYP3A4\*1B-PXR 69789GG* con daño hepático.
- Con respecto a los efectos adversos de everolimus, el alelo *CYP3A4\*22* se asoció con la presencia de neumonía derivada del tratamiento y el haplotipo del gen *ABCB1* se relacionó con una mayor incidencia de hipercolesterolemia.
- Las pruebas farmacogenéticas son una herramienta útil para la adecuación de la dosis del tratamiento inmunosupresor con tacrolimus y everolimus, o como método de análisis retrospectivo.
- En el tratamiento de fármacos de estrecho margen terapéutico como los inmunosupresores, la valoración de sus niveles en sangre, otros parámetros clínicos y tratamientos concomitantes junto con el uso de la farmacogenética son pilares fundamentales para la aplicación de la medicina personalizada de precisión.

# CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

Following the discussion of the results of this thesis, it can be concluded:

- The presence of anaemia was related to higher weight-adjusted doses, and higher number of adverse effects in the cohort of transplanted patients on tacrolimus treatment.
- Everolimus dosing for patients with tuberous sclerosis complex should consider body surface area, especially in the case of overweight paediatric patients, which was very prevalent in the cohort of patients analysed.
- Regarding tacrolimus co-treatments, omeprazole, often prescribed together with immunosuppressive therapy, may be a source of drug interactions if CYP2C19 metabolism is altered. Rabepazole appears to be a safer alternative because of its mostly non-enzymatic metabolism.
- Long-term prednisone use and overweight were associated with the presence of hypertension in transplant recipients treated with tacrolimus.
- The presence of concomitant drugs that may be inducers or inhibitors of gp-p and CYP3A4 should be considered when dosing everolimus.
- The evidence on the influence of pharmacogenetics on tacrolimus pharmacokinetics is more extensive than for everolimus, although in some cases the results are contradictory. There are no previous pharmacogenetic studies on paediatric patients with tuberous sclerosis complex on everolimus treatment.
- The genotypic frequencies obtained for the variants analysed (*CYP3A5*, *CYP3A4*, *ABCB1*, *PXR* and *POR*) in the cohort of solid organ transplant patients on tacrolimus therapy are mostly consistent with those found in the Iberian population.
- In the case of everolimus, genes that had been shown to influence therapeutic response to everolimus-like drugs were identified and analysed: *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *ABCB1*, *PXR* and *POR*.
- Relevant for tacrolimus dosing were the *CYP3A4\*1B* allele, with higher weight-adjusted doses and lower dose-adjusted levels, and the presence of the *ABCB1* gene haplotype, with lower weight-adjusted doses, especially the TT genotype for SNP G2677T.
- In everolimus dosing, the *CYP3A4\*22* polymorphism together with the presence of a CYP3A4 inhibitor drug seem to be involved in a decrease in the metabolic activity of this cytochrome, requiring lower drug doses and lower doses adjusted to body surface area. In addition, the combination of the *POR\*28* and *PXR* C63396T variants in homozygosis seems to produce an indirect increase in metabolic activity, requiring higher drug doses and higher doses adjusted

to body surface area. Finally, the *ABCB1* gene haplotype in hetero- or homozygosis appears to be related to lower oral bioavailability and higher drug doses required.

- Regarding tacrolimus adverse effects, the mutated genotype of the *ABCB1* SNP G2677T was associated with the presence of nephrotoxicity, the *ABCB1* haplotype in homozygosis or heterozygosis with the presence of gastrointestinal adverse effects, and the presence of the *CYP3A4\*1B-PXR* 69789GG combination with liver damage.
- With respect to everolimus adverse effects, the *CYP3A4\*22* allele was associated with the presence of treatment-related pneumonia and the *ABCB1* gene haplotype was associated with an increased incidence of hypercholesterolaemia.
- Pharmacogenetic testing is a useful tool for dose adjustment of immunosuppressive treatment with tacrolimus and everolimus, or as a method of retrospective analysis.
- In the treatment of drugs with a narrow therapeutic margin such as immunosuppressants, the assessment of their blood levels, other clinical parameters and concomitant treatments together with the use of pharmacogenetics are fundamental pillars for the application of precision personalised medicine.



# **FUTURA PERSPECTIVA**



## FUTURA PERSPECTIVA

TAC es un fármaco que ha sido ampliamente investigado incluyendo en el campo de la farmacogenética. A pesar de que a día de hoy es casi incuestionable el papel del polimorfismo *CYP3A5\*3* como determinante de dosis de TAC, su inclusión en la práctica clínica habitual depende del beneficio que supone su genotipado frente a la rutina habitual. Se estima, que con el método actual de reajuste hasta llegar a niveles objetivo, la mayoría de los pacientes alcanzan niveles en rango dentro de las dos primeras semanas post-trasplante (107). El genotipado, debe suponer una ventaja más allá de alcanzar niveles en sangre objetivos tempranos o realizar menor reajuste de dosis; o al menos demostrar que esto reduce el riesgo de rechazo o nefrotoxicidad durante los primeros días de la pauta de TAC. También sería posible si la reducción del tiempo de hospitalización o las dosis de terapias de inducción supusieran una mejora en el coste-beneficio. A largo plazo, el genotipado *de novo* en pacientes trasplantados ayudaría a determinar las causas de ineficacia o presencia de EEAA. De hecho, ciertas guías farmacoterapéuticas como la RNPGx recomiendan el genotipado de determinadas variantes de forma retrospectiva para determinar la causa de la respuesta observada (136). En términos económicos, realizar el genotipado a gran escala de un *pool* específico de SNPs en pacientes trasplantados no supone un gran coste (263). Se trata de una variable estática que no varía a lo largo de la vida del individuo, y podría ser incluida como un dato más en la historia clínica del paciente. Esta información, podría ser igualmente válida para otros campos distintos a la inmunosupresión donde la farmacogenética haya demostrado ser determinante (p.ej. antineoplásticos, antidepressivos, anticoagulantes, paliativos, etc). Aunque no todos los polimorfismos descritos a día de hoy han demostrado la misma solidez que el *CYP3A5\*3*, sigue creciendo la investigación al respecto y cada vez existe más evidencia en relación a otras variantes como el *CYP3A4\*1B* o *CYP3A4\*22*, o bien relacionada con otros parámetros como la toxicidad o concentraciones de fármaco en tejidos específicos. Un campo importante todavía por explorar es la repercusión de la concentración de fármaco en la diana terapéutica (linfocito), la extrapolación e interpretación de estos datos, y la influencia que pueden tener determinados factores como son los polimorfismos genéticos (*ABCB1*). A pesar de ser un potencial indicador óptimo del verdadero efecto inmunosupresor, todavía no se han establecido concentraciones intracelulares objetivo ni está del todo claro su repercusión en la práctica clínica. La medición de las concentraciones intracelulares supone mayor complejidad y no es a día de hoy un procedimiento práctico y asequible en la rutina clínica. Además, las metodologías frecuentemente utilizadas tienen un límite de detección insuficiente para la detección de niveles en linfocito (p.ej MEIA). Tampoco se

ha establecido una correlación clara de los niveles intracelulares y los niveles observados en sangre o plasma de manera que no pueden ser utilizados para su extrapolación.

Así mismo, hay que tener en cuenta que la frecuencia polimórfica varía ampliamente entre etnias y la variedad de frecuencias genotípicas encontradas puede ser la causante de la controversia generada para algunas variantes. Es por ello también por lo que el genotipado de determinados polimorfismos puede tener más utilidad en unas zonas que otras. Todavía queda un largo camino, y sobre todo estudios enfocados a demostrar el beneficio de utilizar esta información frente al método ensayo-error.

Referente a EVE, a día de hoy, existen escasos estudios evaluando su farmacocinética y en concreto su relación con la farmacogenética. La mayoría de los estudios han sido llevados a cabo sobre cohortes de TOS o bien pacientes con diferentes tipos de cáncer, por lo que las características fisiopatológicas, terapias concomitantes y dosificación de EVE difieren sustancialmente de los presentes con CET. Estas diferencias se magnifican cuando se trata de población pediátrica donde la fisiología es diferente a la del paciente adulto, y adicionalmente las manifestaciones de CET pueden ir avanzando con la evolución del paciente. De hecho, un punto importante es el diagnóstico precoz y la optimización temprana de la terapia para evitar el desarrollo de nuevas manifestaciones crónicas de la enfermedad. Especialmente importante, es la detección y tratamiento temprano de las crisis epilépticas ya que son un desencadenante importante del deterioro cognitivo posterior.

Al tratarse de una enfermedad rara, son escasos los datos publicados en la literatura, y casi inexistentes cuando se aborda un área como la farmacogenética. Es por ello por lo que el estudio de estos pacientes debe hacerse desde una perspectiva de medicina personalizada. Los resultados obtenidos en estudios de EVE sobre otro tipo de patologías pueden servir de guía, pero son difícilmente extrapolables ya que CET es una enfermedad multifactorial que debe ser investigada teniendo en cuenta todos estos factores clínicos, farmacológicos y genéticos.

El tratamiento con EVE presenta una alta incidencia de EEAA, entre ellos algunos clasificados como graves que obligan a interrumpir de forma temporal o indefinida la terapia. La inclusión de variables de predicción de respuesta como son ciertos polimorfismos genéticos podrían servir de ayuda a la hora de optimizar una dosis de inicio y reducir los reajustes de dosis necesarios para alcanzar el rango terapéutico óptimo. Además queda por determinar si las diferencias obtenidas en los resultados entre diferentes fármacos son resultado de la propia dinámica del principio activo en su interacción con el cuerpo, o realmente no cuentan con repercusión clínica. Todavía

queda mucho que investigar al respecto hasta que el nivel de evidencia sea, al menos, equiparable a otros fármacos inmunosupresores con más trayectoria (tacrolimus, sirolimus o ácido micofenólico).



# **BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

1. Naranjo TW, Lopera D, Cano LE. Inmunoterapia con agentes biológicos e infecciones fúngicas: riesgos y beneficios. *Infectio* [Internet]. 2012;16(Supl 3):73–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70030-9)
2. Golan D, Tashjian A, Armstrong E, AW A. Principios de Farmacología. Bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico. Cuarta. Barcelona; 2012. 1024 p.
3. Margarit C, Bilbao I. Evolución de la inmunosupresión en el trasplante hepático. *Cir Esp*. 2002;71(1):34–40.
4. JF B. History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien Klin Wochenschr*. 2002;114(12):433–7.
5. Eckardt K-U, Kasiske BL, Zeier MG. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant* [Internet]. 2009;9(Suppl 3):S1–155. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x>
6. Montañés Medina P. El trasplante renal pionero y motor de los trasplante de órganos. *Actas Urol Esp*. 2010;34(10):827–30.
7. ONT. Balance de Actividad ONT 2021 [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 10]. p. 42. Available from: [https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/02/Balance-de-actividad-Donacion-y-Trasplante-2021\\_ONT.pdf](https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/02/Balance-de-actividad-Donacion-y-Trasplante-2021_ONT.pdf)
8. ONT. Centro Colaborador de la OMS en Donación y Trasplante [Internet]. [cited 2023 May 10]. Available from: <https://www.ont.es/internacional-6/oms-6-5/>
9. Alonso M, Álvarez Miranda M ÁVM. El modelo español de coordinación y trasplantes [Internet]. 2008 [cited 2023 May 10]. Available from: <http://www.ont.es>
10. Gutiérrez E, Amado A. Selección del donante y criterios de viabilidad de los órganos: expansión de los criterios de donación. *Rev Soc Esp Enferm Nefrol*. 2007;10(2):15–25.
11. Lopez V, Hernandez D, Gonzales M. Resultados globales del trasplante renal | Nefrología al día. *Nefrol al Dia* [Internet]. 2021;3(Dci):1–12. Available from: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-resultados-globales-del-trasplante-renal-58>
12. Trasplante de corazón de cerdo: primicia médica en los xenotrasplantes. 2022; Available from: <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/trasplante-de-corazon-de-cerdo->

primicia-medica-en-los-xenotrasplantes

13. Choudhary NS, Saigal S, Bansal RK, Saraf N, Gautam D, Soin AS. Acute and Chronic Rejection After Liver Transplantation: What A Clinician Needs to Know. *J Clin Exp Hepatol* [Internet]. 2017;7(4):358–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2017.10.003>
14. Torres I, Moreso F. Disfunción Crónica Tardía del Trasplante Renal. 2020;
15. Rodríguez Vidal M, Parra Morales M, Rocha Ortiz S, Castro Salas M, Villalobos Sepúlveda C. Supervivencia del injerto y del receptor en el trasplante renal en el hospital Guillermo Gran Benavente (Concepción, Chile). *Enfermería Nefrológica*. 2014;17(4):292–8.
16. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2132–43.
17. ONT. Memoria actividad donación y trasplante. 2022; Available from: <https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/06/DONACION-Y-TRASPLANTE-GENERAL-2022.pdf>
18. Martí Manyalich V. The evolution of organ procurement in the world. *Rev Medica Clin Las Condes*. 2010;21(2):145–51.
19. Øien CM, Reisæter AV, Leivestad T, Dekker FW, Line PD, Os I. Living donor kidney transplantation: the effects of donor age and gender on short- and long-term outcomes. *Transplantation*. 2007;83(5):600–6.
20. Miñambre García E-F-2020. pd. PROTOCOLO NACIONAL DE MANTENIMIENTO DEL POTENCIAL DONANTE EN MUERTE ENCEFÁLICA [Internet]. 2020. Available from: <https://www.ont.es/wp-content/uploads/2023/06/Protocolo-Nacional-de-Mantenimiento-del-Donante-de-Organos.-Febrero-2020.pdf>
21. Perez Villares JM. Donación en asistolia. Donation after circulatory determination of death. *Cuad Med Forense* [Internet]. 2015;21(1–2):43–9. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5283511>
22. Chouairi F, Fuery M, Clark KA, Mullan CW, Stewart J, Caraballo C, et al. Evaluation of racial and ethnic disparities in cardiac transplantation. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(17).
23. Sellarés J, De Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the

- causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388–99.
24. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Medica Clin Las Condes* [Internet]. 2012;23(4):446–57. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)
  25. Ayala García M, Ramírez Barba, EJ Hernández Centeno J. Inmunología de los trasplantes. In: *Tratado de Cirugía General*. Segunda. 2008. p. 1281–91.
  26. Klug W. *Conceptos de Genética*. 8ª. Pearson Educación, editor. 2006.
  27. Radwan J, Babik W, Kaufman J, Lenz TL, Winternitz J. Advances in the Evolutionary Understanding of MHC Polymorphism. *Trends Genet*. 2020;36(4):298–311.
  28. Parham P, Ohta T. Population Biology of Antigen Presentation by MHC Class I Molecules. 1996;272(April).
  29. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell allorecognition pathways in solid organ transplantation. *Front Immunol*. 2018;9(NOV):1–14.
  30. Arrunátegui AM, Ramón DS, Viola LM, Olsen LG, Jaramillo A. Aspectos técnicos y clínicos de la prueba cruzada de histocompatibilidad en el trasplante de órganos sólidos. *Biomédica*. 2022;42(2):391–413.
  31. Delmonico FL, Cosimi AB, Pascual M. Managing the highly sensitized transplant recipient and B cell tolerance Seema Baid , Susan L Saidman , Nina Tolckoff-Rubin , Winfred W Williams ,. *Curr Opin Immunol*. :577–81.
  32. Becerril-Rico J. Cell signaling pathways: An approach to human physiology and pathology. *Med Interna Mex*. 2021;37(5):766–80.
  33. Zaza G, Tomei P, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Monoclonal antibody therapy and renal transplantation: Focus on adverse effects. *Toxins (Basel)*. 2014;6(3):869–91.
  34. MacDonald AS, Scarola J, Burke JT, Zimmerman JJ. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clin Ther*. 2000;22(SUPPL. B).
  35. Martín-Dávila P, Blanes M, Fortún J. Inmunosupresión e infección en el paciente trasplantado. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2007;25(2):143–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(07\)74244-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(07)74244-1)
  36. Izzaty RE, Astuti B, Cholimah N. Prednisona Kern Pharma 5 mg comprimidos EFG. *Angew*

- Chemie Int Ed 6(11), 951–952. 1967;5–24.
37. Meaney CJ, Beccari M V. Drugs That Act on the Immune System: Immunosuppressive and Immunostimulatory Drugs [Internet]. 1st ed. Vol. 39, Side Effects of Drugs Annual. Elsevier B.V.; 2017. 389–406 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.seda.2017.06.020>
  38. Salinas FO, Santos JP, Mateu LP. Inmunosupresores en el Trasplante Renal. Novartis [Internet]. 2017;1. Available from: <http://asocolnef.com/wp-content/uploads/2018/03/Cap45.pdf%0Ahttps://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-inmunosupresion-el-trasplante-renal-241>
  39. Pham P-T, Pham P-M, Pham P-C. New onset diabetes after transplantation (NODAT): an overview. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2011;175.
  40. Agarwal A, Prasad G. Post-transplant dyslipidemia: Mechanisms, diagnosis and management. *World J Transpl.* 2016;24(6(1)):125–34.
  41. EMA. Ficha técnica protopic. Agencia Eur Medicam [Internet]. 2020;1–33. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kyntheum-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kyntheum-epar-product-information_es.pdf)
  42. KINO T, HATANAKA H, HASHIMOTO M, NISHIYAMA M, GOTO T, OKUHARA M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1249–55.
  43. Haddad I, Thomas A, Karakattu S, Cornwell K. Tacrolimus Vs Cyclosporine As Primary Maintenance Immunosuppressant for Lung Transplant Recipients: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest* [Internet]. 2020;158(4):A2404. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.08.2039>
  44. McAlister VC, Haddad E, Renouf E, Malthaner RA, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: A meta-analysis. *Am J Transplant.* 2006;6(7):1578–85.
  45. EMA. Ficha técnica tacrolimus. 2023. p. 23.
  46. María Fernández A, Morales MA, Ángel Muñoz Cepeda M, Manuel González Roncero F, Lorenzo I, Mendiluce Herrero A, et al. Monitorización farmacológica de inmunosupresores. *Rev Nefrol* [Internet]. 2016;51–62. Available from:

<https://www.revistanefrologia.com/es-monitorizacion-farmacologica-inmunosupresores-articulo-X2013757516600906>

47. Kuypers DRJ, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Vanrenterghem Y. Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;75(5):434–47.
48. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(10):623–53.
49. Hochleitner B, Bösmüller C, Nehoda H, Frühwirt M, Simma B, Ellemunter H, et al. Increased tacrolimus levels during diarrhea. *Transpl Int.* 2001;14(4):230–3.
50. Christians U, Strom T, Zhang YL, Steudel W, Schmitz V, Trump S, et al. Active drug transport of immunosuppressants: New insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit.* 2006;28(1):39–44.
51. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmöller J, Oellerich M, Armstrong VW, et al. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem.* 2005;51(8):1374–81.
52. Fernandez-Gallardo M. Control de los medicamentos contraindicados en ficha técnica. *Boletín farmacoterapéutico de Castilla la Mancha [Internet].* Castilla la Mancha; 2014. (5). Report No.: XV. Available from: [https://sanidad.castillalamancha.es/sites/sescam.castillalamancha.es/files/documentos/farmacia/contraindicaciones\\_ft.pdf](https://sanidad.castillalamancha.es/sites/sescam.castillalamancha.es/files/documentos/farmacia/contraindicaciones_ft.pdf)
53. Takahashi K, Yano I, Fukuhara Y, Katsura T, Takahashi T, Ito N, et al. Distinct effects of omeprazole and rabeprazole on the tacrolimus blood concentration in a kidney transplant recipient. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(6):441–4.
54. Degraeve AL, Moudio S, Haufroid V, Chaib Eddour D, Mourad M, Bindels LB, et al. Predictors of tacrolimus pharmacokinetic variability: current evidences and future perspectives. *Expert Opin Drug Metab Toxicol [Internet].* 2020;16(9):769–82. Available from: <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1803277>
55. Hosohata K, Masuda S, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Katsura T, et al. Interaction between tacrolimus and lansoprazole, but not rabeprazole in living-donor liver transplant patients with defects of CYP2C19 and CYP3A5. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(2):134–8.

56. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, Aubert O, Van Huyen JPD, Rabant M, et al. Subclinical rejection phenotypes at 1 year post-transplant and outcome of kidney allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(7):1721–31.
57. El-Husseini A, Aghil A, Ramirez J. Outcome of kidney transplant in primary, repeat, and kidney-after-nonrenal solid-organ transplantation: 15-year analysis of recent UNOS database. *Clin Transpl*. 2017;31(11).
58. Torres AA, Elena A, Rodríguez R, Porrini E. Diabetes tras el Trasplante Renal. *Nefrol al día* [Internet]. 2020; Available from: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-diabetes-tras-el-trasplante-renal-298>
59. Eide IA, Halden TAS, Hartmann A, Dahle DO, Åsberg A, Jenssen T. Associations between posttransplantation diabetes mellitus and renal graft survival. *Transplantation*. 2017;101(6):1282–9.
60. Cristol J, Vela C, Maggi M, Descomps B, Mourad G. Oxidative stress and lipid abnormalities in renal transplant recipients with or without chronic rejection. *Transplantation*. 1998;65:1322–8.
61. Domínguez-Gil B, Espejo B, Muñoz M, Rodicio J, Morales J. Hipertensión arterial después del trasplante renal. *Hipertensión*. 2002;9(2):80–90.
62. Midtvedt K, Hartmann A, Foss A. Sustained improvement of renal graft function for two years in hypertensive renal transplant recipients treated with nifedipine as compared to lisinopril. *Transplantation*. 2001;72(11):1787–92.
63. Marcelo Fabián T. Neoplasias y trasplante renal. *Rev Nefrol Dial y Traspl* [Internet]. 2020;40(2):161–71. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/5642/564263427009/html/>
64. Lopez Oliva M, Loeches B. Infecciones en el trasplante renal. *Nefrol al día* [Internet]. 2022;41(3):162–6. Available from: <https://www.nefrologiaaldia.org/280>
65. Lemahieu W, Maes B, Verbeke K, Rutgeerts P, Geboes K, Vanrenterghem Y. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea. *Am J Transplant*. 2005;5(6):1383–91.
66. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: Meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *Br Med J*. 2005;331(7520):810–4.

67. EMA. Ficha técnica envarsus [Internet]. p. 54. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/envarsus-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/envarsus-epar-product-information_es.pdf)
68. Docampo J, Cabrini M, Bruno C, Morales YC. Esclerosis tuberosa: Evaluación de las lesiones intracraneanas. *Rev Argentina Radiol.* 2013;77(4):275–83.
69. Monteiro T, Garrido C, Pina S, Chorão R, Carrilho I, Figueiroa S, et al. Tuberous sclerosis: Clinical characteristics and their relationship to genotype/phenotype. *An Pediatría (English Ed [Internet].* 2014;81(5):289–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpede.2014.03.001>
70. Boronat S, Sábado C, T V. Guía Clínica - Grupo de Trabajo Sobre Cáncer en Síndromes Genéticos Polimalformativos (GT-CSGP). [Internet]. Hospital Vall d’Hebron, Barcelona; 2015. p. 34. Available from: [https://www.orpha.net/data/patho/Cpg/es/ComplejoEsclerosisTuberosa\\_ES-es\\_CPG\\_ORPHA805.pdf](https://www.orpha.net/data/patho/Cpg/es/ComplejoEsclerosisTuberosa_ES-es_CPG_ORPHA805.pdf)
71. Northrup H, Koenig MK, Pearson DA. Tuberous Sclerosis Complex. In Adam M.P., Everman D.B. MG. Tuberous sclerosis complex. In: GeneReviews, editor. GeneReviews [Internet]. University of Washington, Seattle; 2021. p. 31. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1220/pdf/Bookshelf\\_NBK1220.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1220/pdf/Bookshelf_NBK1220.pdf)
72. PF R. Tratado sobre enfermedades de la piel [Internet]. Bibliothèque Interuniversitaire de Médecine. 1835 [cited 2023 May 10]. Available from: <http://www.bium.univ-paris5.fr/histmed/medica/page?00584&p=82>
73. van der Poest Clement E, Jansen FE, Braun KPJ, Peters JM. Update on Drug Management of Refractory Epilepsy in Tuberous Sclerosis Complex. *Pediatr Drugs [Internet].* 2020;22(1):73–84. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40272-019-00376-0>
74. Northrup H, Krueger DA, Roberds S, Smith K, Sampson J, Korf B, et al. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: Recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference. *Pediatr Neurol.* 2013;49(4):243–54.
75. Staley BA, Vail EA, Thiele EA. Tuberous sclerosis complex: Diagnostic challenges, presenting symptoms, and commonly missed signs. *Pediatrics.* 2011;127(1).
76. Curatolo P, Nabbout R, Lagae L, Aronica E, Ferreira JC, Feucht M, et al. Management of epilepsy associated with tuberous sclerosis complex: Updated clinical recommendations.

