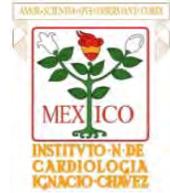




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA**

**“IGNACIO CHÁVEZ”**

***“Relación entre los polimorfismos -344 T/C e Int 2 W/C del gen que codifica para la Sintasa de Aldosterona y el desarrollo de Nefrotoxicidad por Inhibidores de Calcineurina en pacientes con Trasplante Renal en el Instituto Nacional de Cardiología “ Ignacio Chávez”.***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:**

**NEFROLOGÍA**

**PRESENTA:**

**DRA. PATRICIA CORAL RUIZ PALACIOS**

**TUTOR DE TESIS:**

**DR. FRANCISCO EUGENIO RODRÍGUEZ CASTELLANOS**

**MÉXICO D.F., JULIO DE 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.

---

Dr. Fernando Guadalajara Boo  
Director de Enseñanza e Investigación  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dra. Martha Franco Guevara  
Jefe del Departamento de Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dr. Gerardo Gamba Ayala  
Coordinador del Departamento de Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dr. Francisco Rodríguez Castellanos

Tutor de Tesis

Medico Adjunto al Servicio de Nefrología

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

---

Dra. Patricia Coral Ruiz Palacios

Alumno de la Especialidad en Nefrología

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

## **DEDICATORIAS**

**A Gustavo.** El hombre que me ha brindado su Amor, apoyo incondicional, y parte de su vida... Gracias por todo lo que le has dado a mi existir.

**A mis Padres, siempre a mis padres.** Por su incansable enseñanza y amor durante toda mi vida. La mejor guía que Dios puso en mi camino y a quienes estaré eternamente agradecida.

**A mis Hermanos.** Aseret, Gonzalo, Miguel... Tres fortalezas que me acompañan, desde el principio... y hasta el final. Gracias por compartir el ánimo y deseos de superación.

## AGRADECIMIENTOS

### **A mi tutor y colaboradores de Tesis...**

#### **Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos.**

Soy afortunada en tener a un excelente tutor, quien siempre esta dispuesto a enseñar y colaborar con su experiencia y conocimientos. Gracias por guiar, corregir y respaldar mi trabajo, y más aún, por brindarme su amistad.

#### **Dr. Eduardo Mancilla Urrea.**

Gracias por su confianza, por su trato siempre sincero y su invaluable disponibilidad para apoyarme durante estos 3 años de aprendizaje, mi padrino de corazón. Gracias a su invaluable apoyo fue posible la realización de esta Tesis, y quiero recalcar que sin el apoyo económico simplemente no hubiéramos podido realizar el estudio

#### **Dra. María del Carmen Avila Casado.**

Una gran mujer que transmite fuerza, sin duda, mi ejemplo y mi respaldo personal y profesional.

#### **Dr. Gilberto Vargas Alarcón y José Manuel Fragoso Lona**

Gracias al Departamento de Biología Molecular por su disponibilidad y apoyo a la investigación, pieza fundamental para el desarrollo del protocolo, y sin el cual, no se hubiese realizado.

#### **Dra. Claudia Lerma González.**

Siempre dispuesta, siempre incondicional. Gracias por tu amistad y todo el apoyo en mi formación.

## **ÍNDICE**

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	10
<b>CAPITULO I. MARCO TEORICO</b>	
INTRODUCCIÓN	13
INHIBIDORES DE CALCINEURINA	15
NEFROTOXICIDAD	19
ALDOSTERONA	22
ALDOSTERONA EN LA NEFROTOXICIDAD POR CSA	24
SINTASA DE ALDOSTERONA	26
ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS EN ENFERMEDADES	27
POLIMORFISMOS DE SINTASA DE ALDOSTERONA	32
POLIMORFISMOS DEL SRA Y TRASPLANTE RENAL	34
<b>CAPITULO II. DISEÑO DEL ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
JUSTIFICACIÓN	36
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
HIPÓTESIS	
HIPÓTESIS NULA	37
HIPÓTESIS ALTERNA	37
OBJETIVOS	
OBJETIVO PRIMARIO	38
OBJETIVOS SECUNDARIOS	38
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
DISEÑO DEL ESTUDIO	39
POBLACIÓN DE ESTUDIO	
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	40
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	41
VARIABLES Y MEDICIONES	
Variables clínicas	42
Variables bioquímicas	43
Variables genéticas	44
Variables histológicas	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
CONSIDERACIONES ETICAS Y ECONÓMICAS	47
DIAGRAMA DE FLUJO	49
PROCEDIMIENTOS	50
CONSENTIMIENTO INFORMADO	52

### **CAPITULO III. RESULTADOS**

RESULTADOS	54
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	78
LIMITANTES	78
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>79</b>
<b>APENDICES</b>	<b>84</b>

**ABREVIATURAS**

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

AH: Arteriopatía hialina

AP-1: Proteína activada 1

AT1-R: Receptores de angiotensina 1

ATPasa: Adenosintrifosfatasa

BR: Biopsia renal

CP: Ciclofilina

CsA: Ciclosporina

CYP11B1: Citocromo P450, familia 11, subfamilia B, polipéptido 1. 11  $\beta$  hidroxilasa

CYP11B2: Citocromo P450, familia 11, subfamilia B, polipéptido 2. Sintasa de aldosterona

EA: Engrosamiento arteriolar

ECA: Enzima convertidora de Angiotensina

ENAC: Canal epitelial de sodio

Fk: Tacrolimus

FDA: Food and Drug Administration

FKBPs: Proteína fijadora de tacrolimus

HSPS: Proteínas de choque térmico

HTA: Hipertensión arterial sistémica

ICN: Inhibidores de calcineurina

I/D: Inserción/Delección

IL-2: Interleucina 2

IP3: Inositol trifosfato

IP3-R: Receptor de inositol trifosfato

JNK: Cinasas terminales JUN NH2

MAPK: Proteína cinasa mitógeno activada

NCI: Nefropatía crónica del injerto

NFAT: Factor nuclear de las células T

NFATc: Factor nuclear de las células T activada

NF $\kappa$  $\beta$ : Factor nuclear kappa beta

OMIN: Online Mendelian Inheritance in Man. Compendio de genes y fenotipos humanos

PKC: Proteína cinasa C

RAR: Relación Aldosterona/Renina

RCT: Receptor de células T

RNA: Ácido ribonucleico

ROMK: Canal epitelial de potasio de la medula renal externa

SF-1: Factor esteroideogénico-1

SRA: Sistema Renina Angiotensina

SNPs: Polimorfismo de un solo nucleótido

STRs: Repeticiones cortas en tandem

TE: Tris-EDTA (Acido etilendiaminotetraacético)

