



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

---

FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE LA GLICOPROTEÍNA  
P EN EXONES 12 Y 21 (GEN ABCB1) Y CITOCROMO P  
(ISOFORMAS CYP3A5) EN DONADORES RENALES Y SU  
RELACIÓN CON TOXICIDAD POR TACROLIMUS  
EN EL RECEPTOR

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
SUBESPECIALIDAD EN:

**NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

**DR. HERNANDO LONDOÑO CORREA**

TUTOR:

**DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO**



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ  
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE LA GLICOPROTEÍNA  
P EN EXONES 12 Y 21 (GEN ABCB1) Y CITOCROMO P  
(ISOFORMAS CYP3A5) EN DONADORES RENALES Y SU  
RELACIÓN CON TOXICIDAD POR TACROLIMUS  
EN EL RECEPTOR**

**TUTOR:**

---

**DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO**

**CO-ASESOR:**

---

**M. en C. MARÍA INÉS DEL PILAR GARCÍA ROCA**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres, que han soportado la soledad y ausencia de sus hijos con resignación y amoroso desprendimiento.*

*A Diana, por transmitirme su energía positiva además de su paciente espera.*

*A la Doctora Mara, quien a pesar de mi ignorancia y desconocimiento ha apoyado la elaboración de este trabajo.*

*Al grupo del Servicio de Nefrología, por su apoyo y comprensión, haciéndome sentir uno más de la familia.*

*Al personal del laboratorio de nefrología por brindar su cálida amistad haciendo menos difícil soportar la nostalgia y la lejanía.*

*A los amigos que quedan, Jacki, Lupita, Jocabeth, Gaby, Sonia, Rubén, Javier y Edgar, tendrán un lugar por siempre en el corazón.*

*Y especial saludo de agradecimiento a Pili, quien a pesar de las angustias y el exceso de trabajo, estuvo allí, sin queja alguna. Eterno agradecimiento.*

## INDICE

<b>CONTENIDOS</b>	<b><i>Página</i></b>
I. ANTECEDENTES	1
II. MARCO TEÓRICO	5
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
V. JUSTIFICACIÓN	14
VI. OBJETIVOS	16
VII. MATERIAL Y METODO	17
VIII. RESULTADOS	25
IX. DISCUSIÓN	29
X. CONCLUSIONES	31
XI. REFERENCIAS	32

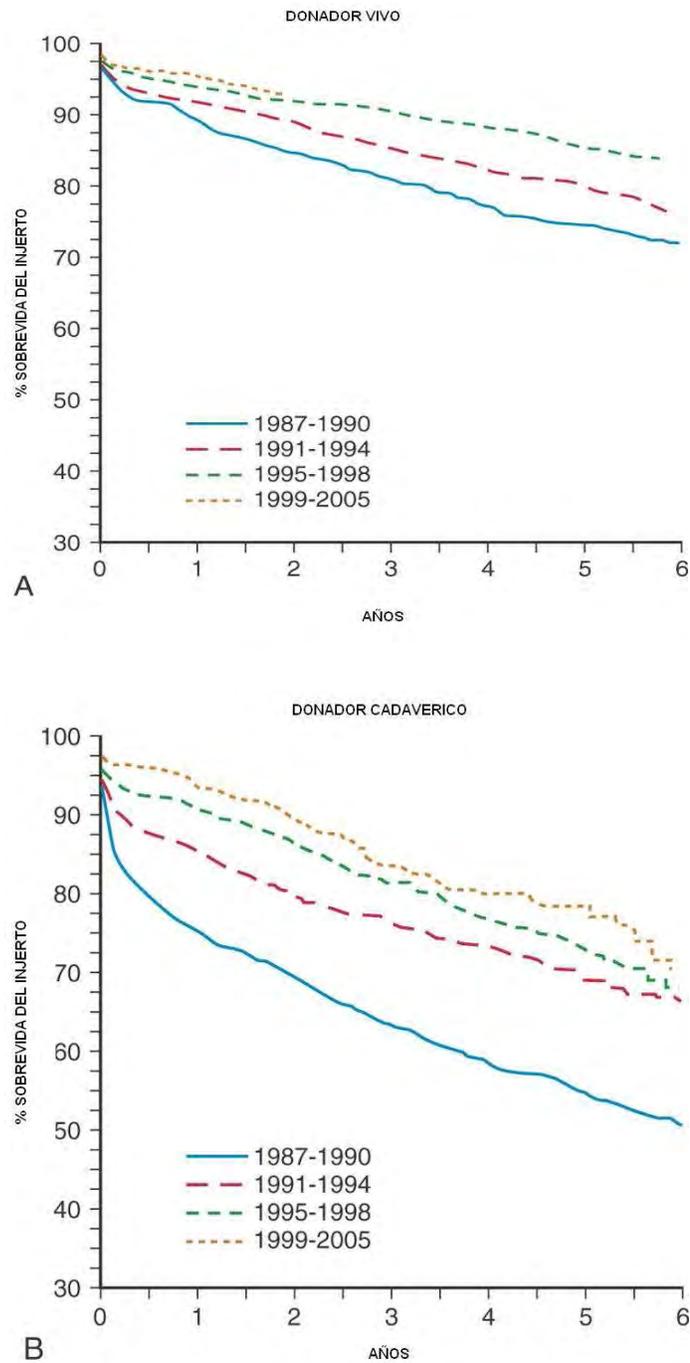
# **FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE LA GLICOPROTEÍNA P EN EXONES 12 Y 21 (GEN ABCB1) Y CITOCROMO P (ISOFORMAS CYP3A5) EN DONADORES RENALES Y SU RELACIÓN CON TOXICIDAD POR TACROLIMUS EN EL RECEPTOR**

## **I. ANTECEDENTES**

La inmunosupresión es la base de la medicina de trasplante de órganos hoy día, y dentro de este contexto, los inhibidores de la calcineurina son medicamentos angulares. El tacrolimus dado su mejor perfil farmacológico, se ha tornado en años recientes como el medicamento de elección en el mantenimiento de dicha inmunosupresión en el trasplante renal,<sup>1</sup> superando su frecuencia de uso a la ciclosporina, medicamento inicialmente descrito en esta categoría.<sup>1-2</sup> El uso de estos medicamentos sumado al desarrollo de terapias de inducción eficaces y mejores técnicas quirúrgicas ha contribuido en la notoria disminución de episodios de rechazo agudo<sup>3</sup>, tanto en el paciente adulto como pediátrico.<sup>1</sup> No obstante este progreso no ha sido reflejado en la sobrevida del injerto renal a largo plazo, como puede apreciarse en la figura 1 (A y B).