- Eur J Paediatr Neurol [Internet]. 2018;22(5):738–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.05.006>
77. Park S, Lee EJ, Eom S, Kang H-C, Lee JS, Kim HD. Ketogenic Diet for the Management of Epilepsy Associated with Tuberous Sclerosis Complex in Children. *J Epilepsy Res.* 2017;7(1):45–9.
  78. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, et al. Sirolimus for Angiomyolipoma in Tuberous Sclerosis Complex or Lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 2008;358(2):140–51.
  79. Franz DN, Krueger DA, Care MM, Holland-Bouley K, Agricola K, Tudor C, et al. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas (SEGAs) in tuberous sclerosis (TS). *J Clin Oncol.* 2010;28(15\_suppl):2004–2004.
  80. Klawitter J, Nashan B, Christians U. Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(7):1055–70.
  81. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, Zonnenberg BA, Frost M, Belousova E, et al. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis (EXIST-2): A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9869):817–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61767-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61767-X)
  82. French JA, Lawson JA, Yapici Z, Ikeda H, Polster T, Nabbout R, et al. Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* [Internet]. 2016;388(10056):2153–63. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31419-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31419-2)
  83. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, Bebin EM, Frost M, Kuperman R, et al. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): A multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9861):125–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61134-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61134-9)
  84. EMA. Ficha técnica Afinitor [Internet]. p. 53. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/afinitor-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/afinitor-epar-product-information_es.pdf)



85. Picard N, Rouguieg-Malki K, Kamar N, Rostaing L, Marquet P. CYP3A5 genotype does not influence everolimus in vitro metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2011;91(6):652–6.
86. Warden BA, Duell PB. Management of dyslipidemia in adult solid organ transplant recipients. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2019;13(2):231–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2019.01.011>
87. EMA. Ficha técnica votubia [Internet]. p. 118. Available from: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/111710014/FT\\_111710014.html.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/111710014/FT_111710014.html.pdf)
88. J S. Farmacogenética de la terapéutica anticoagulante. In: Elsevier Masson, editor. *Medicina Personalizada Postgenómica Conceptos prácticos para clínicos*. 1ª. 2010. p. 113–36.
89. Motulsky A. Drus reactions, enzymes, and biochemical genetics. *J Am Heal Assoc*. 1957;167(7):835-.
90. EMA. Terminology in Pharmacogenetics. European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 May 10]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/terminology-pharmacogenetics-scientific-guideline>
91. Watson J, Crick F. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4356):737–8.
92. The International Genome Sample Resourc. 1000 Genomes Project [Internet]. Available from: <https://www.internationalgenome.org/>
93. Abdellah Z, Ahmadi A, Ahmed S, Aimable M, Ainscough R, Almeida J, et al. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931–45.
94. NIH. PubMed [Internet]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
95. Pennisi E. 1000 Genomes project gives new map of genetic diversity. *Science* (80- ). 2010;330(6004):574–5.
96. NIH. GenBank [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
97. Ensembl Database [Internet]. Available from: [ensembl.org](http://ensembl.org)
98. NIH. RefSeq Database [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
99. University JH. Human Genetics Knowledge for the World OMIM. Available from:

<https://www.omim.org/>

100. PharmGKB. Available from: <https://www.pharmgkb.org/>
101. PharmGKB. Guías CPIC [Internet]. Available from: <https://cpicpgx.org/guidelines/>.
102. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for CYP3A5 genotype and tacrolimus dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;98(1):19–24.
103. Del Arco J. Metabolismo de los fármacos. In: *Farmacología humana*. 5ª. Barcelona: Elsevier Masson; 2008. p. 87–100.
104. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik R. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics.* 2013;14(1):47–62.
105. Pharmvar. CYP3A5 Pharmvar [Internet]. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>
106. Krusekopf S, Roots I, Kleeberg U. Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *Eur J Pharmacol.* 2003;466(1–2):7–12.
107. Tavira B, Díaz-Corte C, Coronel D, Ortega F, Coto E. Farmacogenética del tacrolimus: ¿del laboratorio al paciente? *Nefrología.* 2014;34(1):11–7.
108. Dirks N, Huth B, Yates C, Meibohm B. Pharmacokinetics of immunosuppressants: a perspective on ethnic differences. *Pharmacol Ther.* 2004;42(12):701–18.
109. Chen P, Li J, Li J, Deng R, Fu Q, Chen J, et al. Dynamic effects of CYP3A5 polymorphism on dose requirement and trough concentration of tacrolimus in renal transplant recipients. *J Clin Pharm Ther.* 2017;42(1):93–7.
110. Abdullah-Koolmees H, van Keulen A, Nijenhuis M, Deneer V. Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPgX Guidelines. *Front Pharmacol.* 2021;
111. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2010;87(6):721–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2010.17>

112. Tavira B, Garcíá EC, Díaz-Corte C, Ortega F, Arias M, Torres A, et al. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: Analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(5):825–33.
113. Srinivas L, Gracious N, Nair RR. Pharmacogenetics Based Dose Prediction Model for Initial Tacrolimus Dosing in Renal Transplant Recipients. *Front Pharmacol*. 2021;12(November):1–9.
114. Cheng F, Li Q, Wang J, Hu M, Zeng F, Wang Z, et al. Genetic polymorphisms affecting tacrolimus metabolism and the relationship to post-transplant outcomes in kidney transplant recipients. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021;14(September):1463–74.
115. Shao J, Wang C, Fu P, Chen F, Zhang Y, Wei J. Impact of Donor and Recipient CYP3A5\*3 Genotype on Tacrolimus Population Pharmacokinetics in Chinese Adult Liver Transplant Recipients. *Ann Pharmacother*. 2020;54(7):652–61.
116. Liu J, Ouyang Y, Chen D, Yao B, Lin D, Li Z, et al. Donor and recipient P450 gene polymorphisms influence individual pharmacological effects of tacrolimus in Chinese liver transplantation patients. *Int Immunopharmacol [Internet]*. 2018;57(September 2017):18–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.005>
117. Pinon M, De Nicolò A, Pizzol A, Antonucci M, D'Avolio A, Serpe L, et al. Early impact of donor CYP3A5 genotype and Graft-to-Recipient Weight Ratio on tacrolimus pharmacokinetics in pediatric liver transplant patients. *Sci Rep [Internet]*. 2021;11(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79574-7>
118. Lemaitre F, Beziau E, Goldwirt L, Fernandez C, Farinotti R, Varnous S, et al. Population pharmacokinetics of everolimus in cardiac recipients: Comedications, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms. *Ther Drug Monit*. 2012;34(6):686–94.
119. Kniepeiss D, Renner W, Trummer O, Wagner D, Wasler A, Khoschsorur GA, et al. The role of CYP3A5 genotypes in dose requirements of tacrolimus and everolimus after heart transplantation. *Clin Transplant*. 2011;25(1):146–50.
120. Schoeppler KE, Aquilante CL, Kiser TH, Fish DN, Zamora MR. The impact of genetic polymorphisms, diltiazem, and demographic variables on everolimus trough concentrations in lung transplant recipients. *Clin Transplant*. 2014;28(5):590–7.
121. Moes DJAR, Press RR, Den Hartigh J, Van Der Straaten T, De Fijter JW, Guchelaar HJ. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of everolimus in renal transplant

- patients. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(7):467–80.
122. Bonnet S, Falkowski S, Deppenweiler M, Monchaud C, Arnion H, Picard N, et al. Effect of genetic polymorphisms in CYP3A4, CYP3A5, and m-TOR on everolimus blood exposure and clinical outcomes in cancer patients. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2020;20(5):647–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-020-0152-7>
  123. NIH. CYP3A4 Pharmvar [Internet]. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>
  124. Yoshizawa K, Walter C, Morris SJ, Meir J, Spiegelman D, Rimm EB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(16):1219–29.
  125. Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased Transcriptional Activity of the CYP3A4\* 1B Promoter Variant. *Environ Mol Mutagen*. 2003;42(4):299–305.
  126. Šimičević L, Canjuga I, Zibar L, Borić-Bilušić A, Ganoci L, Božina N. Rapid clearance of tacrolimus blood concentration triggered by variant pharmacogenes. *J Clin Pharm Ther* . 2022;47(9):1461–5.
  127. Albekairy A, Alkatheri A, Fujita S, Hemming A, Howard R, Reed A, et al. Cytochrome P450 3A4FNx011B as pharmacogenomic predictor of tacrolimus pharmacokinetics and clinical outcome in the liver transplant recipients. *Saudi J Gastroenterol*. 2013;19(2):89–95.
  128. Shi WL, Tang HL, Zhai S Di. Effects of the CYP3A4  $\delta$  1B genetic polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in adult renal transplant recipients: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):1–14.
  129. Huang L, Wang J, Yang J, Zhang H, Ni Y, Zhu Z, et al. Impact of CYP3A4/5 and ABCB1 polymorphisms on tacrolimus exposure and response in pediatric primary nephrotic syndrome. *Pharmacogenomics*. 2019;20(15):1071–83.
  130. Zeigler-Johnson C, Friebel T, Walker AH, Wang Y, Spangler E, Panossian S, et al. CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2004;64(22):8461–7.
  131. Miao J, Jin Y, Marunde RL, Kim S, Quinney S, Radovich M, et al. Association of genotypes of the CYP3A cluster with midazolam disposition in vivo. *Pharmacogenomics J*. 2009;9(5):319–26.

132. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, Van Der Heiden IP, Van Gelder T, et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem*. 2011;57(11):1574–83.
133. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2011;11(4):274–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/tpj.2010.28>
134. Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, et al. Impact of CYP3A4\*22 Allele on Tacrolimus Pharmacokinetics in Early Period After Renal Transplantation. *Ther Drug Monit*. 2013;35(5):608–16.
135. Pallet N, Jannot AS, El Bahri M, Etienne I, Buchler M, De Ligny BH, et al. Kidney transplant recipients carrying the CYP3A4\*22 allelic variant have reduced tacrolimus clearance and often reach supratherapeutic tacrolimus concentrations. *Am J Transplant*. 2015;15(3):800–5.
136. Woillard JB, Chouchana L, Picard N, Lorient MA. Pharmacogenetics of immunosuppressants: State of the art and clinical implementation – recommendations from the French National Network of Pharmacogenetics (RNPGx). *Therapie* [Internet]. 2017;72(2):285–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.therap.2016.09.016>
137. Moes DJAR, Swen JJ, Den Hartigh J, Van Der Straaten T, Homan Van Der Heide JJ, Sanders JS, et al. Effect of CYP3A4\*22, CYP3A5\*3, and CYP3A combined genotypes on cyclosporine, everolimus, and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplantation. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3(2).
138. Pascual T, Apellániz-Ruiz M, Pernaut C, Cueto-Felgueroso C, Villalba P, Carlos A, Manso L, IngladaPerez L, Robledo M, Rodriguez-Antona C CE. Polymorphisms associated with everolimus pharmacokinetics, toxicity and survival in metastatic breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(7):1–13.
139. Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, et al. Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79(4):339–49.
140. Apellániz-Ruiz M, Inglada-Pérez L, Naranjo MEG, Sánchez L, Mancikova V, Currás-Freixes M, et al. High frequency and founder effect of the CYP3A4\*20 loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. *Pharmacogenomics*

- J. 2015;15(3):288–92.
141. Gómez-Bravo MA, Apellaniz-Ruiz M, Salcedo M, Fondevila C, Suarez F, Castellote J, et al. Influence of donor liver CYP3A4\*20 loss-of-function genotype on tacrolimus pharmacokinetics in transplanted patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2018;28(2):41–8.
  142. Hernandez S, Cuan CA, Deininger K, Lindenfeld J, Schlendorf K, Driest S Van, et al. Composite CYP3A (CYP3A4 and CYP3A5) phenotypes and influences on tacrolimus dose adjusted concentration in adult heart transplant recipients. 2023;1–18. Available from: <https://orcid.org/0000-0001-6925-7064Article>
  143. Passey C, Birnbaum AK, Brundage RC, Oetting WS, Israni AK, Jacobson PA. Dosing equation for tacrolimus using genetic variants and clinical factors. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(6):948–57.
  144. Hannachi I, Chadli Z, Kerkeni E, Kolsi A, Hammouda M, Chaabane A, et al. Influence of CYP3A polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2021;21(1):69–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-020-00179-4>
  145. Michaud V, Frappier M, Dumas MC, Turgeon J. Metabolic activity and mRNA levels of human cardiac CYP450s involved in drug metabolism. *PLoS One*. 2010;5(12).
  146. Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: A review of clinical studies. *Pharmacogenomics*. 2009;10(9):1489–510.
  147. Genvigir F, Nishikawa A, Felipe C. Influence of ABCC2, CYP2C8, and CYP2J2 Polymorphisms on Tacrolimus and Mycophenolate Sodium–Based Treatment in Brazilian Kidney Transplant Recipients. *Int J Lab Hematol*. 2017;37(5):535–45.
  148. Vecchia Genvigir FD, Campos-Salazar AB, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Quateli Doi S De, et al. CYP3A5\*3 and CYP2C8\*3 variants influence exposure and clinical outcomes of tacrolimus-based therapy. *Pharmacogenomics*. 2019;21(1):7–21.
  149. Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Benitez J, Caravaca F, Cubero JJ. CYP2C83 polymorphism and donor age are associated with allograft dysfunction in kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors. *J Clin Pharmacol*. 2013;53(4):427–34.
  150. Kniepeiss D, Wagner D, Wasler A, Tscheliessnigg KH RW. The role of CYP2C8 genotypes in dose requirement and levels of everolimus after heart transplantation. *Wien Klin*