TGF- $\beta$ : Factor transformador de crecimiento  $\beta$

TSC: Transportador Sodio-Cloro

11 $\beta$ -OHSD: Enzima 11  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa 2

**Relación entre los polimorfismos -344 C/T e Int2 W/C del gen que codifica para la Sintasa de Aldosterona y el desarrollo de Nefrotoxicidad por**

## **Inhibidores de Calcineurina en pacientes con Trasplante Renal en el Instituto Nacional de Cardiología “ Ignacio Chávez”.**

### **RESUMEN**

*Introducción:* Los Inhibidores de calcineurina (ICN) han brindado enormes beneficios en el campo de trasplante de órganos sólidos así como en enfermedades autoinmunes, sin embargo, su uso a largo plazo se encuentra limitado por los efectos secundarios como la nefrotoxicidad<sup>(10)</sup>. Estudios recientes sugieren que la Aldosterona juega un papel primordial en la patogénesis de la Nefrotoxicidad por ICN actuando como mediador en la vasoconstricción renal y en la expresión del factor transformador de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ )<sup>(33)</sup>. Otros estudios han evaluado el papel de los polimorfismos del Sistema renina angiotensina (SRA) con la evolución de la función del injerto en pacientes con trasplante renal<sup>(56,57,58)</sup>.

*Objetivo:* Evaluar si los polimorfismos -344 C/T o Int 2WC del gen que codifica para la sintasa de aldosterona (CYP11B2) se asocian con diferente frecuencia y magnitud de nefrotoxicidad por inhibidor de calcineurina (ICN) corroborada por biopsia en una población mexicana de pacientes trasplantados renales

*Hipótesis:* Existe diferencia en la frecuencia de presentación de los polimorfismos del gen que codifica para la sintasa de aldosterona entre los pacientes con trasplante renal que desarrollan nefrotoxicidad por ICN confirmada por biopsia en comparación con pacientes trasplantados de riñón sin nefrotoxicidad mediada por ICN corroborada por biopsia.

*Material y Métodos:* Estudio transversal, de casos y controles, en el cual se incluyeron 79 pacientes trasplantados en tratamiento con ICN y con biopsia renal

del injerto divididos en dos grupos: Grupo A, pacientes con trasplante renal y biopsia de injerto renal descartando Nefrotoxicidad por ICN; Grupo B, pacientes con diagnóstico de Nefrotoxicidad por ICN corroborado por biopsia renal. Se analizaron diferentes variables clínicas y bioquímicas; se determinaron los polimorfismos: -344 T/C e Int 2W/C del gen que codifica para la sintasa de aldosterona en ambos grupos, mediante técnica estándar PCR-RFLP. Se analizaron las biopsias renales mediante microscopía de luz.

*Resultados:* Al analizar las variables al momento de la biopsia renal, los pacientes con nefrotoxicidad (*Grupo B*) tuvieron cifras mayores de presión arterial sistólica y diastólica en comparación con el grupo sin nefrotoxicidad (*Grupo A*):  $140 \pm 26.1$  mmHg vs  $124 \pm 18.6$  mmHg ( $p= 0.011$ ) y  $87 \pm 13.7$  vs  $77 \pm 12.6$  ( $p=0.003$ ), respectivamente. El ácido úrico fue mayor en el *Grupo B* vs el *Grupo A* ( $8.2 \pm 2.3$  vs  $6.7 \pm 1.9$  mg/dL,  $p=0.008$ ). Los niveles de Inhibidor de calcineurina fueron mayores con el genotipo WW del Int 2WC ( $10.4 \pm 5.3$  vs  $6.4 \pm 4.3$  ng/ml,  $p = 0.02$ ). Se encontró mayor grado de fibrosis intersticial con el genotipo CC del Int 2 WC ( $p=0.03$ ). No hubo diferencia significativa al comparar los niveles de aldosterona ni los genotipos presentes entre ambos grupos, que pudieran identificar genotipos de riesgo para nefrotoxicidad por ICN.

*Conclusión:* Este estudio sugiere que no existe una asociación entre los polimorfismos del gen de la sintasa de aldosterona y el desarrollo de Nefrotoxicidad por ICN. Se encontró una asociación entre el genotipo CC del Int 2 W/C con un mayor grado de fibrosis intersicial; así como mayores niveles séricos de inhibidor de calcineurina con el genotipo WW del mismo polimorfismo.

En futuros estudios podría realizarse un seguimiento estricto en busca de asociación del genotipo CC del polimorfismo Int 2 W/C con menor sobrevida del injerto a largo plazo. Este estudio sugiere que el papel que juega la Aldosterona en la Nefrotoxicidad por ICN, no parece ser dependiente de los polimorfismos de la sintasa de aldosterona.

## CAPITULO I

### MARCO TEÓRICO

#### INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 25 años se han generado grandes avances en materia de trasplante renal, histocompatibilidad e inmunosupresión mejorando la sobrevida a corto plazo del injerto renal y de los pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a trasplante<sup>(1)</sup>. Los cambios en la terapia inmunosupresora han logrado disminuir la incidencia de rechazo y disfunción aguda del injerto reportando la sobrevida actual del injerto a 1 año del 85 % en donador con muerte encefálica y a 95 % en trasplante de donador vivo<sup>(2)</sup>. Sin embargo, los múltiples factores que contribuyen a la nefropatía crónica del injerto (NCI), causan un gran impacto en la sobrevida del injerto a largo plazo.

Durante el primer año, la disfunción aguda del injerto puede presentarse por causas inmunológicas como rechazo agudo y causas no inmunológicas que incluyen complicaciones de la técnica quirúrgica, complicaciones urológicas, obstrucción, necrosis de uréter, trombosis del injerto por estados procoagulantes previos o asociado a la técnica quirúrgica y toxicidad por inhibidores de calcineurina. Posterior al segundo año, intervienen múltiples factores que contribuyen al desarrollo de la NCI<sup>(2)</sup>.

La NCI es un fenómeno complejo causado por la enfermedad renal subyacente, así como por factores genéticos y/o ambientales sobreimpuestos. Se

caracteriza por una pérdida progresiva de la función del injerto renal en combinación con hipertensión y proteinuria que inician meses o años posterior al trasplante. Es considerada una causa importante de pérdida a largo plazo de la función del injerto<sup>(3,4)</sup>. La identificación de los factores de riesgo que puedan mejorar la sobrevida del injerto, es una prioridad en las investigaciones de trasplante renal. En la NCI se ha demostrado que influyen factores tanto inmunológicos como no inmunológicos, la distinción entre estos dos grupos de factores de riesgo es conveniente, sin embargo pueden coexistir y los eventos tempranos pueden predisponer a eventos de aparición tardía<sup>(5)</sup>.