De manera general, la disfunción del injerto renal ha dado por llamarse de forma vaga e imprecisa como un rechazo crónico del injerto (o simplemente una nefropatía crónica),<sup>1</sup> pero sus verdaderas causas y razones están aun lejos de entenderse y conocerse<sup>4</sup> y su prevalencia e inexorable progresión hacia la disfunción crónica y finalmente pérdida del riñón trasplantado no parecen ceder a pesar de la significativa disminución de la frecuencia y morbilidad de los episodios de rechazo agudo otrora considerado como el factor preponderante en el deterioro crónico del tejido

renal injertado,<sup>3</sup> sin embargo en reportes de seguimiento de grandes series la atribución de causas es amplia.<sup>5</sup>



**Fig. 1 A y B.** Porcentaje de sobrevida del aloinjerto renal en pacientes trasplantados en sucesivos periodos de tiempo, tanto de donador vivo como cadavérico (Reporte del 2006, North American Pediatric Renal Trials Cooperative Study [NAPRTCS] )

Hoy día la nefropatía crónica del trasplante se relaciona más a un proceso de índole multifactorial,<sup>6</sup> en el cual hay características tanto del donador como del receptor implicadas en el inicio y la progresión de la enfermedad.<sup>4</sup>

Aunque como ya se comentó previamente el conocimiento de la fisiopatología de la disfunción crónica del tejido renal trasplantado es pobremente entendido, la investigación ha orientado a establecer en su desarrollo dos fases,<sup>4</sup> una temprana en donde los factores de carácter inmunológico y lesiones asociadas a isquemia y reperfusión parecen ser preponderantes,<sup>1 4 7</sup> y una más tardía donde la relación con nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina muestra una mayor solidez.<sup>4</sup>

El tacrolimus es un macrólido aislado del hongo *Streptomyces tsukubaens* cuyas propiedades inmunosupresoras fueron reconocidas en 1984 y apoyadas posteriormente por varios estudios.<sup>3</sup> De manera general, su mecanismo de acción implica la unión a una proteína intracelular llamada FKBP-12 (FK binding protein, por su nombre en inglés) con lo cual se bloquea la translocación desde el citoplasma hacia el núcleo celular del Factor Nuclear de Linfocitos T activados (FNTA) inhibiendo la expresión de genes involucrados en la activación de células T, incluyendo aquellos para la interleucina 2.<sup>1-3</sup> A pesar de su similar mecanismo de acción, el tacrolimus tanto *in vivo* como *in vitro* ha demostrado ser entre 10 y 100 veces más activo que la ciclosporina en la inhibición de la respuesta inmune.<sup>8-10</sup>

Desafortunadamente, a pesar de su amplio uso y poder inmunosupresor, el tacrolimus enfrenta la dificultad de un estrecho margen terapéutico indicando la necesidad de una monitorización continua tanto para optimizar su eficacia como para limitar su toxicidad.<sup>11</sup> Lo anterior se suma a

una importante variabilidad interindividual de los niveles valle del medicamento, a pesar de la administración a dosis recomendadas<sup>12</sup>. Hay claras diferencias étnicas, con los pacientes de origen o ascendencia africana requiriendo dosis más altas para lograr las concentraciones sanguíneas adecuadas, a diferencia de lo observado en otros grupos étnicos.<sup>13</sup> Aparte de los factores raciales descritos, factores genéticos están claramente involucrados en estas diferencias.<sup>14</sup> Por lo referido, la definición de la dosis más apropiada del tacrolimus y el planeamiento de la mejor estrategia terapéutica se hace sumamente difícil, para este medicamento de características dosis-crítica.<sup>13</sup>

En resumen, factores relacionados con la farmacocinética, la farmacodinamia y especialmente la farmacogenética, son determinantes principales en el múltiple perfil de respuestas y toxicidad de los inhibidores de la calcineurina, a dosis dadas.

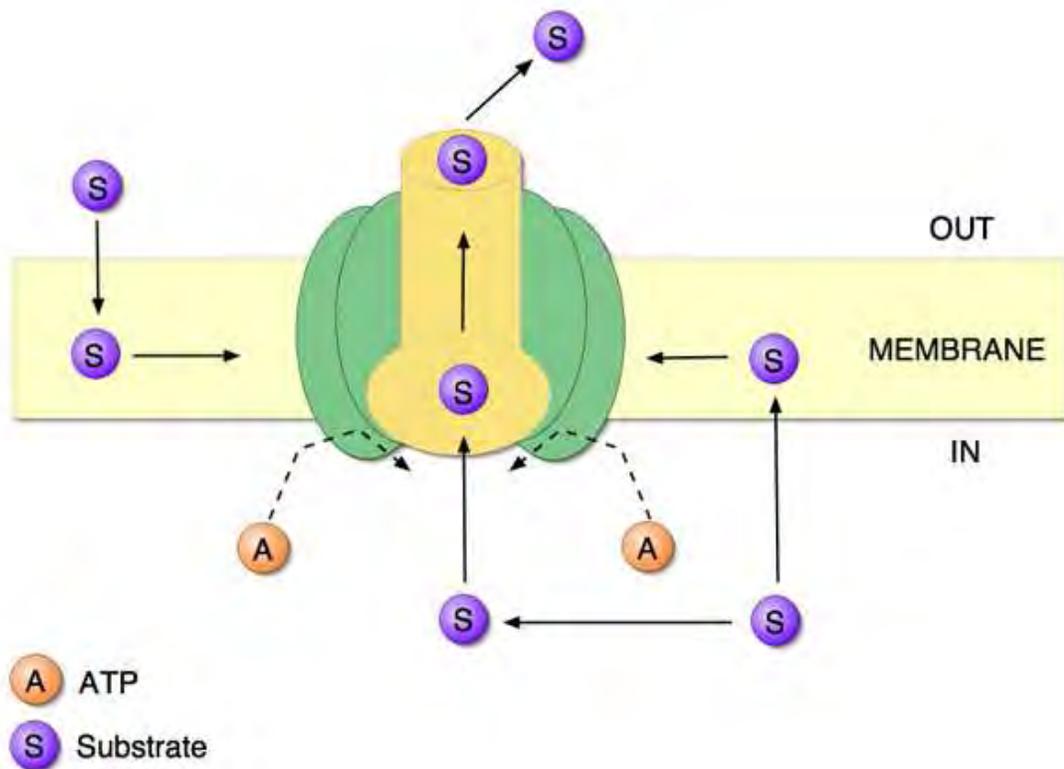
## II. MARCO TEORICO

### Glicoproteína P

Desde el contexto histórico, la glicoproteína P (gp-P), fue el primer miembro de la superfamilia de transportadores ligados al ATP (ATP-binding cassette o ABC, por sus siglas en inglés) en ser identificada en una célula eucariota. Este tipo de proteína puede ser clasificada en tres tipos principales basados en su función: transportadoras, reguladoras o tipo canal.<sup>15</sup> El fenómeno de resistencia a múltiples drogas, fue descrito ya a principios de los años 70's en líneas celulares tumorales<sup>16</sup> y desde entonces la investigación ha conocido de mejor forma su mecanismo subyacente, así como ha incrementado el número de sustancias involucradas.<sup>17</sup>