- Wochenschr. 2013;125(13–14):393–5.
151. Yamada T, Zhang M, Masuda S. Significance of Ethnic Factors in Immunosuppressive Therapy Management After Organ Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2020;42(3):369–80.
  152. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;75(1):13–33.
  153. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2009;1794(5):860–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.014>
  154. Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmgenomics Pers Med.* 2016;9:47–58.
  155. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar S V., et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science (80- ).* 2007;315(5811):525–8.
  156. Wang R, Sun X, Deng YS, Qiu XW. Effects of MDR1 1236C > T-2677G > T-3435C > T polymorphisms on the intracellular accumulation of tacrolimus, cyclosporine A, sirolimus and everolimus. *Xenobiotica* [Internet]. 2019;49(11):1373–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00498254.2018.1563732>
  157. Hung CC, Chen CC, Lin CJ, Liou HH. Functional evaluation of polymorphisms in the human ABCB1 gene and the impact on clinical responses of antiepileptic drugs. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(5):390–402.
  158. Salama NN, Yang Z, Bui T HR. MDR1 Haplotypes Significantly Minimize Intracellular Uptake and Transcellular P-gp Substrate Transport in Recombinant LLC-PK1 Cells. *J Pharm Sci.* 2006;95:2293–308.
  159. Li Y, Hu X, Cai B, Chen J, Bai Y, Tang J, et al. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435 polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2012;27(1):12–8.
  160. Venuto RC, Meaney CJ, Chang S, Leca N, Consiglio JD, Wilding GE, et al. Association of extrarenal adverse effects of posttransplant immunosuppression with sex and ABCB1 haplotypes. *Med (United States).* 2015;94(37):1–11.

161. Yu M, Liu M, Zhang W, Ming Y. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Pharmacogenetics of Tacrolimus in Kidney Transplantation. *Curr Drug Metab.* 2018;19(6):513–22.
162. Yang M, Huan G, Wang M. Influence of CYP3A and ABCB1 Single Nucleotide Polymorphisms on the Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Tacrolimus in Pediatric Patients. *Curr Drug Metab.* 2018;19(14):1141–51.
163. Capron A, Mourad M, Meyer M De, Pauw L De, Eddour DC, Latinne D, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms influence tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation. *Pharmacogenomics.* 2010;11(5):703–14.
164. Ford J, Hoggard PG, Owen A, Khoo SH, Back DJ. A simplified approach to determining P-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Immunol Methods.* 2003;274(1–2):129–37.
165. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3473–8.
166. Sallustio BC, Noll BD, Hu R, Barratt DT, Tuke J, Collier JK, et al. Tacrolimus dose, blood concentrations and acute nephrotoxicity, but not CYP3A5/ABCB1 genetics, are associated with allograft tacrolimus concentrations in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(10):3901–9.
167. Hamadeh IS, Zhang Q, Steuerwald N, Hamilton A, Druhan LJ, McSwain M, et al. Effect of CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 Polymorphisms on Intravenous Tacrolimus Exposure and Adverse Events in Adult Allogeneic Stem Cell Transplant Patients. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2019;25(4):656–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.766>
168. Tavira B, Gómez J, Díaz-Corte C, Coronel D, Lopez-Larrea C, Suarez B, et al. The donor ABCB1 (MDR-1) C3435T polymorphism is a determinant of the graft glomerular filtration rate among tacrolimus treated kidney transplanted patients. *J Hum Genet.* 2015;60(5):273–6.
169. Yang L, De Winter BCM, Van Schaik RHN, Xie RX, Li Y, Andrews LM, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in living donors do not impact clinical outcome after kidney



- transplantation. *Pharmacogenomics*. 2018;19(11):895–903.
170. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provôt F, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: Impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(9):3046–50.
  171. Mengel M, Jonigk D, Marwedel M, Kleeberger W, Bredt M, Bock O, et al. Tubular Chimerism Occurs Regularly in Renal Allografts and Is Not Correlated to Outcome. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(4):978–86.
  172. Lesche D, Sigurdardottir V, Setoud R, Englberger L, Fiedler GM, Largiadèr CR, et al. Influence of CYP3A5 genetic variation on everolimus maintenance dosing after cardiac transplantation. *Clin Transplant*. 2015;29(12):1213–20.
  173. de Wit D, Schneider TC, Moes DJAR, Roozen CFM, den Hartigh J, Gelderblom H, et al. Everolimus pharmacokinetics and its exposure–toxicity relationship in patients with thyroid cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(1):63–71.
  174. Robertsen I, Vethe NT, Midtvedt K, Falck P, Christensen H, Åsberg A. Closer to the site of action: Everolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells correlate well with whole blood concentrations. *Ther Drug Monit*. 2015;37(5):675–80.
  175. Istrate MA, Nussler AK, Eichelbaum M, Burk O. Regulation of CYP3A4 by pregnane X receptor: The role of nuclear receptors competing for response element binding. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;393(4):688–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.058>
  176. Owen A, Chandler B, Back DJ KS. Expression of pregnane-X-receptor transcript in peripheral blood mononuclear cells and correlation with MDR1 mRNA. *Antivir Ther*. 2004;9:819–821.
  177. Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R, Schuetz E. Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X receptor/NR1I2 and their association with CYP3A4 expression. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(1):169–81.
  178. Wang Y, Xiang X, Huang WW, Sandford AJ, Wu SQ, Zhang MM, et al. Association of PXR and CAR Polymorphisms and Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38452-z>

179. Henderson CJ, Otto DME, Carrie D, Magnuson MA, McLaren AW, Rosewell I, et al. Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem*. 2003;278(15):13480–6.
180. De Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DRJ. The P450 oxidoreductase \*28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(9):1281–91.
181. Si S, Wang Z, Yang H, Han Z, Tao J, Chen H, et al. Impact of single nucleotide polymorphisms on P450 oxidoreductase and peroxisome proliferator-activated receptor alpha on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2019;19(1):42–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-018-0061-1>
182. Gao Y, Ma J. Cytochrome P450 oxidoreductase variant A503V contributes to the increased CYP3A5 activity with tacrolimus in vitro. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2022;18(7–8):529-535.
183. Elens, Laure; Hesselink, Dennis A.; Bouamar, Rachida; Budde, Klemens; de Fijter, Johannes W.; De Meyer, Martine; Mourad, Michel; Kuypers, Dirk R. J.; Haufroid, Vincent; van Gelder, Teun; van Schaik RHN. Impact of POR\*28 on the Pharmacokinetics of Tacrolimus and Cyclosporine A in Renal Transplant Patients Laure. *Ther Drug Monit*. 2014;36(1).
184. Li CJ, Li L, Lin L, Jiang HX, Zhong ZY, Li WM, et al. Impact of the CYP3A5, CYP3A4, COMT, IL-10 and POR genetic polymorphisms on tacrolimus metabolism in Chinese renal transplant recipients. *PLoS One*. 2014;9(1):1–9.
185. Kurzawski M, Malinowski D, Dziewanowski K, Drożdżik M. Impact of PPARA and POR polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and new-onset diabetes in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(8):397–400.
186. Elens L, Sombogaard F, Hesselink DA, Van Schaik RHN, Van Gelder T. Single-nucleotide polymorphisms in P450 oxidoreductase and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  are associated with the development of new-onset diabetes after transplantation in kidney transplant recipients treated with tacrolimus. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(12):649–57.

187. Sridharan K, Shah S, Jassim A, Hammad M, Al Gadhban JE, Al Segai O. Evaluation of Pharmacogenetics of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Efflux Transporter in Renal Transplants Receiving Immunosuppressants. *J Pers Med.* 2022;12(5).
188. Maguire M, Franz T, Hains DS. A clinically significant interaction between tacrolimus and multiple proton pump inhibitors in a kidney transplant recipient. *Pediatr Transplant.* 2012;16(6):1–4.
189. Ingelman-Sundberg M, Persson A, Jukic M. Polymorphic expression of CYP2C19 and CYP2D6 in the developing and adult human brain causing variability in cognition, risk for depression and suicide: the search for the endogenous substrates. *Pharmacogenomics.* 2014;15(15):1841–4.
190. Kee PS, Maggo SDS, Kennedy MA, Barclay ML, Miller AL, Lehnert K, et al. Omeprazole Treatment Failure in Gastroesophageal Reflux Disease and Genetic Variation at the CYP2C Locus. *Front Genet.* 2022;13(May):1–8.
191. Bosó V, Herrero MJ, Bea S, Galiana M, Marrero P, Marqués MR, et al. Increased hospital stay and allograft dysfunction in renal transplant recipients with Cyp2c19 AA variant in SNP rs4244285. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(2):480–7.
192. García-García JA. ¿Qué debemos conocer de los inhibidores de bomba profanes, para su uso en las unidades de dolor? *Rev la Soc Esp del Dolor.* 2007;14(7):501–10.
193. Willard JM, Lee DA, Holland MM. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods Mol Biol.* 1998;98:9–18.
194. Ng FL, Holt DW, Chang RWS, MacPhee IAM. Black renal transplant recipients have poorer long-term graft survival than CYP3A5 expressers from other ethnic groups. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(2):628–34.
195. Lee JS, Cheong HS, Kim LH, Kim JO, Seo DW, Kim YH, et al. Screening of genetic polymorphisms of CYP3A4 and CYP3A5 genes. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013;17(6):479–84.
196. Levran O, Peles E, Hamon S, Randesi M, Adelson M, Kreek MJ. CYP2B6 SNPs are associated with methadone dose required for effective treatment of opioid addiction. *Addict Biol.* 2013;18(4):709–16.
197. Minhas S, Setia N, Pandita S, Saxena R, Verma IC, Aggarwal S. Prevalence of CYP2C8 polymorphisms in a North Indian population. *Genet Mol Res.* 2013;12(3):2260–6.

198. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*. 2001;11(7):597–607.
199. Wai-lin, W.; Jing, J.; Shu-sen, Z.; Li-hua, W.; Ting-bo, L.; Song-feng, Y.; Sheng Y. Tacrolimus Dose Requirement in Relation to Donor and Recipient ABCB1 and CYP3A5 Gene Polymorphisms in Chinese Liver Transplant Patients. *Liver Transplant*. 2006;12:775–80.
200. Martinelli M, Scapoli L, Cura F, Rodia MT, Ugolini G, Montroni I, et al. Colorectal cancer susceptibility: Apparent gender-related modulation by ABCB1 gene polymorphisms. *J Biomed Sci*. 2014;21(1):1–8.
201. Balan S, Bharathan SP, Vellichiramal NN, Sathyan S, Joseph V, Radhakrishnan K, et al. Genetic association analysis of ATP binding cassette protein family reveals a novel association of ABCB1 genetic variants with epilepsy risk, but not with drug-resistance. *PLoS One*. 2014;9(2).
202. Reyes-Hernández OD, Vega L, Jiménez-Ríos MA, Martínez-Cervera PF, Lugo-García JA, Hernández-Cadena L, et al. The PXR rs7643645 polymorphism is associated with the risk of higher prostate-specific antigen levels in prostate cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(6):1–8.
203. Nieuwoudt E. Effect of genetic variants in genes encoding two nuclear receptors (PXR and CAR) on efavirenz levels and treatment outcome in South African HIV-infected females. Stellenbosch University; 2014.
204. Ghiyas Tabari R, Marjani A, Agh Ataby O, Reza Mansourian A, Mansour Samai N. Genetic polymorphism of cytochrome p450 (2C19) enzyme in Iranian Turkman ethnic group. *Oman Med J*. 2013;28(4):237–44.
205. Kattel K, Evande R, Tan C, Mondal G, Grem JL, Mahato RI. Impact of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics of nelfinavir in patients with pancreatic cancer. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80(2):267–75.
206. Baldwin RM, Ohlsson S, Pedersen RS, Mwinyi J, Ingelman-Sundberg M, Eliasson E, et al. Increased omeprazole metabolism in carriers of the CYP2C19\*17 allele; a pharmacokinetic study in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):767–74.
207. Butler JM. DNA Quantitation. *Adv Top Forensic DNA Typing*. 2012;49–67.
208. IDT. rhAmp SNP Genotyping System [Internet]. Available from:

<https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/genotyping/rhamp-snp-genotyping>

209. Crow JF. Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics*. 1999;152(3):821–5.
210. Wallemacq P, Armstrong V, Brunet M, Haufroid V, Holt D, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: Report of the european consensus conference. *Ther Drug Monit [Internet]*. 2009;31(2):139–52. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2009313029>
211. Grinyó JM, Ekberg H, Mamelok RD, Oppenheimer F, Sánchez-Plumed J, Gentil MA, et al. The pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in renal transplant recipients receiving standard-dose or low-dose cyclosporine, low-dose tacrolimus or low-dose sirolimus: The Symphony pharmacokinetic substudy. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(7):2269–76.
212. Mohamed ME, Schladt DP, Guan W, Wu B, van Setten J, Keating BJ, et al. Tacrolimus troughs and genetic determinants of metabolism in kidney transplant recipients: A comparison of four ancestry groups. Vol. 19, *American Journal of Transplantation*. 2019. 2795–2804 p.
213. Süsal C, Döhler B. Late intra-patient tacrolimus trough level variability as a major problem in kidney transplantation: A Collaborative Transplant Study Report. *Am J Transplant [Internet]*. 2019;19(10):2805–13. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajt.15346>
214. Brenes González L, Montero Valverde D, Abarca Brenes I. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos relacionados con el uso de antibióticos en adultos mayores. *Rev Medica Sinerg*. 2022;7(4):e780.
215. Scandlyn MJ, Stuart EC, Rosengren RJ. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(4):413–24.
216. Zarezadeh M, Saedisomeolia A, Shekarabi M, Khorshidi M, Emami MR, Müller DJ. The effect of obesity, macronutrients, fasting and nutritional status on drug-metabolizing cytochrome P450s: a systematic review of current evidence on human studies. *Eur J Nutr [Internet]*. 2021;60(6):2905–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02421-y>
217. Størset E, Holford N, Midtvedt K, Bremer S, Bergan S, Åsberg A. Importance of hematocrit for a tacrolimus target concentration strategy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014;70(1):65–77.

218. Campagne O, Mager DE, Tornatore KM. Population Pharmacokinetics of Tacrolimus in Transplant Recipients: What Did We Learn About Sources of Interindividual Variabilities? *J Clin Pharmacol*. 2019;59(3):309–25.
219. Grevel J. Absorption of cyclosporine A after oral dosing. *Transpl Proc*. 1986;18(6):9–15.
220. Limsrichamrern S, Chanapul C, Mahawithitwong P, Sirivatanauksorn Y, Kositamongkol P, Asavakarn S, et al. Correlation of Hematocrit and Tacrolimus Level in Liver Transplant Recipients. *Transplant Proc* [Internet]. 2016;48(4):1176–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.12.096>
221. F. Moreso, R. Alegre, G. Ariceta, I. Beneyto, C. Bernis, N. Calvo, J.F. Crespo, P. Delgado, R. Gallego, E. Gómez, R. Guerra, D. Navarro, M .A. Rodríguez ES. Tratamiento de la anemia postrasplante renal. *Nefrologia*. 2011;2(2):16–24.
222. Sánchez-Fructuoso AI. Revisión de un nuevo inmunosupresor: Micofenolato sódico con cubierta entérica (Myfortic®). *Nefrologia*. 2005;25(3):234–44.
223. Ekberg H, Kyllönen L, Madsen S, Grave G, Solbu D, Holdaas H. Increased prevalence of gastrointestinal symptoms associated with impaired quality of life in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83(3):282–9.
224. EMA. Ficha técnica prednisona [Internet]. Available from: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/70108/Prospecto\\_70108.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/70108/Prospecto_70108.html)
225. Millán J, Pedro-Botet J, Climent E, Millán J, Rius J. Miopatía asociada al uso de estatinas en la práctica clínica. Resultados del estudio DAMA. *Clin e Investig en Arterioscler* [Internet]. 2017;29(1):7–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2016.07.003>
226. Zhao W, Fakhoury M, Maisin A, Baudouin V, Storme T, Deschênes G, et al. Pharmacogenetic determinant of the drug interaction between tacrolimus and omeprazole. *Ther Drug Monit*. 2012;34(6):739–41.
227. Tylor, K; (Nova Southeastern University); Fritz, K (Nova Southeastern University); Parmar M (Nova SU. Lamivudine [Internet]. StatPearls. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559252/%0A>
228. Nakata S, Kakimoto K, Numa K, Kinoshita N, Kawasaki Y, Tatsumi Y, Tawa H, Koshiba R, Hirata Y, Ota K, Sakiyama N, Kojima Y, Nishikawa H, Inoue T, Takeuchi T, Fukunishi S, Miyazaki T, Nakamura S HK. Risk Factors for Nephrotoxicity due to Tacrolimus Therapy

- for Ulcerative Colitis. *Digestion*. 2022;103(5):339–346.
229. Harsha DW, Bray GA. Weight loss and blood pressure control (Pro). *Hypertension*. 2008;51(6):1420–5.
230. Xuan NT, Hop VQ, Kien TQ, Toan PQ, Thang LV, Binh HT, et al. Frequencies and Association of CYP3A5 Polymorphism With Tacrolimus Concentration Among Renal Transplant Recipients in Vietnam. *Transplant Proc* [Internet]. 2022;54(8):2140–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2022.07.009>
231. Nuchjumroon A, Vadcharavivad S, Singhan W, Poosoonthornsri M, Chancharoenthana W, Udomkarnjananun S, et al. Comparison of Tacrolimus Intra-Patient Variability during 6–12 Months after Kidney Transplantation between CYP3A5 Expressers and Nonexpressers. *J Clin Med*. 2022;11(21).
232. Reiningger KA, Onyeaghala G, Anderson-Haag T et al. Higher number of tacrolimus dose adjustments in kidney transplant recipients who are extensive and intermediate CYP3A5 metabolizers. *Clin Transplant*. 2023;4:37.
233. Yanik M V., Seifert ME, Locke JE, Hauptfeld-Dolejssek V, Crowley MR, Cutter GR, et al. CYP3A5 genotype affects time to therapeutic tacrolimus level in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2019;23(5):1–9.
234. Yang S, Jiang H, Li C, Lu H, Li C, Ye D, et al. Genomewide association study identifies a novel variant associated with tacrolimus trough concentration in Chinese renal transplant recipients. *Clin Transl Sci*. 2022;15(11):2640–51.
235. Hannachi I, Fredj N Ben, Chadli Z, Fadhel N Ben, Romdhane H Ben, Touitou Y, et al. Effect of CYP3A4\*22 and CYP3A4\*1B but not CYP3A5\*3 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetic model in Tunisian kidney transplant. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2020;396:115000. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115000>
236. Semiz S, Dujić T, Ostanek B, Prnjavorac B, Bego T, Malenica M, et al. Analysis of CYP3A4\*1B and CYP3A5\*3 polymorphisms in population of Bosnia and Herzegovina. *Med Glas*. 2011;8(1):84–9.
237. Chitnis SD, Ogasawara K, Schniedewind B, Gohh RY, Christians U, Akhlaghi F. Concentration of tacrolimus and major metabolites in kidney transplant recipients as a function of diabetes mellitus and cytochrome P450 3A gene polymorphism. *Xenobiotica*. 2013;43(7):641–9.

238. Dapia I, Tabakov A, Espinosa Román L, Díaz L, Arias Lajara P, Melgosa M, et al. Effect of the CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1, POR and NR1I2 genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol. *IBJ Clin Pharmacol*. 2017;1(1):1–11.
239. Elens L, Hesselink DA, van Schaik RHN, van Gelder T. The CYP3A4\*22 allele affects the predictive value of a pharmacogenetic algorithm predicting tacrolimus predose concentrations. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(6):1545–7.
240. Drozdziak M. Pharmacokinetics and Genomics of Immunosuppressive Drugs [Internet]. *Kidney Transplantation, Bioengineering, and Regeneration: Kidney Transplantation in the Regenerative Medicine Era*. Elsevier Inc.; 2017. 429–443 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801734-0.00030-8>
241. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RHN. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: One step closer toward individualized immunosuppression? *Pharmacogenomics*. 2005;6(4):323–37.
242. Kravljaca M, Perovic V, Pravica V, Brkovic V, Milinkovic M, Lausevic M, et al. The importance of MDR1 gene polymorphisms for tacrolimus dosage. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2016;83:109–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.020>
243. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(9):659–65.
244. Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(3):413–21.
245. Peng W, Lin Y, Zhang H, Meng K. Effect of ABCB1 3435C>T Genetic Polymorphism on Pharmacokinetic Variables of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Ther* [Internet]. 2020;42(10):2049–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.016>
246. Gómez-Bravo MA, Salcedo M, Fondevila C, Suarez F, Castellote J, Rufian S, et al. Impact of donor and recipient CYP3A5 and ABCB1 genetic polymorphisms on tacrolimus dosage requirements and rejection in caucasian spanish liver transplant patients. *J Clin*



- Pharmacol. 2013;53(11):1146–54.
247. Fernando ME, Sellappan M, Srinivasa Prasad ND, Suren S TK. Influence of CYP3A5 and ABCB1 Polymorphism on Tacrolimus Drug Dosing in South Indian Renal Allograft Recipients. *Indian J Nephrol.* 2019;29(4):261–6.
  248. Wang YM, Chai SC, Brewer CT, Chen T. Pregnane X receptor and drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014;10(11):1521–32.
  249. Jiska Cohen-Mansfield, Maha Dakheel-Ali, MD, Marcia S. Marx, PhD, Khin Thein, MD, and Natalie G. Regier P, Waage et al. Activation of Pregnane X Receptor Sensitizes Mice to Hemorrhagic Shock Induced Liver Injury. *Physiol Behav.* 2017;176(1):139–48.
  250. Wang JY, Tsai CH, Lee YL, Lee LN, Hsu CL, Chang HC, et al. Gender-Dimorphic Impact of PXR Genotype and Haplotype on Hepatotoxicity during Antituberculosis Treatment. *Med (United States).* 2015;94(24):1–9.
  251. Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(1):1–8.
  252. Krekels EHJ, Rower JE, Constance JE, Knibbe CAJ, Sherwin CMT. Hepatic Drug Metabolism in Pediatric Patients [Internet]. *Drug Metabolism in Diseases.* Elsevier Inc.; 2017. 181–206 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802949-7.00008-0>
  253. Piletta-Zanin A, De Mul A, Rock N, Lescuyer P, Samer CF, Rodieux F. Case Report: Low Hematocrit Leading to Tacrolimus Toxicity. *Front Pharmacol.* 2021;12(August):1–6.
  254. Moreau C, Debray D, Lorient MA, Taburet AM F V. Interaction between tacrolimus and omeprazole in a pediatric liver transplant recipient. *Transplantation.* 2006;27(82):487–8.
  255. Li Y, Liu Y SZ. Investigation of pharmacologic interactions between omeprazole and tacrolimus in a membranous nephropathy patient with CYP3A5 nonexpresser: a case report. *Pharmacogenet Genomics.* 2022;32(7):268-271.
  256. Kovarik, J.M.; Kahan, B.D.; Kaplan, B.; Lorber, M.; Winkler, M.; Rouilly, M.; Gerbeau, C.; Cambon, N.; Boger, R.; Rordorf C. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(1):48–56.

257. Geka Y, Hamada Y, Fuchinoue S KT. Evaluation of factors influencing the ratio of the trough blood concentration to dose level of everolimus in Japanese kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2022;73.
258. Yagishita H, Kagaya H, Saito M, Numakura K, Yamamoto R, Sagehashi R, et al. Effects of NR1I2 and ABCB1 Genetic Polymorphisms on Everolimus Pharmacokinetics in Japanese Renal Transplant Patients. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):1–10.
259. Cravedi P, Ruggenenti P, Remuzzi G. Sirolimus for calcineurin inhibitors in organ transplantation: Contra. *Kidney Int [Internet]*. 2010;78(11):1068–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.268>
260. Ravaud A, Urva SR, Grosch K, Cheung WK, Anak O, Sellami DB. Relationship between everolimus exposure and safety and efficacy: Meta-analysis of clinical trials in oncology. *Eur J Cancer [Internet]*. 2014;50(3):486–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.11.022>
261. Shipkova M, Hesselink DA, Holt DW, Billaud EM, Van Gelder T, Kunicki PK, et al. Therapeutic drug monitoring of everolimus: A consensus report. *Ther Drug Monit*. 2016;38(2):143–69.
262. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, Bebin EM, Frost M, Kuperman R, et al. Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis complex: 2-year open-label extension of the randomised EXIST-1 study. *Lancet Oncol [Internet]*. 2014;15(13):1513–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70489-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70489-9)
263. van der Wouden CH, Marck H, Guchelaar HJ, Swen JJ van den HW. Cost-Effectiveness of Pharmacogenomics-Guided Prescribing to Prevent Gene-Drug-Related Deaths: A Decision-Analytic Model. *Front Pharmacol*. 2022;13.