Aún cuando los factores inmunológicos constituyen una causa importante de pérdida del injerto, los factores no inmunológicos como hipertensión (HTA), dislipidemia y la nefrotoxicidad crónica por el uso de inhibidores de calcineurina juegan un papel importante en el desarrollo de NCI<sup>(5)</sup>.

## **INHIBIDORES DE CALCINEURINA**

En noviembre de 1983, aproximadamente 13 años después de haber sido obtenida por primera vez del hongo *tolypocladium inflatum*, es aprobada por la *Food and Drug Administration*(FDA) el primero de los medicamentos conocidos

como inhibidores de calcineurina (ICN), la Ciclosporina (CsA), con peso molecular de 1202 D, endecapeptido cíclico, altamente hidrofóbico, para ser utilizada como piedra angular en la terapia inmunosupresora en trasplante renal<sup>(6)</sup>. Los primeros estudios en trasplante renal mostraron incremento en la sobrevida del injerto a 1 año entre 70%-80% y Tilney y cols reportaron un incremento en la sobrevida del injerto renal de 48% a 76% a 2 años postrasplante<sup>(7)</sup>. Posteriormente Kino y cols en 1984 descubren un potente inmunosupresor producido por *Streptomyces tsukubaensis*, un hongo del suelo, el cual nombran Tacrolimus (Fk), con un peso molecular de 804 D, antibiótico macrólido lactona. En 1987 se publica el primer reporte de trasplante experimental y finalmente en 1994, aproximadamente una década después de la ciclosporina, es aprobado por la FDA el tacrolimus, inicialmente en el trasplante hepático y posteriormente en cualquier tipo de trasplante de órgano sólido<sup>(6)</sup>.

## **CALCINEURINA**

La calcineurina es una enzima de tipo fosfatasa serina/treonina dependiente de calcio y de ubicua presencia, perteneciente a la familia de las fosfatasas proteínicas. La estructura bioquímica de la calcineurina consta de 2 subunidades: la subunidad A representa el sitio activo y consta de los dominios catalíticos y regulador, este último se encuentra hacia el lado carboxiterminal, el cual, a su vez se subdivide en los dominios de unión con calcineurina B, unión con calmodulina y dominio autoregulador; el cual sirve como inhibidor de la enzima en ausencia de calmodulina. La importancia de la subunidad B radica en ser el sitio donde se une

el calcio, la subunidad B tiene 4 estructuras que tienen la capacidad de fijar cuatro moléculas de calcio<sup>(8)</sup>.

Dada su presencia ubicua, dicha enzima se encuentra en prácticamente todos los tejidos, sin embargo sus funciones en el sistema inmunológico han sido estudiadas profundamente y tiene especial relevancia principalmente en el campo de trasplante de órganos. La calcineurina se encarga de la regulación de la transcripción del factor de crecimiento de células T, la Interleucina 2 (IL-2), a través del siguiente mecanismo: el complejo antígeno/complejo mayor de histocompatibilidad se une al receptor de células T (RCT) y activa la cascada de señalización, la cual genera inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y activación de su receptor (IP<sub>3</sub>R) en el retículo endoplásmico. Posteriormente se produce liberación de calcio del retículo endoplásmico, lo cual produce activación de canales de calcio de membrana, ocasionando incremento del calcio intracelular. La calcineurina forma un complejo con calmodulina y calcio (forma activa de la enzima) y defosforila al factor nuclear de las células T activadas (NFATc). Dicho factor se transloca al núcleo donde puede unirse a otros factores nucleares como la proteína activada 1 (AP-1), el factor nuclear kappa beta (NFκβ); o puede actuar de manera independiente, generando como resultado final la transcripción de genes que codifican para interleucina 2 (IL-2), la cual, tiene la capacidad de ocasionar diferenciación y proliferación de células T<sup>(9)</sup> (*Figura 1*).

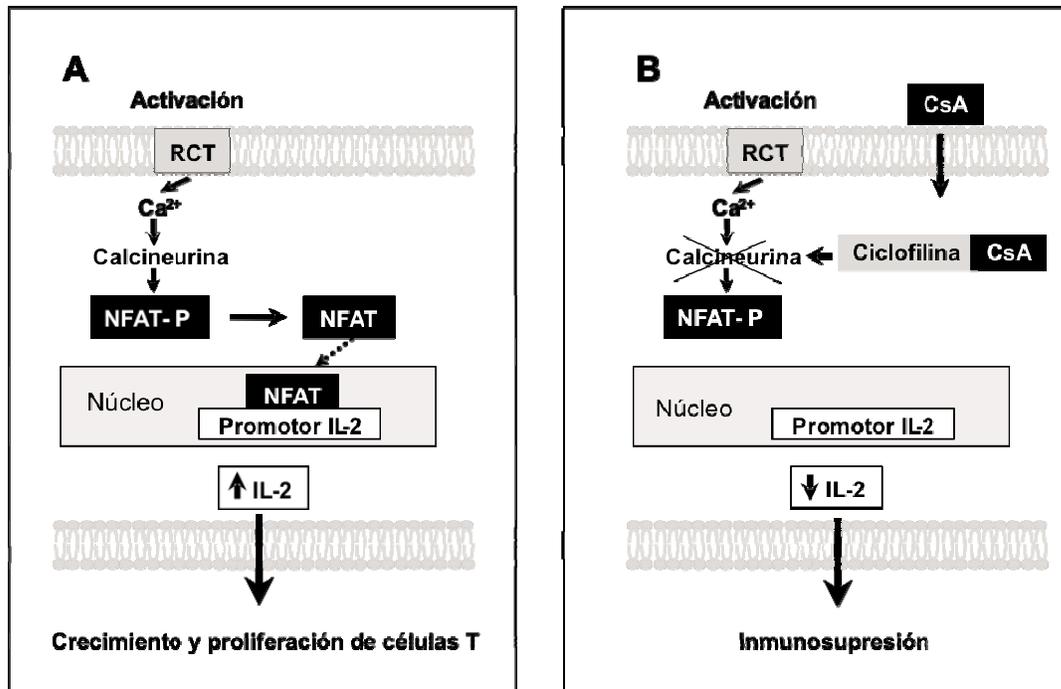
Los inhibidores de calcineurina actúan mediante mecanismos de acción dependientes e independientes de calcineurina<sup>(6)</sup>.

## **MECANISMOS DEPENDIENTES DE CALCINEURINA**

Los inhibidores de calcineurina ejercen su acción uniéndose a las llamadas inmunofilinas con lo cual aumentan su afinidad por la calcineurina, en el caso de la ciclosporina es la ciclofilina (CP) y en el caso del tacrolimus es la proteína fijadora de tacrolimus (FKBPs). El complejo formado por la inmunofilina y la droga se asocia a la calcineurina activada, inhibiéndola y evitando la defosforilación del NFATc y la cascada de eventos subsecuentes<sup>(6)</sup>.