La gp-P, producto del gen humano ABCB1, es un transportador multidroga primario, que se localiza en la membrana plasmática celular, utiliza energía proveniente de la hidrólisis de ATP, con el objetivo de eliminar del medio intracelular productos xenobióticos potencialmente tóxicos.<sup>18</sup> Su espectro de sustancias o sustratos es amplio, de características estructurales en general no relacionadas, aunque con el común denominador de tener una tendencia hidrofóbica.<sup>19</sup> Su presencia se ha descrito en células epiteliales del intestino, en las membranas de los canalículos biliares, en la superficie luminal de las células del túbulo proximal renal, en la barrera hematoencefálica y en el propio compartimiento hematológico.<sup>16-17 20</sup> Se trata de una proteína de aproximadamente unos 170 kilodaltons (kD), con 1280 aminoácidos estructurales con un mecanismo de acción similar a un poro transmembrana interactuando con su sustrato en el citoplasma y expulsándolo al medio extracelular.<sup>16</sup> En la figura 2, puede observarse la

representación esquemática de la gp-P en la membrana celular y su forma de acción de una manera simple.<sup>21</sup>



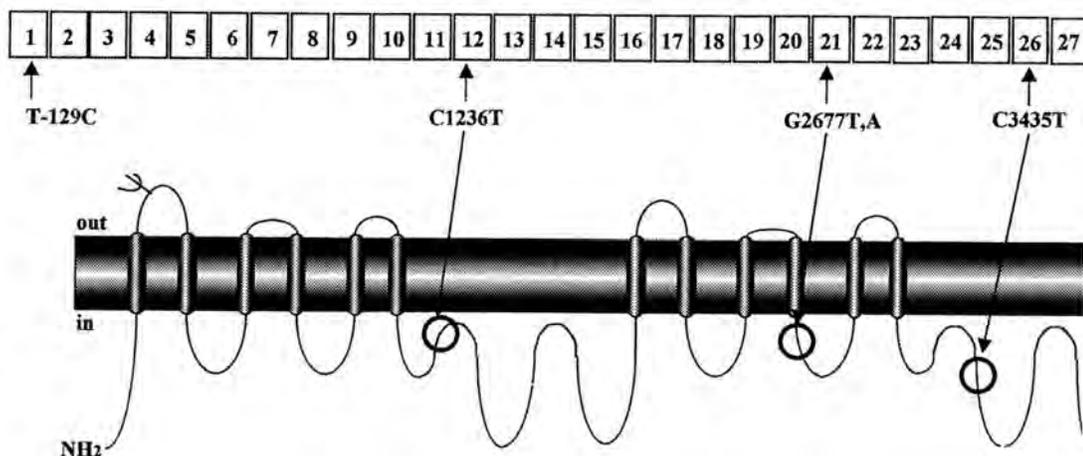
**Fig. 2.** Representación esquemática de la glicoproteína-P en la membrana celular, donde se observa que el centro molecular actúa como un poro a través del cual la sustancia xenobiótica es expulsada, y la energía para dicho proceso es dada por moléculas de ATP [Filaria Journal 2003 2(Suppl 1):S8]

Se puede comprender entonces la gran importancia que este transportador transmembrana ejerce en todo el contexto farmacológico de los inhibidores de la calcineurina, y en especial del tacrolimus afectando de esta forma su absorción a nivel intestinal, la distribución en los diferentes compartimientos del cuerpo y su metabolismo y excreción<sup>22</sup> demostrándose por ejemplo que su sobre-expresión intestinal genera una menor biodisponibilidad de su sustrato estableciéndose una relación inversa;<sup>11</sup> en

los últimos años, se han identificado polimorfismos únicos de nucleótidos (SNPs: single nucleotide polymorphisms).<sup>22</sup>

Desde el descubrimiento de los SNPs en el gen ABCB1, uno de los más estudiados ha sido el llamado polimorfismo silencioso en la posición 3435 en el exón 26 (3435C>T),<sup>11 23</sup> aunque muchos de los reportes han mostrado francas contradicciones entre ellos respecto del significado del mismo en la disposición de tanto ciclosporina como de tacrolimus.<sup>11</sup>

Otros polimorfismos que en años recientes han dirigido la investigación en este tema están la posición 1236C>T y la posición 2677G>T/A<sup>24</sup> siendo este último de gran interés por cuanto la mutación representa un cambio de aminoácido en la transcripción proteica,<sup>11</sup> con las posibles consecuencias tanto estructurales como funcionales de la gp-P. La figura 3, muestra una representación esquemática del gen ABCB1 y la posición relativa de los polimorfismos descritos, en los respectivos exones.<sup>25</sup>



**Fig 3.** Representación esquemática del gen de la resistencia a multidrogas 1 (MDR1 o ABCB1) y la estructura secundaria de su transcripción proteica (glicoproteína P). Los recuadros superiores, representan los exones. La localización de los diferentes polimorfismos (SNP) estudiados son indicados por flechas en relación a la estructura exónica del gen y la topología de la proteína (*J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1889-96)

## **CYP3A5**

El citocromo P-450 (CYP-450) es un grupo de enzimas con localización principalmente hepática que están implicadas en el metabolismo de la mayoría de fármacos comercializados, así como de otros xenobióticos y sustancias endógenas. Entre las enzimas que conforman esta familia, CYP3A, CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9 y CYP2C19<sup>26-28</sup> son las más importantes en cuanto a su participación en el metabolismo de fármacos, mientras que otras como CYP2C8, CYP2E1, CYP2A6 o CYP2J2 son de interés por alguna característica que las hace relevantes frente a situaciones concretas.<sup>29</sup>, bien porque presenten polimorfismos genéticos que puedan afectar al desarrollo normal de la terapia farmacológica o por otros aspectos que sean considerados de interés en cada caso particular.

Las isoenzimas de la subfamilia P-450 3A (CYP3A) son las enzimas que predominan en la fase I del metabolismo de fármacos en el hombre, además estas isoenzimas también metabolizan otros compuestos como hormonas esteroideas, toxinas y carcinógenos.

Esta subfamilia se compone de al menos 3 genes diferentes: CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7,<sup>30</sup> CYP3A43 también se ha identificado recientemente aunque su importancia metabólica es, por ahora, más que discutible. De estas enzimas, CYP3A4 es la principal, representando el 30% del total del citocromo P-450 en el hígado<sup>30</sup>, CYP3A5 presenta una actividad catalítica muy similar mientras que CYP3A7 es la forma enzimática presente en el feto.