# **ANEXOS**

.

ANEXO I. Dictamen ético favorable (CEICA) para el estudio de tacrolimus y las ampliaciones solicitadas



**Informe Dictamen Favorable  
Proyecto Investigación Biomédica**

C.P. - C.I. PI15/0247

01 de febrero de 2017

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

**1º.** Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 01/02/2017, Acta Nº 02/2017 ha evaluado la propuesta de modificación referida al estudio:

**Título: Estudio farmacogenético de dos casos: posible interacción tacrolimus-omeprazol.**

**Investigador Principal: Mª Pilar Ribate Molina. Universidad San Jorge**

**Versión hoja de información a los pacientes y consentimiento informado: octubre/2015**

**2º.** Dicha modificación propone las versiones:

**Versión protocolo: enero/2017**

**3º.** Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

**4º.** Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 1 de febrero de 2017

Fdo:



Dña. María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

**1º.** Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 27/02/2019, Acta Nº 04/2019 ha evaluado la propuesta de modificación referida al estudio:

**Título: ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS.**

**Investigador Principal: M<sup>a</sup> Pilar Ribate Molina. Universidad San Jorge**

**2º.** Dicha modificación propone las versiones:

**Versión protocolo: V5, 23/02/2019**

**Versión documento de información y consentimiento: V5, 23/02/2019**

**3º.** Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

**4º.** Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza

Fdo:

GONZALEZ  
HINJOS MARIA -  
DNI 03857456B

Firmado digitalmente  
por GONZALEZ HINJOS  
MARIA - DNI 03857456B  
Fecha: 2019.03.01  
12:40:43 +01'00'

Dña. María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 20/11/2019, Acta Nº 20/2019 ha evaluado la propuesta de modificación referida al estudio:

**Título: ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS.**

**Investigador Principal: Mª Pilar Ribate Molina. Universidad San Jorge**

2º. Dicha modificación propone las versiones:

**Versión protocolo: v6, 05/11/2019**

**Versión documento de información y consentimiento: v6, 05/11/2019**

3º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

4º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del proyecto.

Lo que firmo en Zaragoza

Fdo:

**GONZALEZ  
HINJOS MARIA  
- DNI  
03857456B**

Firmado digitalmente  
por GONZALEZ  
HINJOS MARIA - DNI  
03857456B  
Fecha: 2019.11.22  
15:11:30 +01'00'

Dña. María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)





## Anexo II. Consentimiento informado de los pacientes del estudio de tacrolimus.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

El objetivo del proyecto “**ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS**” de la Universidad de San Jorge es comprobar, mediante el genotipado de las muestras la relación existente entre la presencia de determinadas alteraciones genéticas y la interacción entre ciertos fármacos, entre ellos Omeprazol, y Tacrolimus. En la literatura científica se ha estudiado ampliamente la relación que existe entre la presencia de ciertas variaciones genéticas con la aparición de efectos adversos y la necesidad de dosis mayores o menores de los fármacos así como la estabilidad del tratamiento en pacientes polimedcados.

Se trata de un proyecto de INVESTIGACIÓN que pretende contribuir a explicar la presencia de efectos adversos derivados del tratamiento con tacrolimus en ciertos pacientes que, tras la realización del análisis genético, presenten un genotipo que predisponga a ello. Existe la posibilidad de que no obtenga beneficios por la participación en el proyecto de investigación.

El proyecto consistirá en:

1. Obtención de la muestra por punción capilar: se depositará una gota de sangre (a partir de un pequeño pinchazo en el dedo) en una tarjeta de papel de filtro denominada FTA™ (suministrada por la Universidad San Jorge) que permite el mantenimiento de su muestra a temperatura ambiente de forma indefinida.
2. Extracción de DNA.
3. Análisis genético. Se trata del análisis de 5 genes (denominados *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *POR* y *PXR*) ya que la presencia de mutaciones en estos genes supone la alteración del metabolismo a determinados fármacos habituales en pacientes trasplantados.
4. Finalmente se relacionarán los resultados genéticos con los efectos de los fármacos en cada paciente.
5. En cumplimiento de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica los datos genéticos se conservarán durante 5 años, siendo posteriormente destruidos.

La participación en este proyecto es totalmente **VOLUNTARIA** y puede dejar de asistir en cuanto lo desee.

**Beneficios:** La realización de estos estudios podría contribuir a explicar la presencia de efectos adversos relacionados con el medicamento así como una falta de efectividad del mismo. Los resultados se podrán trasladar al médico para que realice una valoración del tratamiento farmacológico.

**Riesgos:** El riesgo derivado de la participación en el proyecto consistirá en la molestia ocasionada por la obtención de la gota de sangre como muestra biológica.

**Confidencialidad:** La información que dé sobre usted será protegida para mantener su confidencialidad de acuerdo a la ley vigente, sin que se facilite o publique ningún dato que le identifique o pueda llegar a identificarle. Tras la cesión de su muestra biológica se le asignará un código numérico a la muestra y a partir de entonces se trabajará con dicho código. Su identidad sólo la conocerá el investigador responsable del proyecto. Todo el personal relacionado con el Proyecto está obligado a proteger la confidencialidad de los datos de los participantes según la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (15/1999 de 13 de diciembre).

Le informamos de que los datos de carácter personal recabados, serán incorporados a un fichero titularidad de FUNDACION UNIVERSIDAD SAN JORGE, necesario para la correcta gestión del Proyecto *“ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS”*. Asimismo, le informamos de que solo se recogerán los datos estrictamente necesarios para la investigación y que éstos no se comunicarán a terceros ajenos al servicio, salvo en los supuestos legalmente previstos.

Las muestras biológicas sólo se emplearán para la realización de este proyecto.

De acuerdo con lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos de Carácter Personal, en cualquier momento usted puede ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, enviando una solicitud por escrito acompañada de una fotocopia de documento oficial que lo identifique a la Universidad San Jorge, Autovía A-23 Zaragoza- Huesca, km. 299, 50830- Villanueva de Gállego (Zaragoza)

M<sup>a</sup> PILAR RIBATE MOLINA está a su disposición para contestar a cualquier duda que tenga, siendo su teléfono: 976 060 100.

En consecuencia,

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad y con DNI nº \_\_\_\_\_, manifiesto que he leído la información anteriormente descrita sobre el proyecto "ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS". He hablado con \_\_\_\_\_ y he sido informado/a sobre las implicaciones que supone la participación en este proyecto.

Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del Proyecto:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones

Tomando ello en consideración, OTORGO libremente mi CONSENTIMIENTO:

A participar en proyecto "ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS" de la Universidad de San Jorge:

Sí  No

También he sido informado de forma clara, precisa y suficiente de los siguientes extremos que afectan a los datos personales que se contienen en este consentimiento y en la ficha o expediente que se abra para la investigación.

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante:

He explicado la naturaleza y el propósito del proyecto al participante mencionado

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador:

APARTADO PARA LA REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad y con DNI nº \_\_\_\_\_, revoco el consentimiento para la participación en el Proyecto de Seguimiento Farmacoterapéutico de la Universidad San Jorge, arriba firmado, con fecha \_\_\_\_\_.

Fecha de la revocación:

Firmado:

**PROYECTO “ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS” DE LA UNIVERSIDAD SAN JORGE**

A continuación se detallan los supuestos en los que usted puede manifestar su negativa al tratamiento, uso y publicación de sus datos personales recabados para la gestión del Proyecto “ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS” según ha sido debidamente informado, los cuales están incorporados a un fichero titularidad de la FUNDACION UNIVERSIDAD SAN JORGE con la única finalidad de la correcta gestión del proyecto:

Si lleva a cabo la marcación de ésta casilla, usted presta consentimiento al tratamiento de sus datos de salud que nos ha proporcionado, con la única finalidad de la prestación adecuada del Servicio.

Si lleva a cabo la marcación de ésta casilla, usted presta consentimiento a la publicación de los resultados de investigación, resultados estadísticos o científicos, publicación que únicamente reflejará datos disociados que no permitan su identificación

Con la firma del presente documento, y si realiza la marcación de las casillas correspondientes, usted otorga consentimiento al tratamiento de los datos de salud que nos ha proporcionado como **VOLUNTARIO** del Proyecto “ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS” de la Universidad San Jorge, consentimiento que **podrá ser revocado en cualquier momento** sin que de ello se deriva consecuencia alguna para usted.

**Anexo III. Cuestionario realizado a los pacientes del estudio de tacrolimus.**

***“ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON TACROLIMUS”***

**Nombre:**

**Apellidos:**

Edad:

Sexo: M  F

Altura:

Peso:

Alergias:

PREGUNTAS RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD:

- ¿Para qué tipo de patología le ha sido recetado Tacrolimus (trasplante renal, hepático, cardiaco...)?
- 

- ¿Cuándo recibió el trasplante aproximadamente?
- 

- Tras su trasplante y durante su ingreso hospitalario, ¿Qué medicación recibió en el hospital?, ¿Tubo algún problema relacionado con ella?
- 

- ¿Ha sufrido algún rechazo/problema con el órgano recibido? **En caso afirmativo,** ¿Tomaba en aquel momento algún tipo de inmunosupresor/otra medicación destinado a evitar el rechazo?, ¿Cuál y en qué dosis?
- 

- ¿Posee algún antecedente familiar o alguno de sus familiares ha recibido algún tipo de trasplante y de qué tipo?, En caso afirmativo ¿Qué parentesco guarda con esta persona?, ¿Sabe si toma Tacrolimus al igual que usted?
- 

- ¿Sufre alguna otra patología? Indique así mismo si sufre de alguna enfermedad/afección diagnosticada para la que no reciba tratamiento.

- 
- En cuanto a sus análisis médicos, ¿Suele hacérselos de forma rutinaria/periódica?, ¿Cuándo fue la última vez?
- 

- ¿Recuerda si obtuvo algún resultado alterado/fuera de los valores normales en alguno de los parámetros de sus análisis (glucosa, colesterol, función renal, función hepática...)?
- 

- Otros datos que considere relevantes en relación con sus patologías:
- 
- 
- 

#### PREGUNTAS RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO CON TACROLIMUS:

- ¿Desde hace cuánto toma Tacrolimus?
- 

- ¿Cuál es la posología de su toma de Tacrolimus (dosis, nº tomas diarias)?
- 

- ¿Ha tenido cambios en la dosis o número de tomas de Tacrolimus desde que comenzó a tomarlo? **En caso afirmativo**, ¿Qué cambios y por qué?
- 

- ¿Ha sufrido algún rechazo/problema con el órgano trasplantado desde que comenzó a tomar Tacrolimus?
- 

- ¿Alguna vez olvida tomar el medicamento?
- 

- **En caso afirmativo a la pregunta anterior**, ¿Qué hace al respecto, tomar la dosis olvidada cuanto antes u obviar esa toma?
-

- ¿Ha tomado otro tipo de medicación **para la misma patología** antes de comenzar con el tratamiento con Tacrolimus?
- 

- **Solo en caso afirmativo de la pregunta anterior**, ¿Qué medicación es la que tomaba y en que dosis y número de tomas diarias?, ¿Sufrió algún tipo de reacción adversa/molestia ante esta medicación y de qué tipo?, ¿Sabe la causa de la finalización de su tratamiento con este fármaco?
- 

- ¿Ha notado mejoría desde el inicio del tratamiento con Tacrolimus con respecto al anterior tratamiento (si lo hubiera)?
- 

- ¿Le han detectado algún tipo de neoplasia tanto benigna como maligna desde el inicio del tratamiento con Tacrolimus?
- 

- ¿Ha sufrido infecciones, anemia, hiperglucemia, hipercolesterolemia, cefaleas, dolores de estómago, diarreas/nauseas, erupciones cutáneas, remarcada fátiga y/o pérdida de peso u otros desde que toma tacrolimus?
- 

- En cuanto a su función renal, ¿Ha sufrido nefrotoxicidad, proteinuria y/o aumento de la creatinina sérica desde que toma Tacrolimus? Esto se refiere a si ha sufrido algún tipo de **problema renal** debido a la toma del medicamento.
- 

- ¿Realiza algún tipo de control rutinario (analíticas, consulta médica...) de su medicación con Tacrolimus?
- 

- Otros datos que considere relevantes en relación con su tratamiento con Tacrolimus:
- 
- 
- 

PREGUNTAS RELACIONADAS CON OTROS MEDICAMENTOS QUE TOMA:

- ¿Qué otros medicamentos toma (ej: omeprazol)? **Es importante que conteste a esta pregunta correctamente**, detallando cada medicamento y a ser posible en qué dosis, número de tomas diarias y desde hace cuánto (aproximadamente) lo toma.