## **MECANISMOS INDEPENDIENTES DE CALCINEURINA**

La activación transcripcional del gen de IL-2, requiere de la interacción de muchos factores de transcripción, entre ellos AP-1, NF $\kappa$ B y NFAT. Las vías de señalización JNK y p38, pertenecientes a la superfamilia MAPK (proteín-quinasa mitogén-activada), se activan principalmente en respuesta al estrés, sin embargo se ha demostrado que ambas vías se disparan cuando las células T se activan mediante el receptor de células T o el receptor coestimulador CD28. Estas vías llevan a la activación de factor nuclear AP-1 ocasionando la activación transcripcional de IL-2. Esta vía de señalización también puede ser inhibida mediante los inhibidores de calcineurina<sup>(6)</sup>.



**Figura 1.-** Mecanismo de acción de inhibidores de calcineurina. Receptor de células T (RCT), factor activador nuclear de la transcripción de células T desfosforilado (NFAT) y fosforilado (NFAT-P), Interleucina 2 (IL-2).

## NEFROTOXICIDAD

Son enormes los beneficios de los inhibidores de calcineurina tanto en el campo de trasplante de órganos sólidos así como en enfermedades autoinmunes, sin embargo, el uso a largo plazo se encuentra limitado por sus efectos secundarios tales como disfunción renal aguda y crónica, hipertensión, desórdenes electrolíticos (hiperkalemia, hipomagnesemia e hipocalcemia),

acidosis tubular, síndrome urémico hemolítico e incapacidad para concentrar la orina. La nefrotoxicidad es el efecto adverso más frecuente y de mayor relevancia desde el punto de vista clínico<sup>(10)</sup>. En un estudio recientemente publicado en el *New England Journal of Medicine*, *Nankivell y cols.* mostraron que después de 10 años de tratamiento con inhibidores de calcineurina, 100% de los pacientes trasplantados presentan nefrotoxicidad<sup>(11)</sup>.

Se han descrito dos formas de nefrotoxicidad: la aguda o moderada y la crónica o severa, las cuales dependen del tiempo de administración del fármaco, así como de la dosis utilizada. Se ha observado que la nefrotoxicidad aguda es reversible al disminuir la dosis de ICN o suspender el fármaco; sin embargo, esto puede conducir al rechazo del injerto. En cambio, la nefrotoxicidad crónica, se desarrolla con el tratamiento a largo plazo con ICN y se caracteriza por la presencia de lesiones estructurales en el tejido renal como son la arteriopatía y fibrosis túbulointersticial, siendo esta última irreversible<sup>(12,13)</sup>.

## **MECANISMOS DE NEFROTOXICIDAD AGUDA**

La nefrotoxicidad aguda se caracteriza por vasoconstricción arteriolar aferente y eferente. El predominio de la vasoconstricción preglomerular causa reducción en el flujo plasmático renal y en la filtración glomerular, lo cual es reversible y dependiente de la dosis. Entre los mecanismos involucrados se encuentra la activación del sistema simpático, del sistema renina angiotensina (SRA), endotelina, tromboxano A<sub>2</sub> y prostaglandinas<sup>(14,15)</sup>. Existe sobreproducción en la liberación de estos agentes vasoactivos, lo cual origina un desequilibrio entre

sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras como prostaciclina y óxido nítrico<sup>(16)</sup>.

Estudios in vivo e in vitro han mostrado que la CsA aumenta la formación de radicales libres que se inducen durante el fenómeno de hipoxia, la cual se presenta como consecuencia de la vasoconstricción renal inducida por CsA. También se ha sugerido que este inmunosupresor altera el microambiente celular e induce en forma directa estrés celular<sup>(17)</sup>.

## **MECANISMOS DE NEFROTOXICIDAD CRÓNICA**

Se han propuesto al menos tres factores importantes que intervienen en las alteraciones estructurales de la nefrotoxicidad crónica por ICN:

1. Activación del Sistema Renina Angiotensina. El SRA juega un papel crucial en el daño estructural secundario a toxicidad crónica por inhibidores de calcineurina, en el cual, la angiotensina II a través de los receptores de angiotensina 1 (AT1-R) no sólo participa en la vasoconstricción renal, sino que también promueve procesos fibróticos, así como la liberación de aldosterona<sup>(7,12)</sup>.
2. Hipoxia. Al igual que en la nefrotoxicidad aguda, en la crónica se presenta mayor vasoconstricción renal y por lo tanto, mayor grado de hipoxia, lo que trae como consecuencia la formación de radicales libres que inducen daño celular y promueven apoptosis, provocando mayor daño tisular<sup>(18)</sup>.
3. Sobreexpresión del factor de transformador de crecimiento beta (TGF $\beta$ ). Una de las principales vías sobrerreguladas ya sea dependiente o independiente de

angiotensina II es la del TGF- $\beta$ , el cual favorece fibrosis renal a través de la inducción de proteínas de matriz extracelular como colágena y fibronectina, produciendo un desequilibrio entre la producción de matriz extracelular y la degradación de la misma, a favor de la sobreproducción. La Osteopontina también se encuentra involucrada de manera importante en los mecanismos de fibrosis en la nefrotoxicidad crónica así como en la quimioatracción de macrófagos hacia el túbulointersticio<sup>(19,20)</sup>.

## **ALDOSTERONA**

La aldosterona se produce en la zona glomerular de las glándulas suprarrenales, siendo su precursor el colesterol. Después de una serie de reacciones, finalmente es sintetizada a partir de la desoxicorticosterona por la acción de la enzima mitocondrial P<sub>450</sub>C11 (CYP11B2) también llamada aldosterona sintasa. La aldosterona es un mineralocorticoide cuya función principal es el mantenimiento del volumen extracelular a través del aumento de la reabsorción de sal y la secreción de potasio en el túbulo distal y colector. Debido a la solubilidad de la aldosterona en los lípidos, ésta difunde fácilmente al interior de las células donde interactúa con el receptor mineralocorticoide, a esta acción se le conoce como “efecto genómico” de la aldosterona. La mayoría de las acciones conocidas de la aldosterona, tanto en células epiteliales como no epiteliales, son

mediadas a través de la activación de los receptores mineralocorticoides, los cuales son capaces de regular la expresión y transcripción de diversos genes<sup>(21)</sup>. Una vez que el complejo aldosterona-receptor viaja al núcleo, se une a diferentes regiones promotoras de diversos genes que contienen elementos de respuesta a mineralocorticoides<sup>(22)</sup>. Los principales genes regulados por la aldosterona son los que codifican para el transportador sodio-cloro (TSC), subunidad alfa del canal epitelial de sodio (ENaC), canal epitelial de potasio (ROMK) y ATPasa sodio-potasio, localizados en el túbulo distal y en el túbulo colector<sup>(24,25)</sup>. Además de la presencia de los receptores mineralocorticoides en el túbulo distal y colector, éstos también se encuentran en miocitos, cerebro y endotelio vascular<sup>(26)</sup>.