Debido a la gran similitud catalítica entre CYP3A4 y CYP3A5 así como a la casi exclusiva localización fetal de CYP3A7, estas enzimas se suelen

denominar conjuntamente como CYP3A. Si bien gana terreno la idea de un papel más preponderante del pensado hasta ahora para CYP3A5 en la actividad total de CYP3A.<sup>31</sup>

La actividad de CYP3A presenta una alta variabilidad interindividual entre la población, dicha variabilidad pudiera tener una base genética, sin embargo la importancia clínica de las variantes encontradas (*CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3* principalmente), aunque en un principio se conectara alguna de ellas a ciertos estadios en el cáncer de próstata,<sup>32</sup> está todavía por demostrar de forma consistente. De hecho, un estudio no encuentra una correlación significativa entre los diferentes genotipos y el fenotipo total de CYP3A.<sup>33</sup>

Otra causa de la antes mencionada variabilidad interindividual es que la actividad de esta enzima es altamente modulable, ya sea por otros fármacos (inductores o inhibidores), enfermedades, la dieta o factores ambientales.

Debido a la gran cantidad de fármacos metabolizados por esta enzima, la importancia clínica de este citocromo es obvia. Por ejemplo, en la terapia farmacológica post-transplante, muchos de los inmunosupresores utilizados, por ejemplo tacrolimus o ciclosporina, son sustratos de CYP3A y a menudo de la gp-P en el tracto gastrointestinal, de manera que el uso de otros fármacos en dicha terapia, por ejemplo esteroides, que alteren la actividad de CYP3A y/o Pgp, pueden afectar a los niveles del inmunosupresor demandando un ajuste de su dosis para alcanzar el efecto terapéutico o evitar efectos adversos.<sup>34</sup>

Igualmente, la participación de CYP3A en el metabolismo de la mayor parte de las estatinas hace que la inhibición de la enzima sea clave en el aumento de los niveles plasmáticos de estos hipocolesterolemiantes, provocando así un riesgo de miopatía que potencialmente puede llegar a ser fatal.<sup>35</sup>

CYP3A también es importante en el metabolismo de muchas sustancias psicoactivas, como cocaína, metadona, ansiolíticos, hipnóticos, antipsicóticos, antiepilépticos o los inhibidores de la recaptación de serotonina (IRSs). Varios de estos IRSs, ampliamente usados, son inhibidores de la actividad enzimática tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>36-38</sup> y, de hecho, muchas de las interacciones observadas tras administrar estos antidepresivos son atribuibles a interacciones con las isoenzimas de la subfamilia CYP3A.<sup>39-43</sup> La presencia probada de esta enzima y su actividad en cerebro<sup>44</sup> sugiere que pueda existir un metabolismo y regulación local importante, al menos cualitativamente, de estas sustancias en el sitio de acción, aunque este hecho todavía debe confirmarse.<sup>45</sup>

Finalmente conocemos de la existencia de citocromo P en riñón, sin que hasta el momento tengamos una idea clara de su función y repercusión en la homeostasia renal.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trasplante renal, es el tratamiento de elección en el proceso de rehabilitación del paciente con insuficiencia renal en condición terminal. En el niño es la mejor opción por cuanto con ella se logra disminuir y aun revertir los efectos negativos que la condición urémica conlleva tanto desde el punto de vista físico, cognoscitivo y del desarrollo psicológico y social.

En la actualidad, los obstáculos encontrados por los pioneros del trasplante renal especialmente los relacionados con el rechazo agudo han prácticamente desaparecido, dados los grandes avances tanto en áreas como la inmunología y la farmacología con medicamentos que ofrecen un mejor comportamiento inmunosupresor, sumado lo anterior a técnicas quirúrgicas y de cuidado posoperatorio que garantizan en un alto porcentaje de los pacientes el éxito inicial del mismo.

No obstante lo anterior, el riñón trasplantado se sigue enfrentando al proceso de disfunción crónica del mismo que limita de manera importante su supervivencia en el mediano y largo plazo. La nefropatía crónica del trasplante (o el rechazo crónico, como suele llamarse para referirse al mismo proceso) se constituye en la principal causa de falla y pérdida del injerto<sup>4 46-48</sup> excluyendo aquellas muertes con riñón trasplantado funcional asociadas a complicaciones cardiovasculares o malignidad<sup>49</sup> y se estima que cuenta por aproximadamente el 25 al 30 % de aquellos pacientes en lista de espera por un trasplante renal, cuando ya han tenido uno previo.<sup>50</sup> Los hallazgos histológicos compatibles con nefropatía crónica del trasplante son comunes después del primer año postrasplante,<sup>49</sup> y pueden encontrarse hasta en el 81% de los especímenes evaluados en este momento.<sup>51</sup> En el proceso de disfunción varios factores han sido involucrados, dando a los efectos

secundarios por los anti-calcineurínicos un valor destacado en su fisiopatología.

La amplia variación inter-racial e inter-individual en la biodisponibilidad y farmacocinética del tacrolimus es un factor limitante en la adopción de niveles séricos de referencia que puedan ser universalmente aplicados a todos los pacientes trasplantados y conlleva a que con este estrecho margen terapéutico la sobre-inmunosupresión con el consiguiente desarrollo de infecciones, malignidad y nefrotoxicidad sea difícil de separar del riesgo de rechazo y pérdida temprana del injerto.

#### **IV. PREGUNTA DE INVESTIGACION**

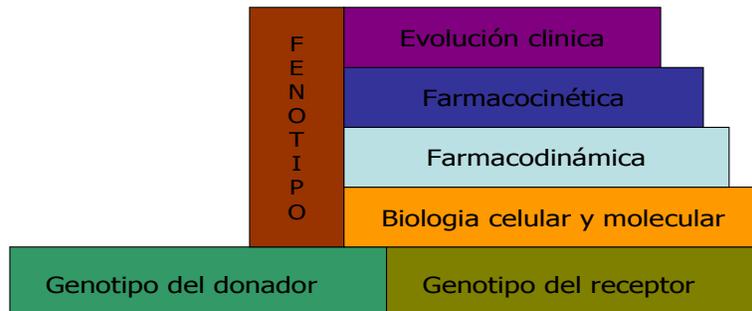
Con el presente trabajo se plantea como pregunta de investigación:

¿Cuál es la frecuencia de expresión de los polimorfismos en los exones 12 y 21 del gen ABCB1 y de los CYP3A5\*1 y CYP3A5\*3 del gen CYP3A5 en los donadores renales de pacientes pediátricos trasplantados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, y que relación pudieran tener con nefrotoxicidad por tacrolimus a los 6 meses postrasplante?