---

---

---

---

---

---

---

---

- ¿Olvida alguna vez tomar alguno de ellos? En caso afirmativo, ¿Cuál y qué hace al respecto (tomarlo cuanto antes u obviar esa toma)?

---

- ¿Ha tenido alguna reacción adversa/molestia/problema con alguno de los fármacos que toma (aunque no lo relacione con ninguno en concreto)? ¿Cuál y qué tipo de problema?

---

- ¿Toma algún tipo de complemento/suplemento, vitaminas, fitoterapia, infusiones...? ¿Cuáles y con qué frecuencia?

---

- Otros datos que considere relevantes en relación con su medicación:

---

---

---

Muchas gracias por su participación. Ante cualquier duda o consulta M<sup>a</sup> PILAR RIBATE MOLINA está a su disposición para contestar, siendo su teléfono: 976 060 100.



Paciente	Sexo	Edad	Peso (kg)	Altura (m)	Dosis TAC (mg)	Co TAC (ng·ml <sup>-1</sup> )	Forma TAC	Tipo transpl.	Anteced. famil.	GC	Dosis GC (mg)	AMF	IBP	ESTATINAS	>12 mes transplante	Signos rechazo agudo	Signos rechazo crónico	Retrasplante
1	♂	20	62	N/A	1,5	3,20	Prograf	Renal	No	Si	5	Si	Si	No	Si	No	No	No
2	♂	N/A	N/A	N/A	3,5	7,35	Advagraf	Renal	N/A	N/A	N/A	N/A	No	N/A	Si	N/A	N/A	N/A
3	♀	54	45	1,55	2	N/A	Prograf	Renal	No	No	0	Si	Si	No	Si	No	No	No
4	♀	71	68	1,68	3	N/A	Advagraf	Hepático	No	No	0	No	No	No	Si	Si	No	No
5	♀	66	63	1,5	2	N/A	Advagraf	Hepático	No	No	0	No	Si	No	Si	No	Si	Si
6	♂	44	75	1,81	4,5	N/A	Advagraf	Renal	Si	Si	5	No	No	No	Si	No	No	No
7	♂	66	89	1,67	1,2	N/A	Advagraf	Hepático	No	Si	5	Si	Si	No	Si	No	Si	No
8	♀	27	60	1,58	3,5	N/A	Advagraf	Renal	No	No	0	No	No	No	Si	No	No	No
9	♂	52	80	1,8	4	N/A	Advagraf	Renal	No	Si	5	Si	Si	No	Si	No	No	No
10	♂	75	83	1,71	5,6	5,60	Prograf	Cardíaco	No	Si	5	Si	Si	Si	Si	No	No	No
11	♀	49	77	1,68	4	N/A	Advagraf	Renal	No	Si	2,5	Si	Si	Si	Si	No	No	No
12	♀	87	50	1,6	2	N/A	Advagraf	Renal	No	No	0	Si	Si	No	Si	No	No	No
13	♀	48	63	1,58	2	N/A	Advagraf	Renal	No	Si	5	Si	Si	Si	Si	No	No	No
14	♂	60	75	1,85	4	N/A	Advagraf	Pulmón	No	Si	5	Si	Si	No	Si	No	No	No
15	♀	67	60	1,5	6,5	N/A	Advagraf	Hepático	Si	Si	20	Si	No	No	No	No	No	No
16	♂	70	82,5	1,82	0,2	1,93	Modigraf	Hepático	No	No	0	Si	No	No	Si	No	No	No
17	♀	64	45	1,46	2	N/A	Prograf	Hepático	No	No	0	No	No	No	Si	No	No	No
18	♀	72	64	1,63	1	N/A	Advagraf	Hepático	No	Si	5	No	Si	No	Si	No	No	No
19	♀	39	72	1,6	1	N/A	Advagraf	Hepático	No	No	0	No	No	No	Si	Si	Si	No
20	♀	58	70	1,61	7	3,70	Advagraf	Hepático	No	No	0	No	No	No	Si	Si	No	No
21	♀	59	51	1,6	3,5	N/A	Advagraf	Hepático	No	Si	5	No	No	No	Si	Si	No	No
22	♀	40	71	1,57	3	N/A	Advagraf	Hepático	No	No	0	No	No	No	Si	Si	Si	No
23	♀	15	52	1,57	3	4,20	Advagraf	Hepático	No	Si	2,5	No	No	No	Si	No	No	No
24	♂	52	79	1,76	3	N/A	Advagraf	Cardíaco	No	Si	5	Si	Si	Si	Si	No	No	No
25	♂	13	39	1,52	4	3,70	Advagraf	Hepático	No	No	0	No	No	No	Si	No	No	No
26	♀	33	50	1,6	4,5	7,87	Envarsus	Hepático	No	Si	2,5	Si	No	No	Si	No	Si	Si
27	♀	42	55	1,67	3	6,40	Advagraf	Hepático	No	No	0	Si	No	No	Si	No	No	No

Paciente	Olvido	Cáncer	Nefrotox.	Niveles creatinina (mg·dl <sup>-1</sup> )	TFG (ml·min <sup>-1</sup> )	Daño Hepático	DM	Hipo magnesemia	Hipo calcemia	Anemia	Efectos GI	Trast. Osteomusc.	Dolor	Hipersensib. cutánea	HTA	Dislipidemia	Neurotox.	Infecciones recurrentes	Astenia	nº EEAA	
1	No	No	Si	1,90	39,26	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No	No	Si	No	6	
2	No	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	Si	No	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	1
4	No	No	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	2
5	No	No	No	N/A	N/A	No	Si	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	2
6	No	Si	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	Si	No	4	
7	No	No	Si	N/A	N/A	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	Si	No	No	Si	No	4	
8	No	No	No	N/A	N/A	No	No	No	Si	Si	Si	No	Si	No	No	Si	Si	Si	No	7	
9	Si	No	Si	2,00	N/A	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	4	
10	No	Si	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Si	Si	No	No	No	5	
11	No	No	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	3	
12	No	No	No	N/A	N/A	No	Si	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No	3	
13	No	No	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	7	
14	No	No	No	N/A	N/A	No	No	No	Si	No	No	Si	No	No	No	No	No	Si	No	3	
15	No	No	No	N/A	N/A	Si	Si	No	Si	Si	No	No	Si	No	Si	No	No	Si	No	8	
16	No	Si	Si	1,42	50,71	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	4	
17	Si	Si	No	N/A	N/A	Si	No	No	No	Si	Si	No	Si	No	No	Si	No	No	No	7	
18	No	No	No	N/A	N/A	No	Si	No	No	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	3	
19	Si	No	Si	N/A	N/A	No	Si	No	No	Si	Si	No	Si	No	No	No	No	Si	Si	8	
20	No	No	No	0,71	N/A	Si	No	No	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	10	
21	No	No	Si	N/A	N/A	No	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	No	Si	Si	No	No	6	
22	No	No	Si	N/A	N/A	No	No	No	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	No	No	No	5	
23	No	No	No	N/A	N/A	No	No	No	No	No	Si	No	No	Si	No	No	No	Si	No	3	
24	No	No	Si	alta	N/A	No	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	Si	Si	No	No	7	
25	No	No	Si	0,62	N/A	Si	No	No	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No	7	
26	Si	No	Si	1,81	38,49	Si	No	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	Si	No	No	Si	Si	11	
27	No	Si	No	0,86	84,18	No	Si	Si	No	Si	No	No	No	Si	No	Si	No	No	No	8	

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

**1º.** Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 15/02/2017, Acta Nº 03/2017 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

**Título: Análisis genético de las variantes alélicas influyentes en la farmacocinética y farmacodinamia del everolimus en pacientes con esclerosis tuberosa**

**Investigadores Principales:**

**Mª Pilar Ribate Molina, Universidad de San Jorge**

**José Luis Peña Segura, HOSPITAL UNIVERSITARIO MIGUEL SERVET**

**Versión protocolo: v 2, 07/02/2017**

**Versión documento de Información a los participantes: v 2, 07/02/2017**

**2º.** Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuada la utilización de los datos y los documentos para la obtención del consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

**3º.** Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 15 de febrero de 2017



María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)



## **Anexo VI. Consentimiento informado de los pacientes del estudio de everolimus.**

### **Título de la investigación:**

**ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES ALELICAS INFLUYENTES EN LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL EVEROLIMUS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS TUBEROSA**

### **1. Introducción:**

Nos dirigimos a usted para invitarle a participar en un proyecto de investigación que estamos realizando en la Universidad San Jorge. Su participación es importante para obtener el conocimiento que necesitamos, pero antes de tomar una decisión debe:

- Leer este documento entero
- Entender la información que contiene el documento
- Hacer todas las preguntas que considere necesarias
- Consultar con su médico-persona de confianza
- Tomar una decisión meditada
- Firmar el consentimiento informado, si finalmente desea participar.

Si decide participar se le entregará una copia de este documento y del consentimiento firmado. Por favor, consérvelos por si lo necesitara en un futuro.

### **2. ¿Por qué se le pide participar?**

Se le solicita su colaboración porque padece usted Esclerosis Tuberosa en tratamiento con everolimus. El conocimiento de sus variables genéticas en relación con la eficacia del tratamiento (everolimus) servirá de apoyo al desarrollo del conocimiento científico, permitiendo establecer una mayor evidencia en la relación entre ambas variables.

En España hay actualmente 180 personas con Esclerosis Tuberosa en tratamiento con everolimus. Se entrará en contacto con todos ellos ofreciéndoles la posibilidad de participar en el estudio genético. En el estudio participarán finalmente aquellos pacientes del total de 180 que deseen participar voluntariamente.

### **3. ¿Cuál es el objeto de este estudio?**

Este estudio pretende describir el genotipo de pacientes con Esclerosis Tuberosa en tratamiento con everolimus mediante el análisis de las variables genéticas influyentes en la farmacoterapia.

#### **4. ¿Qué tengo que hacer si decido participar?**

Recuerde que su participación es voluntaria y si decide no participar esto no afectará a su asistencia o a su relación con el investigador y su equipo.

El voluntario procederá a donar una muestra sanguínea mediante punción capilar (pinchazo leve en la yema del dedo) que será almacenada para su análisis en el laboratorio de Biología de la Universidad San Jorge. Así mismo deberá rellenar una breve encuesta con datos clínicos personales relacionados con el estudio (aproximadamente 15 minutos). Todos los datos como las muestras biológicas serán almacenados de forma **codificada** y segura para su uso exclusivo por el personal investigador.

#### **5. ¿Qué riesgos o molestias supone?**

La extracción de la muestra sanguínea no supone ningún riesgo ni molestia salvo un leve pinchazo en la yema del dedo.

#### **6. ¿Obtendré algún beneficio por mi participación?**

Al tratarse de un estudio de investigación orientado a generar conocimiento es probable que no obtenga ningún beneficio por su participación si bien usted contribuirá al avance del conocimiento y al beneficio social. A nivel individual, supone información adicional que puede servir como herramienta para la buena adecuación de la terapia a cada paciente. Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación.

#### **7. ¿Cómo se van a gestionar mis datos personales?**

Toda la información recogida se tratará conforme a lo establecido en la Ley Orgánica 15/99, de protección de datos de carácter personal. En la base de datos del estudio no se incluirán datos personales: ni su nombre, ni su nº de historia clínica ni ningún dato que le pueda identificar. Se le identificará por un código que sólo el equipo investigador podrá relacionar con su nombre.

Sólo el equipo investigador tendrá acceso a los datos de su historia clínica y nadie ajeno al centro podrá consultar su historial.

Para ejercer su derecho de acceso, rectificación, cancelación y oposición respecto a sus datos obtenidos durante el estudio debe ponerse en contacto con el investigador principal.

Las conclusiones del estudio se presentarán en congresos y publicaciones científicas pero se harán siempre con datos agrupados y nunca se divulgará nada que le pueda identificar.

#### **8. ¿Cómo se van a tratar mis muestras biológicas?**

Como ya le hemos explicado en el apartado 4, dentro de este estudio vamos a recoger las siguientes muestras biológicas: muestra sanguínea (una gota de sangre).

Dichas muestras serán analizadas en el laboratorio de biología de la Universidad San Jorge y se analizarán las variantes de varios genes: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C8*, *ABCB1*, *POR* y *PXR*. La mayor parte de las repercusiones que supone la presencia de alteraciones en estos genes se relacionan de manera directa o indirecta con la concentración de fármaco en sangre, y por tanto una mayor o menor necesidad de dosis.

Una vez terminado el proyecto sus muestras se destruirán.