Los glucocorticoides y mineralocorticoides tienen la misma afinidad por los receptores de aldosterona, los primeros son más abundantes que los segundos, por lo que la especificidad para que la aldosterona se una a su receptor es mediada por la presencia de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -OHSD), que degrada a los glucocorticoides permitiendo que sólo la aldosterona se una a su receptor; por lo tanto, la presencia de esta enzima es esencial para que la aldosterona realice sus efectos<sup>(21)</sup>. En el tejido renal, esta enzima se encuentra principalmente en el epitelio del túbulo distal y colector, pero también se ha observado en el epitelio y endotelio glomerular. La presencia de la sintasa de aldosterona en diferentes tejidos, sugieren que ejerce acciones locales en diversos órganos independientes de su acción clásica conocida<sup>(22)</sup>. En líneas celulares de leucocitos mononucleares humanos, células del músculo liso vascular y cardiomiocitos, se ha observado que la aldosterona puede producir acciones

rápidas que se caracterizan por aumento en los niveles de inositol trifosfato (IP3) y calcio intracelular, así como disminución de la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y la activación de la bomba NaK/ATPasa<sup>(27)</sup>, por lo que se ha propuesto que la aldosterona ejerce efectos directos sin modificar la transcripción de genes, lo que se ha denominado “efectos no genómicos” de la aldosterona, que parecen ser mediados por receptores de membrana aún no identificados<sup>(28)</sup>.

Desde el punto de vista renal, recientemente se reportó que la infusión de aldosterona en ratas normales induce sobreexpresión de TGFβ<sup>(29,30)</sup>, lo que sugiere que esta hormona podría participar en procesos fibróticos intrarrenales. Asimismo, en ratas espontáneamente hipertensas que desarrollan nefropatía maligna, *Rocha y cols.* mostraron que la inhibición selectiva de aldosterona previene la aparición de proteinuria y el desarrollo de glomeruloesclerosis<sup>(31)</sup>.

### **ALDOSTERONA EN LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CSA**

La nefrotoxicidad por CsA es acompañada por la activación del sistema renina angiotensina, de manera simultánea, en esta nefropatía se produce aumento en la expresión de TGFβ, factor que parece ser regulado por la aldosterona.

En un estudio reciente se evaluó el papel de la aldosterona en el desarrollo de nefrotoxicidad por CsA en ratas<sup>(32)</sup>. El primer hallazgo fue que la supervivencia a 21 días de los animales a los que se les indujo nefrotoxicidad crónica por CsA aumentó de manera espectacular cuando se bloquearon los receptores de aldosterona con espironolactona. A nivel renal, los principales cambios

histológicos que observaron en este modelo fueron la arteriopatía y la fibrosis túbulointersticial<sup>(32)</sup>.

Con el objetivo de conocer los mecanismos responsables del efecto protector de espironolactona sobre las alteraciones estructurales inducidas por CsA, se ha evaluado la expresión génica de TGF $\beta$ , fibronectina, colágena I y IV por análisis de Northern blot. La nefrotoxicidad crónica por CsA se asoció con sobrerregulación de estas proteínas, efecto que fué completamente revertido con el bloqueo de los receptores de aldosterona, sugiriendo que la expresión de TGF $\beta$  es regulada por esta hormona mineralocorticoide<sup>(22)</sup>.

Otro hallazgo particularmente interesante es el efecto que ejerció la espironolactona sobre la función renal. La administración crónica de CsA produce disminución significativa de la función renal, en cambio, la inhibición selectiva de los receptores de aldosterona con espironolactona previno completamente la disminución de la función renal en las ratas tratadas simultáneamente con CsA<sup>(32)</sup>. Los resultados sugieren que la disfunción renal crónica inducida por CsA es mediada en buena parte por la aldosterona, ya que la espironolactona protege al riñón de las alteraciones hemodinámicas inducidas por este inmunosupresor. Estudios preliminares muestran que el bloqueo de aldosterona también previene la nefrotoxicidad aguda por CsA, lo que se asoció con normalización del flujo sanguíneo renal<sup>(23)</sup>.

Con lo anteriormente expuesto, los mecanismos por los cuales la aldosterona pudiera intervenir en la nefrotoxicidad crónica por ICN son: a)

regulación del tono vascular (actuando como agente vasoactivo y promoviendo la liberación de factores vasoconstrictores) provocando disminución del flujo sanguíneo renal y del filtrado glomerular; b) contribución al desarrollo de fibrosis por aumentar la formación de radicales libres e inducir la expresión de TGF $\beta$ , una importante citocina profibrótica, que promueve el depósito de proteínas de matriz extracelular<sup>(33)</sup>.

### **SINTASA DE ALDOSTERONA (CYP11B2)**

El gen CYP11B2 codifica para la enzima esteroide 11/18-beta-hidroxilasa (sintasa de aldosterona), la cual funciona a nivel mitocondrial en la zona glomerular de la corteza suprarrenal para sintetizar aldosterona. Este gen tiene gran similitud con el CYP11B1, gen que codifica para la enzima 11-beta-hidroxilasa, la cual es responsable de la síntesis de cortisol. Los cambios en su actividad, se relacionan con la síntesis de metabolitos esteroideos con actividad mineralocorticoide. Ambos genes (CYP11B1, CYP11B2) se encuentran en el cromosoma 8q24 (OMIN).<sup>(34,35)</sup>

La presencia de variaciones en el gen de la sintasa de aldosterona (CYP11B2) puede tener influencia en la actividad de la Aldosterona. En investigaciones sobre las formas monogénicas de hipertensión en modelos animales, se han estudiado los cambios en la expresión y actividad de esta enzima, observando una relación con las alteraciones en la homeostasis del sodio y la expresión de hipertensión debido a los defectos en el metabolismo de los mineralocorticoides. Con estos argumentos, puede concluirse que el gen

CYP11B2 es candidato para estudios genéticos de asociación con hipertensión<sup>(36,37)</sup>.