## V. JUSTIFICACION

Desconocemos a la fecha qué papel juega la expresión de glicoproteína P del riñón trasplantado en la toxicidad por tacrolimus y cuál es la frecuencia de los polimorfismos del gen ABCB1 o MDR1 que la codifica en los donadores renales, y la expresión de los dos polimorfismos más frecuentes del citocromo P450 (CYP3A5\*1 y CYP3A5\*3), que sabemos también se manifiestan en tejido renal. Del mismo modo no hay estudios que describan si la presencia de estos polimorfismos influye en mayor o menor grado dicha toxicidad. Existen algunas investigaciones con trasplante hepático que intentan establecer la relación, pero con resultados relativamente contradictorios.<sup>52-55</sup>

En nuestro medio, y menos en la población pediátrica mexicana no hay estudios en tal sentido, por lo cual es importante conocer la presencia de estas mutaciones, tanto en los donadores como en los receptores renales y establecer la relación que tienen con los resultados a mediano y largo plazo sean estos favorables o desfavorables. Conocer desde un punto de vista práctico y de forma anticipada la interacción farmacogenética en el binomio DONADOR - RECEPTOR en el trasplante renal posibilitaría plantear de una mejor manera el monitoreo clínico y farmacológico que estos pacientes demandan. En la figura 4 intentamos esquematizar, lo anteriormente referido. Se intenta en la misma destacar, que la interacción del genotipo y el fenotipo expresado de ese órgano trasplantado junto a los determinantes genéticos del receptor, traen como consecuencia respuestas en varios aspectos que finalmente contribuirán que la respuesta o evolución clínica sea positiva o negativa.



**Fig. 4.** Diferentes interacciones DONADOR-RECEPTOR en medicina de trasplantes

Consideramos pues, visto así desde este punto de vista, que el intentar evaluar la influencia genómica y su expresión fenotípica del órgano trasplantado, podría en parte contribuir en la búsqueda de aquellos aspectos que subyacen la enfermedad crónica del riñón trasplantado.

## **VI. OBJETIVOS**

### **General**

Identificar los polimorfismos en los exones 12 y 21 del gen ABCB1 que codifica la glicoproteína P y del gen CYP5A (CYP3A5\*1 y CYP3A5\*3) del sistema de citocromo P450 en un grupo de donadores renales, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

### **Específicos**

1. Revisar las características demográficas de un grupo de pacientes pediátricos trasplantados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).
2. Conocer la frecuencia de nefrotoxicidad por tacrolimus en la población pediátrica trasplantada del HIMFG.
3. Establecer la presencia de polimorfismos de glicoproteína P, en donadores renales, localizados en los exones 12 y 21 de su respectivo.
4. Establecer la frecuencia de polimorfismos de la isoforma CYP5A, del sistema citocromo P450, en donadores renales.
5. Relacionar la presencia o ausencia de tales polimorfismos con la nefrotoxicidad por tacrolimus en el primer año post-trasplante renal.

## **VII. MATERIAL Y METODO**

### **Diseño y tipo de estudio**

Descriptivo y transversal

### **Población**

Pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México, de cualquier género con trasplante renal de donador vivo relacionado, que participan de un protocolo de dos esquemas de inmunosupresión y que recibieron su trasplante a partir del segundo semestre de 2007, que cuentan además con seis (6) o más meses de trasplantados.

### **Criterios de inclusión**

1. Pacientes del HIMFG receptores de trasplante renal, de donador vivo relacionado, con un expediente activo.
2. Ambos sexos.
3. Participantes de un protocolo de investigación que estudia dos esquemas de inmunosupresión.
4. Con archivo clínico completo.
5. Que se cuente en el laboratorio de investigación en nefrología con muestra de Acido Desoxiribonucleico (ADN) previamente extraído de sus respectivos donadores.
6. Que se cuente con biopsia renal tomada aproximadamente a los seis meses del trasplante.
7. Consentimiento firmado, para participación en el estudio de doble esquema de inmunosupresión.

## **Criterios de exclusión**

1. Archivo o expediente clínico incompleto.
2. Sin biopsia renal a los 6 meses postrasplante.
3. Inadecuado material genético (ADN), para procesar.

## **Características del lugar donde se desarrolló el estudio**

El Hospital Infantil de México Federico Gómez, es un Instituto Nacional de Salud, ubicado en la calle Doctor Márquez No. 162, en la colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc. Es un hospital de tercer nivel, que atiende a población abierta referida de todas las instituciones de salud del Distrito Federal, área metropolitana y resto de la república mexicana, el cual labora los 365 días del año, las 24 horas del día.<sup>56</sup>

El Hospital Infantil de México Federico Gómez cuenta con 300 camas activas.<sup>56</sup> El estudio se desarrolló con pacientes del servicio de Nefrología, en el laboratorio de investigación en Nefrología y el laboratorio clínico de nefrología localizados en el tercer piso del edificio Arturo Mundet y el cuarto piso del edificio Federico Gómez.

## **Metodología**

### *Registro de datos.*

De acuerdo a base de datos establecida en el servicio de nefrología y en el laboratorio de investigación en nefrología, se seleccionaron los pacientes candidatos para el presente estudio. Con base en ello se ubicaron sus respectivos expedientes clínicos en el archivo del HIMFG. Mediante un formato se consignaron los datos obtenidos de la revisión del expediente de

cada paciente. Para cada paciente: edad, género, registro, fecha del trasplante, niveles séricos de tacrolimus a los tres y seis meses postrasplante, reporte oficial de biopsia renal de los 6 meses a la microscopía de luz y revisión por patólogo, de las biopsias para determinar existencia de nefrotoxicidad (dos revisiones) estableciendo una cualificación de la posibilidad o certeza de hallazgos de toxicidad, fecha de la biopsia, se consignó del mismo modo, edad y sexo del donador (todos los trasplantes fueron de donador vivo relacionado); fueron consignados en dicho formato. El vaciado de datos se realizó en hoja de cálculo de Excel (Microsoft).

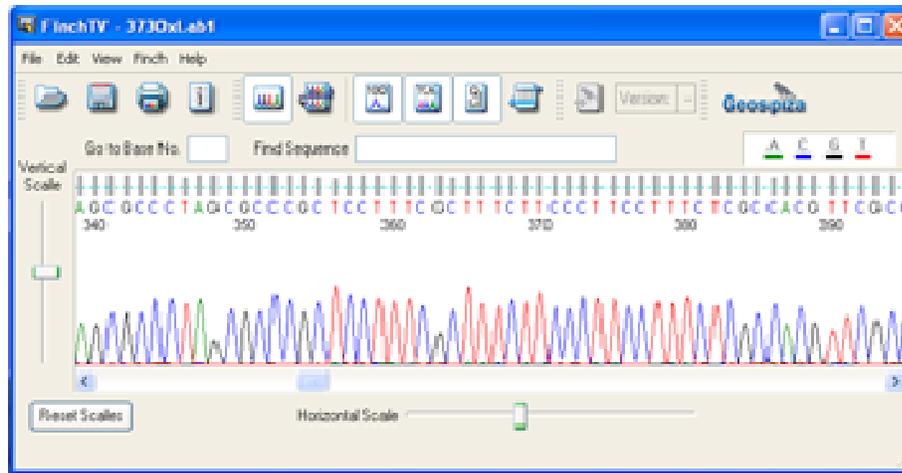
#### *Obtención de muestra para estudio genético.*