En caso de que se realicen análisis genéticos, los datos serán conservados durante 5 años y el personal que tendrá acceso a dichos datos será el investigador principal (M<sup>a</sup> Pilar Ribate Molina).

#### **9. ¿Quién financia el estudio?**

Este proyecto se financia con fondos procedentes de la Universidad San Jorge con el apoyo de la Fundación Banco Sabadell.

El conocimiento derivado de este estudio puede generar en un futuro beneficios comerciales que pertenecerán al equipo investigador. Los participantes no tendrán derecho a reclamar parte de ese beneficio.

#### **10. ¿Se me informará de los resultados del estudio?**

Usted tiene derecho a conocer los resultados del presente estudio, tanto los resultados generales como los derivados de sus datos específicos. También tiene derecho a no conocer dichos resultados si así lo desea. Por este motivo en el documento de consentimiento informado le preguntaremos qué opción prefiere. En caso de que desee conocer los resultados, el investigador le hará llegar los resultados a través de un informe que usted podrá trasladar a su médico para una valoración global.

En ocasiones al realizar un proyecto de investigación se encuentran hallazgos inesperados que pueden ser relevantes para la salud del participante. En el caso de que esto ocurra nos pondremos en contacto con usted para que pueda acudir a su médico habitual.

Si ud. decide conocer los resultados del estudio genético, estos irán acompañados de una explicación para su fácil comprensión, así como la influencia y consecuencias que estos puedan conllevar en su farmacoterapia.

#### **¿Puedo cambiar de opinión?**

Tal como se ha señalado, su participación es totalmente voluntaria, puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en su atención sanitaria. Basta con que le manifieste su intención al investigador principal del estudio.

Si usted desea retirarse del estudio se eliminarán los datos recogidos y las muestras biológicas no utilizadas en ese momento.

**¿Qué pasa si me surge alguna duda durante mi participación?**

En caso de duda o para cualquier consulta relacionada con su participación puede ponerse en contacto con el investigador responsable, Dra. M<sup>a</sup> Pilar Ribate Molina, en el teléfono 976 060 100 de 9:00 a 17:30h o por correo electrónico en la dirección [mpribate@usj.es](mailto:mpribate@usj.es).

Muchas gracias por su atención, si finalmente desea participar le rogamos que firme el documento de consentimiento que se adjunta.



## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del PROYECTO: ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES ALELICAS INFLUYENTES EN LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL EVEROLIMUS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS TUBEROSA.**

Yo, ..... (nombre y apellidos del participante)

He leído el documento de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con: .....(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y para que se realice el análisis genético.

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no (marque lo que proceda)

Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

.....  
.....

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

.....

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO TUTORES**

**Título del PROYECTO: ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES ALELICAS INFLUYENTES EN LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL EVEROLIMUS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS TUBEROSA.**

Yo, ..... tutor de ..... (nombre y apellidos del participante)

He leído el documento de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con: .....(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y para que se realice el análisis genético.

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no (marque lo que proceda)

Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del tutor:

Fecha:

.....  
.....

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

.....

**Anexo VII. Cuestionario realizado a los pacientes del estudio de everolimus.**

**“ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES ALELICAS INFLUYENTES EN LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL EVEROLIMUS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS TUBEROSA”**

Nombre:

Apellidos:

Edad:

Sexo: M  F

Altura:

Peso:

Alergias:

- ¿Qué manifestaciones/lesiones relacionadas con la esclerosis tuberosa sufre ud.?

---

- ¿Para qué tipo de afección relacionada con la esclerosis tuberosa le ha sido recetado everolimus (angiomiolipoma renal, astrocitoma subependimario de células gigantes...)?

---

- ¿Cuál es su pauta en la toma de everolimus (dosis, tomas)?

---

- ¿Desde hace cuánto toma everolimus?

---

- ¿Alguna vez olvida tomar everolimus? En caso afirmativo, ¿Qué hace al respecto, tomar la dosis olvidada cuanto antes u obviar esa toma?

---

- ¿Qué medicación tomaba (si la tomaba) antes de comenzar el tratamiento con everolimus?

---

- ¿Toma algún otro tipo de medicación?, ¿Cuál?

---

- ¿Ha notado mejoría desde el inicio del tratamiento con everolimus?

---

- ¿Ha sufrido infecciones, anemia, hiperglucemia, hipercolesterolemia, cefaleas, dolores de estómago, diarreas/nauseas, erupciones cutáneas, remarcada fatiga, pérdida de peso y/u otro tipo de efecto adverso/molestia desde que toma everolimus?

---

- ¿Realiza controles rutinarios de la medicación/consultas médicas?

---

- Otros datos que considere relevantes:

---



Paciente	Edad (años)	Altura (cm)	Dosis EVE (mg)	Interrupciones tratamiento EVE	SEGA	RAML	Epilepsia	Déficit cognitivo	Trastornos conducta /agresividad	Nódulo hipocrómicos	Afectación retina	Afectación hígado
1	12	161,8	4	No	Si	No	Si	No	No	Si	No	No
2	3	102	12	No	Si	No	Si	No	No	Si	No	No
3	3	94,1	3	No	Si	No	No	No	No	Si	No	No
4	10	160	5	No	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si
5	14	168	7,5	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No
6	15	150	7,5	No	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Si
7	9	125,5	2,5	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No
8	8	134	5	No	Si	No	No	No	Si	No	No	No
9	3	103	6	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
10	12	150	2,5	No	Si	No	No	No	Si	Si	No	No

Paciente	Antiepilépticos	Antipsicóticos /tranquilizantes	Inhibidor leve CYP3a4	Inductor leves CYP3A4	Sustratos CYP3A4	Mejoría con EVE	Infecciones (no neumonía)	Neumonía	Hiper colesterolemia	linfedema	Cefaleas	Desarreglo menstrual	Nº EEAA
1	Levetiracetam, vigabatrina	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	Si	No	3
2	Levetiracetam, OXCB	No	No	OXCB	OXCB	No	No	No	No	No	No	No	1
3	Nada	No	No	No	No	No	Si	No	Si	No	No	No	2
4	Levetiracetam, OXCB	No	No	OXCB	OXCB	No	No	No	No	Si	No	Si	2
5	Brivacetam, OXCB, clonazepam, perampanel	Risperidona, clonazepam	No	OXCB	OXCB, clonazepam, perampanel	No	No	Si	No	No	No	No	1
6	Levetiracetam, topiramato	No	No	Topiramato	Topiramato	No	No	No	No	No	No	Si	1
7	Rufinamida, clobazam	Risperidona, clobazam, ac. valproico	Ác. valproico	Rufinamid, clobazam	Clobazam	Si	No	Si	No	No	No	No	1
8	Levetiracetam	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	0
9	Vigabatrina, clobazam	Clobazam	No	Clobazam	Clobazam	Si	No	No	No	No	No	No	0
10	Clobazam	Clobazam, levomepromazina, aripripazol	No	Clobazam	Clobazam, aripripazol	Si	No	No	No	No	No	No	0

\* OXCB= oxcarbamecequina

**Anexo IX. Genotipos obtenidos de las variantes analizadas para cada uno de los pacientes del estudio de tacrolimus.**

Paciente	Gen												
	<i>CYP3A5</i>	<i>CYP3A4</i>			<i>ABCB1</i>			<i>POR</i>	<i>PXR</i>		<i>CYP2C19</i>		
	<i>*3</i>	<i>*1B</i>	<i>*22</i>	<i>*20</i>	<i>C3435T</i>	<i>G2677T</i>	<i>C1236T</i>	<i>*28</i>	<i>C63396T</i>	<i>A69789G</i>	<i>*17</i>	<i>*2</i>	<i>*3</i>
<b>1</b>	GG	AA	CC	NO	TT	TT	TT	CC	CC	AG	CT	GG	GG
<b>2</b>	GG	AA	CC	NO	CC	GG	CC	CC	TT	AA	CC	GA	GG
<b>3</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CT	CT	TT	AA	CC	GA	GG
<b>4</b>	GA	AA	CC	NO	CC	GG	CT	CC	CT	AA	CC	GG	GG
<b>5</b>	GG	AA	CC	NO	CC	GG	CT	CT	CT	AG	CC	GG	GG
<b>6</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CT	CT	CT	AG	TT	GG	GG
<b>7</b>	GG	AA	CC	NO	CC	GG	CC	CT	TT	AA	CC	GG	GG
<b>8</b>	GG	AA	CT	NO	CT	GT	CT	CT	CT	AA	CT	GG	GG
<b>9</b>	GA	AA	CC	NO	TT	GT	CT	CC	TT	AA	CC	GG	GG
<b>10</b>	GG	AA	CC	NO	TT	GT	CT	TT	CC	AG	CC	GA	GG
<b>11</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CT	CC	TT	AG	CC	GG	GG
<b>12</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CT	CT	CC	GG	CT	GA	GG
<b>13</b>	GG	AA	CT	NO	CC	GG	CC	CC	TT	AG	CC	GG	GG
<b>14</b>	GG	AA	CC	NO	CC	GG	CC	CC	CT	GG	CC	GA	GG
<b>15</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GG	CC	CC	CC	GG	CC	GG	GG
<b>16</b>	GG	AA	CC	NO	CC	GG	CT	TT	CT	AG	CT	GG	GG
<b>17</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	TT	CC	CC	AA	CC	GG	GG
<b>18</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CT	CC	CC	AG	CC	GG	GG
<b>19</b>	GG	AA	CC	NO	TT	TT	TT	CT	TT	AA	CC	GA	GG
<b>20</b>	GA	AG	CC	NO	CT	GT	CT	CT	TT	GG	CC	GG	GG
<b>21</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	TT	CT	TT	AA	CC	GA	GG
<b>22</b>	GG	AA	CC	NO	CC	GG	CC	CT	TT	AG	CT	GG	GG
<b>23</b>	GG	AA	CC	NO	TT	GT	CT	CT	TT	AG	CT	GG	GG
<b>24</b>	GG	AA	CC	NO	CT	TT	CT	CT	CT	AG	CC	GG	GG
<b>25</b>	GA	AG	CC	NO	CT	GT	CT	CC	CT	GG	CC	GG	GG
<b>26</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CT	CC	CC	GG	CC	GG	GG
<b>27</b>	GG	AA	CC	NO	CT	GT	CC	CC	TT	AG	CC	AA	GG





**Anexo X. Genotipos obtenidos de las variantes analizadas para cada uno de los pacientes del estudio de everolimus.**

Paciente	Gen										
	CYP3A5		CYP3A4		CYP2C8	ABCB1			POR	PXR	
	*3	*1B	*22	*20	G416A + A1196G	C3435T	G2677T	C1236T	*28	C63396T	A69789G
<b>1</b>	GA	AG	CC	NO	GA	CC	GG	CC	CC	CT	AG
<b>2</b>	GG	AA	CC	NO	GG	CT	GT	CT	TT	TT	AA
<b>3</b>	GG	AA	CC	NO	GA	TT	TT	TT	TT	CT	AG
<b>4</b>	GG	AA	CC	NO	GG	CT	GT	CT	CC	CT	AG
<b>5</b>	GG	AA	CC	NO	GA	CT	GT	CT	CC	CT	GG
<b>6</b>	GG	AA	CC	NO	GG	TT	TT	TT	CT	CT	GG
<b>7</b>	GG	AA	CT	NO	GG	CT	GG	CC	CT	CT	AG
<b>8</b>	GG	AA	CC	NO	GG	CT	GT	CT	TT	CT	AG
<b>9</b>	GG	AA	CC	NO	GG	CT	GT	CT	CC	TT	AG
<b>10</b>	GG	AA	CC	NO	GG	TT	GT	CT	CC	TT	AA



Anexo XI. Certificación de la estancia de investigación para la Mención Internacional en la *Fondazione Callerio Onlus* de la Universidad de Trieste, Italia,



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DI TRIESTE

Area dei servizi istituzionali  
Settore servizi agli studenti e alla didattica  
Ufficio per la mobilità internazionale

**DEPARTURE**

To the University San Jorge  
Campus Universitario de Villanueva de Gállego  
50830 Zaragoza  
ESPAÑA  
Attn. Cristina Carnicero

I, undersigned GABRIELE STOCCO, declare that the student Julia Concha Mayayo has regularly attended the University of Trieste internship, according to the approved Learning Agreement, within the ERASMUS+ Internship Programme in the academic year 2018/2019.

Trieste, 31/12/19

Italian coordinator's signature  
and department seal

---

We confirm that the student Julia Concha Mayayo from the University San Jorge (E ZARAGOZ07) has finished his/her ERASMUS+ mobility at the University of Trieste - I TRIESTE01, Dipartimento di Scienze della Vita, on FONDAZIONE CALLERIO ONLUS for a period of 3 months, 6 days in the academic year 2018/2019.

Signature and office seal