## **ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS EN ENFERMEDADES**

Actualmente se encuentran disponibles una gran variedad de estrategias para identificar los factores genéticos involucrados en las enfermedades mendelianas y complejas. El análisis de ligamiento y los estudios de asociación, son dos métodos analíticos complementarios utilizados para detectar tanto las regiones genéticas específicas como genes que están involucrados en el desarrollo de alguna enfermedad. Los estudios de asociación son los que ofrecen una excelente herramienta metodológica para identificar alelos de susceptibilidad, los cuales, tienen poca contribución genética a la enfermedad, pero cada uno de los genes candidatos presentan una susceptibilidad en la etiología de la misma y sólo cuando la interacción de los genes es aditiva es cuando se presenta la enfermedad. Los estudios de asociación a diferencia de los de ligamiento generalmente no dan una asociación causal, pero si contribuyen en la búsqueda de genes con poco efecto genotípico de las enfermedades, por lo tanto estos estudios dan un riesgo relativo del alelo que está siendo analizado con respecto a la enfermedad<sup>(38)</sup>. Los estudios de asociación son los que han identificado algunos de los genes que se han reportado involucrados en patologías como la hipertensión arterial sistémica esencial, así como enfermedades que cursan con remodelamiento cardiaco (cardiopatía isquémica) y fibrosis a nivel renal

(nefropatía diabética y diversas glomerulopatías), aunque mucho de esto depende de la geografía y etnicidad de cada población<sup>(40)</sup>.

## **ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN ALÉLICA**

A diferencia de los análisis de ligamiento, los cuales escanean todo el genoma o una región grande del mismo, los estudios de asociación se emplean para estudiar pequeñas regiones y/o segmentos del genoma. Este tipo de estudios han dado resultados excelentes para identificar genes ubicados en las regiones genómicas que han dado ligamiento en diversas enfermedades. Con estos estudios se pueden identificar regiones cromosómicas pequeñas, además de genes de pequeño efecto en la enfermedad. Este tipo de diseño se puede realizar en: a) casos y controles y b) basados en familias; padres e hijos afectados o pares de hermanos afectados. En el primer caso se analizan enfermos (casos) e individuos sanos (controles) no relacionados y se compara la frecuencia de marcadores polimórficos en ambos individuos. Si la frecuencia del alelo específico del marcador se encuentra en mayor frecuencia en los casos que en los controles, con un poder estadístico mayor a 0.8 entonces decimos que el marcador está asociado a la enfermedad. El hecho de que haya una asociación entre un marcador y una enfermedad generalmente se toma como evidencia preliminar de ligamiento entre el marcador y el locus que causa la enfermedad<sup>(40)</sup>.

## **CAUSAS DE ASOCIACIÓN**

Se conoce que la asociación se puede deber por: a) Efecto directo del marcador alélico en estudio; en algunas ocasiones el polimorfismo estudiado en

ciertas enfermedades es la causa directa de asociación por estar involucrado en la susceptibilidad de la enfermedad. b) Desequilibrio de ligamiento; la asociación puede no ser debida al polimorfismo que se está estudiando, sino a otro polimorfismo que esté cercano a él, el cual es el verdadero causante de la susceptibilidad. c) Estratificación poblacional; muchas poblaciones presentan subgrupos que no se mezclan, esto puede condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían ser más comunes entre los individuos de los subgrupos. Cuando se presenta este fenómeno los estudios pueden dar falsos positivos o falsos negativos<sup>(40)</sup>.

## **EL GENOMA HUMANO Y LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN**

Gracias a la secuenciación completa del genoma humano se pudo conocer la distribución exacta de los genes en los cromosomas<sup>(41)</sup>, también se conocieron las variantes más comunes en el genoma. Las dos variantes más comunes son los repetidos cortos en tándem (STRs) o microsatélites y los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (*Figura 2*), de hecho dos individuos cualquiera comparten el 99.9% de su genoma, el 0.01% restante representa la variabilidad de cada individuo.

Los SNPs son una herramienta cada vez más importante para el estudio de la estructura e historia de nuestro genoma<sup>(42)</sup>. El uso más común de SNPs es para los estudios de asociación, que buscan una asociación estadística entre los alelos y los fenotipos (generalmente enfermedades), para establecer claramente a genes candidatos causantes de la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad<sup>(43)</sup>.

Los SNPs se han encontrado distribuidos a través de todo el genoma humano, ésto ha resultado en grandes avances en la determinación de marcadores polimórficos en las enfermedades comunes, de hecho, actualmente los SNPs son los mejores marcadores para realizar análisis de asociación.

Los polimorfismos son variaciones normales en el ADN que se transmiten de forma mendeliana y se encuentran en la población con una frecuencia mayor al 1 %, su distribución en el genoma es amplia y gracias a ellos se han realizado mapas físicos de alta resolución<sup>(44)</sup>. Se estima que los SNPs se encuentran aproximadamente cada 500 bases o menos, lo cual lleva a que se proponga un número mayor a los 7.7 millones reportados por Riva<sup>(43)</sup>, de hecho, se calcula que existen entre 10 y 20 millones de SNPs distribuidos a través de todo el genoma<sup>(45)</sup>.

## **IMPORTANCIA DE LOS SNPS EN LOS ESTUDIOS GENÉTICOS**

La importancia de los estudios genéticos con SNPs se debe a lo siguiente:

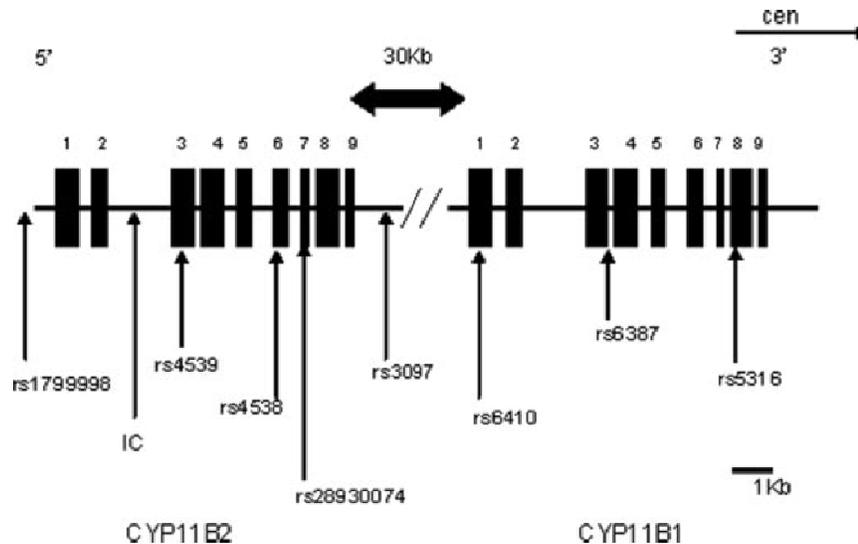
a) Muchos SNPs son heredados de forma mendeliana de una generación a otra, de esta manera se puede estudiar la evolución de las especies y además de las poblaciones<sup>(44)</sup>; b) Los SNPs pueden ser los responsables de causar enfermedades ya que pueden alterar de la secuencia de ADN en una región codificante o reguladora. Los SNPs no sinónimos, han sido implicados en diversas enfermedades porque pueden alterar la función de la proteína, su estabilidad, sitios de corte y empalme<sup>(44,46)</sup>; c) Finalmente los SNPs se pueden emplear para los estudios de ligamiento y asociación<sup>(47)</sup>. Estos marcadores presentan algunas características importantes: la mayoría de ellos son bialélicos, son muy abundantes en el genoma, tienen baja tasa de mutación, son fáciles de genotipar

con medios automatizados y no se requiere de una gran cantidad de ADN para su análisis<sup>(48)</sup>. Los SNPs se pueden localizar en cualquier zona del genoma. Su importancia fenotípica dependerá de la localización del SNP.