Para los pacientes que cumplieron criterios de inclusión, previamente se había obtenido sangre periférica de sus respectivos donadores, en cantidad aproximada de 6 mililitros, la cual se depositó en un tubo con EDTA (BD vacutainer). Se empleó QIAamp DNA Blood minikit (QIAGEN, Crawley, UK) para la purificación del ADN, atendiendo a las indicaciones del fabricante. La pureza y la concentración del ADN que se obtuvo, se evaluaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND 1000) a dos diferentes longitudes de onda (260 y 280 nm), y se consideró como muestra adecuada aquella que reflejó valores entre 1.6 a 2 en la relación de longitud de onda 260/280. Las muestras de ADN se conservaron a -70°C hasta el momento de la secuenciación de los exones 12 y 21 de ABCB1 ó MDR1 y búsqueda del polimorfismo de CYP3A5 (CYP3A5 \*1\*1, CYP3A5 \*3\*3 y CYP3A5 \*1\*3) por PCR en tiempo real.

#### *Análisis de secuencias*

Las secuencias de los exones 12 y 21 se obtuvieron con un secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems).

La lectura de secuencias se hizo utilizando software libre de lectura gráfica de archivos cromatográficos FinchTV (Finch Trace Viewer)- <http://www.geospiza.com/finchtv/help/>, figura 5.



**Fig. 5.** Vista estándar de el lector gráfico de archivos cromatográficos (FinchTV)

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias reportadas y establecidas en Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), mediante el programa computarizado DNAMAN (<http://lynnon.com>) para correlacionar las variaciones encontradas.

La secuencia de los iniciadores y las sondas fluorogénicas de los exones de cada uno de genes fueron diseñadas con el programa Primer Express. La integridad del ADN extraído se determinó por electroforesis en gel de agarosa, revelándose con sybergold en un transiluminador. Dicha secuencia para los exones 12 y 26, son mostradas en las siguientes tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1.

Exón 12 (Ensembl)	Secuencia
Sentido	5' AAG TGT GAG TTG GCC ATC TAT CCA CC
Antisentido	3' ACC GTC TGC CCA CTC TGC AC

Tabla 2.

Exón 21	Secuencia
Sentido	5' GTG TAT TGA ATG TGA CAT CCT G
Antisentido	3' GCA TGT GAT ATA TTC GTA GGT TAG

#### *Genotipificación de CYP3A5*

Para la genotipificación del CYP3A5\*3 (6981A>G) fueron empleados las sondas: 6981A, 6981G, primer común así como TaqMan probe propuesto por Hiratsuka y col.<sup>57</sup> Las lecturas fueron realizadas en un equipo de PCR en tiempo real (7500 Applied Biosystems).

## Variables

En la tabla siguiente se describen la operatividad de las variables.

Tabla 3.

<b>Variable</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Unidades de medición</b>	<b>Definición operativa</b>
<b>Edad</b>	Cuantitativa	Continua	Años	Edad cronológica desde el nacimiento hasta el momento de realización del trasplante.
<b>Sexo</b>	Nominal	Dicotómica	-Femenino, -Masculino	Características fenotípicas que clasifican a las personas en hombres o mujeres.
<b>Presión arterial</b>	Cuantitativa	Continúa	mm/Hg	Posterior a 5 min de encontrarse el paciente en sedestación con un brazalete que cubra 2/3 la longitud del brazo y utilizando baumanómetro anerode calibrado, se determinaron las cifras de tensión arterial en tres ocasiones, y el promedio de las dos últimas será considerado como la cifra de tensión arterial <sup>38</sup> .
<b>Nivel de creatinina</b>	Cuantitativa	Continua	mg/dl	Medición en sangre, de acuerdo a técnicas de laboratorio establecidas
<b>Nivel de tacrolimus</b>	Cuantitativa	Continua	ng/dl	Medición en sangre, de acuerdo a técnicas de laboratorio establecidas
<b>Hallazgos biopsia renal 6 meses</b>	Nominal	Dicotómica	-Normal -Nefropatía crónica	De acuerdo a reporte oficial de la biopsia

<b>Toxicidad por tacrolimus</b>	Nominal		-Negativa -Sugestiva -Presente	De acuerdo a revisión por patólogo
<b>Presencia de SNP exones 12 y 21 de Ensembl</b>	Nominal	Dicotómica	-Sí -No	Según se identifique por secuenciación y amplificación de ADN
<b>CYP3A5</b>	Nominal	Dicotómica	Homocigoto Heterocigot	Según se identifique por secuenciación y amplificación de ADN

### **Análisis estadístico**

Se realizó estadística descriptiva (medidas de tendencia central y dispersión, así como medidas de frecuencia). Se utilizó el paquete estadístico de software libre, de Epi-Info, del CDC ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

### **Consideraciones éticas**

De acuerdo a la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, el riesgo que presentaron los pacientes en este estudio corresponde a un riesgo mínimo, considerando la extracción de sangre menor a 10 ml, la cual en todo caso ya existía, por cuanto ya se había obtenido previo al trasplante renal. Un consentimiento informado para la obtención de muestras ya había sido firmado por los respectivos donadores.

## **Consideraciones de bioseguridad**

El material utilizado para la extracción de sangre fue eliminado de acuerdo a las normas de manejo de *Residuos Potencialmente Biológico Infecciosos* (RPBI).

## VIII. RESULTADOS

Se encontraron en la base de datos de pacientes trasplantados pediátricos en el Hospital Infantil de México, que inicialmente pudieran cumplir los criterios de inclusión y exclusión mencionados, un total de 26 pacientes, no obstante después de depurar y valorar sus expedientes, y la posibilidad de conseguir el respectivo ADN de todos sus donadores, se logra realizar la evaluación de 23 pacientes. La muestra bruta de las características de los pacientes se muestra en la tabla 4

**Tabla 4.** Demografía de los pacientes

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
Edad del receptor (años)	14.7 ± 1.5
Género	
Masculino	14 ( 61 %)
Femenino	9 (39%)
Inmunosupresión n (%)	
MMF+Tac+PDN	11 (47.8%)
MMF + Tac	12 (52.2%)
Causa de uremia n (%)	
Desconocida	20 (82.6%)
Estructurales/Uropatías	1 (4.3%)
Otras	2 (8.6%)

Niveles de tacrolimus (ng/mL)	
3 meses	11.14 ± 2.2
6 meses	5.9 ± 1.1
Diagnóstico histopatológico Basal	
Normal n (%)	17 (73.9%)
Anormal n (%)	6 (26.1%)
Diagnóstico histopatológico 6 meses	
Normal	4 (17.5%)
Nefropatía crónica	18 (78.2%)
Nefrotoxicidad	1 (4.3%)

**Tabla 5.** Demografía de los Donadores

<b>Variable</b>	<b>Resultado</b>
<b>Edad (años)</b>	39.4 ± 2.6
<b>Género</b>	
<b>Masculino</b>	8 (34.8%)
<b>Femenino</b>	15 (65.2%)

Las edades de los pacientes oscilaron entre los 12 y 18 años de edad, con un promedio de  $14.7 \pm$  años. Sus donadores tuvieron un promedio de edad de  $39.4 \pm 2.6$

Se aprecia en ella, un mayor porcentaje de pacientes del sexo masculino, como receptores de trasplante renal, siguiendo en ese sentido la tendencia observada a nivel mundial en niños. Del mismo modo, los donadores renales mostraron preponderancia por el sexo femenino, con un porcentaje de 65.2%, mostrando de esta forma lo que en la práctica diaria se observa, cual es que son en general las mamás, madres quienes más aceptan donar su riñón.