**Figura 2.-** Ejemplo de polimorfismo.

### **POLIMORFISMOS DE LA SINTASA DE ALDOSTERONA**

Hasta este momento, se han estudiado 3 variantes polimórficas del gen que codifica para la sintasa de aldosterona<sup>(35,37)</sup>, siendo identificados como posibles determinantes en el desarrollo de hipertensión esencial<sup>(35,49)</sup> (*Figura 3*).



**Figura 3.-** Representación de los genes CYP11B1 y CYP11B2 y los polimorfismos identificados. La numeración progresiva superior corresponde a los exones.

El primero, corresponde al polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) denominado -344 C/T SF-1 (rs1799998), el cual corresponde al cambio de Citosina/Timina en la posición -344, alterando el sitio de unión para el factor esteroideogénico 1 (SF-1) de la región transcripcional promotora 5'. Se piensa que ese cambio altera la sensibilidad del gen CYP11B2 a la angiotensina II, provocando una producción inapropiadamente alta de aldosterona para los niveles de renina<sup>(49)</sup>. La gran mayoría de los estudios han reportado asociación entre el alelo -344 T con un incremento en el riesgo de desarrollar hipertensión, encontrando la presencia del mismo, en sujetos con hipertensión e incremento en la tasa de excreción urinaria de aldosterona<sup>(49,50)</sup>. Un meta-análisis publicado en *J Hypertension en el año 2007*, reportó que el alelo -344 T tiene mayor riesgo de desarrollar hipertensión (17%) que el alelo C, encontrando también mayor actividad plasmática de la renina, sin embargo no hubo diferencia

estadísticamente significativa con respecto a los niveles de aldosterona<sup>(50)</sup>. Algunos han evaluado el impacto del polimorfismo -344 T/C con la severidad de la hipertensión o con la pobre respuesta al tratamiento antihipertensivo<sup>(51,52)</sup>. Finalmente, otros autores han identificado al alelo -344 T como un marcador genético de hipertensión hiporreninémica<sup>(52)</sup>.

El segundo polimorfismo, se denomina Int2 W/C, que involucra la conversión del intrón 2 de la sintasa de aldosterona(CYP11B2), el cual, es parcialmente reemplazado por el intrón correspondiente al gen de la enzima CYP11B1. Su estudio se ha asociado con hipertensión y niveles incrementados de la relación aldosterona-renina<sup>(35,53)</sup>.

El tercer polimorfismo, es una mutación puntual (K173R) del exon 3 (rs4539) de la sintasa de aldosterona<sup>(35)</sup>.

## **POLIMORFISMOS DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA Y TRASPLANTE RENAL**

Dada la importancia del SRA en la aparición de lesión a nivel renal así como en la progresión del deterioro de la función renal en diversas patologías, se han estudiado las diversas variantes polimórficas de este sistema en relación al trasplante renal. *Broekroelofs* y *cols* encontraron que el alelo D se asocia a pérdida más temprana del injerto renal en pacientes con alto riesgo, ésto, en

comparación con el alelo I<sup>(56)</sup>. Otro estudio investigó los efectos del angiotensinógeno, enzima convertidora de angiotensina, receptor de angiotensina 1 y de la sintasa de aldosterona (CYP11B2) en la función renal; encontrando que la pérdida de la función renal se asocia de manera muy importante con el polimorfismo -344 T/C de la sintasa de aldosterona y no con el resto de las variantes polimórficas<sup>(55)</sup>. Los polimorfismos inserción/delección (I/D) de la ECA y MM en angiotensinógeno, también se han asociado a nefropatía crónica del injerto, sin embargo, *Slowinski y cols* no encontraron asociación entre los polimorfismos I/D de la ECA, 1166A-C del receptor de angiotensina tipo 1 y M235T de angiotensinógeno con la función del injerto a 2 años postrasplante<sup>(57)</sup>. *Zhang y cols* encontraron mayor riesgo de desarrollar rechazo agudo túbulointersticial en pacientes con los genotipos DD de la ECA y CC del receptor de angiotensina, estableciendo el papel importante de este sistema en mecanismos tanto inmunológicos como no inmunológicos<sup>(58)</sup>.

Es importante recalcar que los estudios de polimorfismos han sido realizados principalmente en poblaciones caucásicas y orientales y sólo unos pocos han sido llevados a cabo en poblaciones americanas, tanto mestizas como indígenas<sup>(59,60)</sup>. La población mexicana constituye un grupo étnico que ha sido estudiado desde el punto de vista genético utilizando una cantidad importante de marcadores ubicados en diversos cromosomas. Dichos estudios establecen que nuestra población esta constituida por 56% de genes indígenas, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides<sup>(54)</sup>. Debido a esta mezcla genética, los estudios reportados en otros grupos étnicos no son aplicables a la población

mexicana, por lo que es de gran importancia el determinar las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población y establecer su papel como marcador genético de susceptibilidad.

Actualmente no existe un estudio en el cual se haya analizado la relación entre las variantes polimórficas de la sintasa de aldosterona y el desarrollo de nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina.

## CAPITULO II

### DISEÑO DEL ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS

#### JUSTIFICACIÓN

Pese al gran avance en la sobrevida tanto de los pacientes como de los injertos renales logrado desde el inicio de la era de los inhibidores de calcineurina, las complicaciones tanto agudas como crónicas de dichos inmunosupresores continúan siendo factores que impactan directamente en la función renal así como en la aparición de lesiones estructurales renales que influyen en la sobrevida del injerto.

La aldosterona ha sido propuesta como factor fundamental en el desarrollo de la toxicidad por los inhibidores de calcineurina; en la actualidad se sabe que diversos polimorfismos de la sintasa de aldosterona ocasionan incremento en los niveles de aldosterona plasmática o de la relación aldosterona-renina, expresándose fenotípicamente con hipertensión o mayor predisposición a deterioro en enfermedades que cursan con incremento en las vías fisiopatológicas de fibrosis, como cardiopatía isquémica, hipertrofia ventricular izquierda y nefropatías de diversas etiologías.