Los niveles de tacrolimus estuvieron dentro de los valores o rangos de referencia, aceptados para el tiempo de trasplante, con un promedio de  $11.14 \pm 2.2$  ng/ml, para los 3 meses después del trasplante y de  $5.9 \pm 1.1$  ng/ml, para los 6 meses, previos a la toma de biopsia de control, como se muestra en la tabla 4.

El reporte histológico de las biopsias realizadas, a la microscopía de luz mostró una clara tendencia a reportarse cambios crónicos de la nefropatía del trasplante.

La revisión por patólogo de las biopsias, en busca de nefrotoxicidad por tacrolimus, solo mostró certeza de ella en sólo un paciente.

La secuencia genómica detectada de los pacientes para los exones 12 y 21, del gen ABCB1 no mostraron cambios en las pares de bases, de acuerdo a los datos que existen en la página web de Ensembl org<sup>58</sup>

(www.ensembl.org), el nivel de concordancia fue del 100%, lo cual está de acuerdo a lo que la misma página reporta para el polimorfismos de dicha posición (rs2229109 ó 1199G>A), en el exón 12 y en el exón 21, de ensambl se reportan dos polimorfismos exónicos, los cuales son el rs41305517 ó 2398G>A y el rs2235039 ó 2401G>A

**Tabla 6.** SNPs reportados para el gen ABCB1 Exon12 y 21

	<b>SNP</b>	<b>EXON</b>	<b>Alelos reportados en dirección sentido</b>	<b>Función</b>	<b>Residuo</b>	<b>Codón</b>	<b>AA</b>
1	rs229109	12	G/A	Sinónimo			
2	rs41305517	21	C/T	Sinónimo			
3	Rs2235039	21	C/T	Sinónimo			

Todos los donadores renales estudiados tuvieron el genotipo ancestral para los SNPs estudiados.

Todos los donadores renales fueron heterocigotos para el gen CYP3A5 1\*/3\*, incluyendo el caso en que se detectó nefrotoxicidad por inhibidor de la calcineurina en la biopsia renal.

## IX. DISCUSION

El presente trabajo, aborda un aspecto que en la literatura no ha sido evaluado en el pasado, por lo menos desde el punto vista del trasplante renal, cual es el de valorar que efectos postrasplante derivan del genotipo y posterior activación fenotípica del injerto renal, en un receptor, cuyas características genómicas, son al menos un 50% diferentes a las de aquel. En la literatura se ha buscado establecer esta relación en el área del trasplante hepático<sup>52 59-61</sup> o la medicina del tracto digestivo,<sup>62</sup> con resultados que son contradictorios sobre la verdadera influencia de los polimorfismos encontrados tanto en las bombas de expulsión transmembrana como la glicoproteína P, como en los sistemas enzimáticos y metabólicos como el citocromo P450.

En nuestro caso, el interés deriva de la dificultad de mantener una función renal aceptable y/o mejorar tasas de sobrevida renal del injerto más allá de los 5 años en promedio, sin que factores como la nefropatía crónica, estrechamente relacionada con la fibrosis intersticial, que finalmente es fuertemente influenciada por nefrotoxicidad propia de la inmunosupresión, como el tacrolimus o la ciclosporina, siga siendo una razón de peso en la patofisiología de la disfunción crónica y finalmente en la pérdida del injerto,<sup>1</sup> máxime cuando en la actualidad, los episodios de rechazo temprano son cada vez menos frecuentes y mejor controlados, y que en el pasado fueron considerados como el punto angular en el desarrollo de la enfermedad crónica del trasplante.

En la muestra estudiada tuvimos únicamente un caso con franca nefrotoxicidad por inhibidor de calcineurina, sin embargo todos los donadores

estudiados tuvieron el genotipo ancestral para los exones 12 y 21 de ABCB1 y todos fueron heterocigotos para CYP 3<sup>a5</sup> 1\*/3\*.

## X. CONCLUSIONES

1. Todos los donadores renales estudiados tuvieron el genotipo ancestral para el exon 12 y 21 del ABCB1.
2. Todos los donadores estudiados fueron heterocigotos para CYP3A5, por lo que todos expresan la enzima.
3. Es necesario aumentar el tamaño de muestra, incluir a más pacientes con nefrotoxicidad y estudiar las posiciones 1236C>T y 2677G>T/A para definir si el genotipo del donador influye en el riesgo de nefrotoxicidad.
4. Lo anterior, debe ser contrastado con estudios que muestren las interacciones existentes entre el genotipo del donador y el receptor, sumados a las expresiones fenotípicas respectivas.
5. Los estudios a futuro, deberán incluir trasplantados renales cuyo origen involucre donador cadavérico, por cuanto deberá tenerse en cuenta que en estos casos, quizás los periodos de isquemia del órgano, influyen en los procesos de activación y desempeño funcional de estas proteínas transmembrana importantes en la farmacogenética de los medicamentos inmunosupresores.

## XI. REFERENCIAS

1. Geary DF, Schaefer F. *Comprehensive pediatric nephrology*. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier, 2008.
2. Kher K, Schnaper HW, Makker SP. *Clinical Pediatric Nephrology*. 2 ed. London: Informa HealthCare, 2006.
3. Alarcón MdC, Alberú J, Arvizu M, otros y. *Trasplantomecum renal*. 1 ed. Barcelona: Publicaciones Permanyer, 2008.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326-33.
5. Smith JM, Stablein DM, Munoz R, Hebert D, McDonald RA. Contributions of the Transplant Registry: The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS). *Pediatr Transplant* 2007;11(4):366-73.
6. Birnbaum LM, Lipman M, Paraskevas S, Chaudhury P, Tchervenkov J, Baran D, et al. Management of chronic allograft nephropathy: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4(4):860-5.
7. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007;7(3):518-26.
8. Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds D. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993;46(4):746-94.
9. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 1997;54(6):925-75.
10. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59(2):323-89.
11. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour D, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;14(3):147-54.
12. Akbas SH, Bilgen T, Keser I, Tuncer M, Yucetin L, Tosun O, et al. The effect of MDR1 (ABCB1) polymorphism on the pharmacokinetic of tacrolimus in Turkish renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2006;38(5):1290-2.
13. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002;74(11):1486-9.
14. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. The Influence of Pharmacogenetics on the Time to Achieve Target Tacrolimus

- Concentrations after Kidney Transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(6):914-9.
15. Kimura Y, Matsuo M, Takahashi K, Saeki T, Kioka N, Amachi T, et al. ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter: MDR1/P-glycoprotein. *Curr Drug Metab* 2004;5(1):1-10.
  16. Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* 1996;27(8):1283-91.
  17. van Gelder T, Klupp J, Sawamoto T, Christians U, Morris RE. ATP-binding cassette transporters and calcineurin inhibitors: potential clinical implications. *Transplant Proc* 2001;33(3):2420-1.
  18. Al-Shawi MK, Omote H. The remarkable transport mechanism of P-glycoprotein: a multidrug transporter. *J Bioenerg Biomembr* 2005;37(6):489-96.
  19. Pascaud C, Garrigos M, Orlowski S. Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochem J* 1998;333 ( Pt 2):351-8.
  20. Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, et al. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 2004;40(14):2064-70.
  21. Edwards G. Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria J* 2003;2 Suppl 1:S8.
  22. Anglicheau D, Legendre C, Thervet E. Pharmacogenetics of tacrolimus and sirolimus in renal transplant patients: from retrospective analyses to prospective studies. *Transplant Proc* 2007;39(7):2142-4.
  23. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285-307.
  24. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70(2):189-99.
  25. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1889-96.
  26. Canaparo R, Finnstrom N, Serpe L, Nordmark A, Muntoni E, Eandi M, et al. Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(11):1138-44.
  27. Bochud M, Bovet P, Burnier M, Eap CB. CYP3A5 and ABCB1 genes and hypertension. *Pharmacogenomics* 2009;10(3):477-87.
  28. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Pascual M, Eap CB. CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008;30(6):689-99.
  29. Eap CB, Bochud M, Elston RC, Bovet P, Maillard MP, Nussberger J, et al. CYP3A5 and ABCB1 genes influence blood pressure and response to treatment, and their effect is modified by salt. *Hypertension* 2007;49(5):1007-14.

30. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22(1):1-21.
31. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27(4):383-91.
32. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(16):1225-9.
33. Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL, Jr., Bhat K, et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 2003;13(10):595-606.
34. Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, et al. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(11):2409-14.
35. Vlahakos DV, Manginas A, Chilidou D, Zamanika C, Alivizatos PA. Itraconazole-induced rhabdomyolysis and acute renal failure in a heart transplant recipient treated with simvastatin and cyclosporine. *Transplantation* 2002;73(12):1962-4.
36. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI. Inhibition of human cytochrome P450-3A isoforms by fluoxetine and norfluoxetine: in vitro and in vivo studies. *J Clin Pharmacol* 1996;36(9):792-8.
37. Ring BJ, Binkley SN, Roskos L, Wrighton SA. Effect of fluoxetine, norfluoxetine, sertraline and desmethyl sertraline on human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275(3):1131-5.
38. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Schmider J, Duan SX, Wright CE, Harmatz JS, et al. Midazolam hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by fluoxetine, norfluoxetine, and byazole antifungal agents. *J Clin Pharmacol* 1996;36(9):783-91.
39. Sproule BA, Naranjo CA, Brenner KE, Hassan PC. Selective serotonin reuptake inhibitors and CNS drug interactions. A critical review of the evidence. *Clin Pharmacokinet* 1997;33(6):454-71.
40. Baumann P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 1996;31(6):444-69.
41. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Fogelman SM, Chen G, Graf JA, et al. Short-term exposure to low-dose ritonavir impairs clearance and enhances adverse effects of trazodone. *J Clin Pharmacol* 2003;43(4):414-22.
42. Wright DH, Lake KD, Bruhn PS, Emery RW, Jr. Nefazodone and cyclosporine drug-drug interaction. *J Heart Lung Transplant* 1999;18(9):913-5.
43. Naranjo CA, Sproule BA, Knoke DM. Metabolic interactions of central nervous system medications and selective serotonin reuptake inhibitors. *Int Clin Psychopharmacol* 1999;14 Suppl 2:S35-47.
44. Voirol P, Jonzier-Perey M, Porchet F, Reymond MJ, Janzer RC, Bouras C, et al. Cytochrome P-450 activities in human and rat brain microsomes. *Brain Res* 2000;855(2):235-43.

45. Martinez C, Gervasini G, Agundez JA, Carrillo JA, Ramos SI, Garcia-Gamito FJ, et al. Modulation of midazolam 1-hydroxylation activity in vitro by neurotransmitters and precursors. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56(2):145-51.
46. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking Chronic Allograft Nephropathy: The Concept of Accelerated Senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(1):167-81.
47. Colvin RB. Chronic Allograft Nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2288-90.
48. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006;81(5):643-54.
49. Weir MR, Wali RK. Minimizing the risk of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2009;87(8 Suppl):S14-8.
50. Womer KL, Vella JP, Sayegh MH. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol* 2000;20(2):126-47.
51. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009;9(3):527-35.
52. Barrera-Pulido L, Aguilera-Garcia I, Docobo-Perez F, Alamo-Martinez JM, Pareja-Ciuro F, Nunez-Roldan A, et al. Clinical relevance and prevalence of polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 genes that encode tacrolimus biotransformation enzymes in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2008;40(9):2949-51.
53. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Biondi F, Sanguedolce R, et al. The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients. *Ann Transplant* 2009;14(1):23-31.
54. Thorn M, Lundgren S, Herlenius G, Ericzon BG, Loof L, Rane A. Gene expression of cytochromes P450 in liver transplants over time. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60(6):413-20.
55. Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* 2002;74(4):571-2.
56. Gerez B. Alteraciones en la histomorfometría osea en niños con Lupus Eritematoso Sistémico. *Tesis de grado* 2009(Tomo único):pág 16.
57. Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;58(6):417-21.
58. Arodz T, Yuen DA, Dudek AZ. Ensemble of linear models for predicting drug properties. *J Chem Inf Model* 2006;46(1):416-23.
59. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006;112(2):457-73.
60. Chinn LW, Kroetz DL. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(2):265-9.
61. Christians U, Schmitz V, Haschke M. Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1(4):641-54.

62. Collett A, Higgs NB, Gironella M, Zeef LA, Hayes A, Salmo E, et al. Early molecular and functional changes in colonic epithelium that precede increased gut permeability during colitis development in *mdr1a(-/-)* mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(5):620-31.