Actualmente no existe un estudio en el cual se haya analizado la relación entre las variantes polimórficas de la sintasa de aldosterona y el desarrollo de nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina, por lo que consideramos valioso poder conocer si existe o no asociación.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe asociación entre el polimorfismo -344 T/C o Int 2 W/C del gen que codifica para la sintasa de aldosterona (CYP11B2) con una mayor frecuencia y magnitud de la nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina?

## **HIPÓTESIS NULA**

No existe diferencia en la frecuencia de presentación de los polimorfismos del gen que codifica para la sintasa de aldosterona entre los pacientes con trasplante renal que desarrollan nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina confirmada por biopsia en comparación con pacientes trasplantados de riñón sin nefrotoxicidad mediada por inhibidor de calcineurina corroborada por biopsia.

## **HIPÓTESIS ALTERNA**

Existe diferencia en la frecuencia de presentación de los polimorfismos del gen que codifica para la sintasa de aldosterona entre los pacientes con trasplante renal que desarrollan nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina confirmada por biopsia en comparación con pacientes trasplantados de riñón sin nefrotoxicidad mediada por inhibidor de calcineurina corroborada por biopsia.

## **OBJETIVO PRIMARIO**

Evaluar si los polimorfismos -344 T/C o Int 2 W/C del gen que codifica para la sintasa de aldosterona (CYP11B2) se asocian con diferente frecuencia y

magnitud de nefrotoxicidad por inhibidor de calcineurina corroborada por biopsia en una población mexicana de pacientes trasplantados renales.

## **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Evaluar la posible asociación entre los polimorfismos de la sintasa de aldosterona con la sobrevida del injerto.

Evaluar si existe asociación de los polimorfismos de la sintasa de aldosterona con el desarrollo de hipertensión arterial postrasplante.

Evaluar la correlación entre la presencia de polimorfismos de sintasa de aldosterona y los niveles séricos de aldosterona.

## **METODOLOGÍA**

### **TIPO DE ESTUDIO**

Según la clasificación de Kleinbaum desde el punto de vista de direccionalidad (*secuencia de observación entre exposición y enfermedad*) se trata de un estudio no direccional o TRANSVERSAL y desde el punto de vista de temporalidad (*relación cronológica entre el inicio del estudio y la ocurrencia de exposición o enfermedad*) corresponde a un estudio de CASOS Y CONTROLES.

## **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

### **POBLACIÓN OBJETIVO.**

Todos los pacientes con trasplante renal del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, registrados entre enero del 2000 hasta Diciembre del 2009.

### **POBLACIÓN ELEGIBLE**

Pacientes con trasplante renal y biopsia del injerto renal realizada de acuerdo con las guías del departamento de nefrología. En el primer grupo se incluyeron aquéllos pacientes con diagnóstico histológico de nefrotoxicidad por inmunosupresores; en el segundo grupo se incluyeron pacientes a quienes se descartó por biopsia el diagnóstico de nefrotoxicidad por un inhibidor de calcineurina (tacrolimus o ciclosporina); en ambos grupos se eligieron pacientes que aceptaron participar en el estudio previa firma del consentimiento informado.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se incluyeron pacientes con IRC en sustitución con trasplante renal pertenecientes al servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, que reunieron las siguientes condiciones:

- 1.-Pacientes con Insuficiencia renal de cualquier etiología con trasplante renal de donador cadavérico o vivo, mayores de 18 años de edad, de cualquier sexo.
- 2.-Pacientes en tratamiento con Inhibidores de calcineurina (Tacrolimus o Ciclosporina).
- 3.-Pacientes con diagnostico de toxicidad por Inhibidores de Calcineurina comprobado por biopsia renal.
- 4.- En el grupo control se incluyeron pacientes con trasplante renal con al menos 6 meses de tratamiento inmunosupresor que incluyera un inhibidor de calcineurina, que hubiesen sido sometidos a biopsia del injerto renal de acuerdo con las guías del departamento de nefrología, mediante la cual, se descartó nefrotoxicidad por el medicamento inmunosupresor.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- 1.-Pacientes en tratamiento inmunosupresor que no incluya un inhibidor de calcineurina.
2. Pacientes embarazadas.

3.-Pacientes con insuficiencia renal avanzada del injerto (estadio V) o con pérdida de la función del mismo.

4.-Pacientes con diagnóstico de cáncer.

## **VARIABLES Y MEDICIONES**

### **Variables clínicas**

***Variable potencialmente confusora, numérica continua, de razón.***

Edad (Años)

***Variables potencialmente confusoras, nominales.***

Género (Masculino/Femenino)

Tratamiento Inmunosupresor (Tacrolimus, Ciclosporina)

***Variables independientes, numéricas continuas, de razón.***

Peso (kg).

Talla (m).

Índice de Masa Corporal (IMC)  $\text{kg/m}^2$ .

Presión Arterial Sistólica (mmHg).

Presión Arterial Diastólica (mmHg).

***Variable potencialmente confusora, nominal, categórica.***

Hipertensión arterial postrasplante (mmHg).

\*Se consideró una presión arterial sistólica (PAS) mayor a 140 ó presión arterial diastólica (PAD) mayor a 90 mmHg, en dos o más consultas consecutivas o en caso de que el paciente requiriera medicamentos antihipertensivos en cualquier periodo posterior a la realización del trasplante renal.

**Variables bioquímicas**

***Variables dependientes, numéricas continuas, de razón.***

Creatinina sérica basal (mg/dl).

Creatinina sérica al momento de la biopsia (mg/dl).

Nitrogeno uréico sérico (mg/dl).

Proteinuria de 24 horas (mg/día).

Potasio sérico (mEq/L).

Tasa de Filtración Glomerular (ml/min).

\*Valor reportado en ml/min el cual se obtiene de la fórmula MDRD:

$$FG = 170 \times CrS - 0.999 \times edad - 0.180 \times 1.178(\text{raza negra}) \times 0.755(\text{mujeres}) \times \\ BUN - 0.170 \times albumina + 0.318$$

Niveles de Inhibidor de Calcineurina (ng/ml).

*Para la variable Niveles de Inhibidor de calcineurina, se incluyeron 3 cifras: El nivel de inmunosupresor 1 mes previo a la biopsia, al momento de la biopsia y 1 mes posterior a realizarse la misma.*

Niveles séricos de aldosterona (pg/ml).

### ***Variables independientes, numéricas continuas, de razón.***

Glucosa sérica (mg/dl).

Colesterol sérico (mg/dl).

Triglicéridos (mg/dl).

Ácido Úrico en suero (mg/dl).

Hemoglobina en suero (mg/dl).

### **Variables genéticas**

### ***Variables independientes, nominales.***

#### A. Polimorfismo -344 T/C de la enzima sintasa de aldosterona.

\* Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), que corresponde al cambio de Citosina/Timina en la posición -344, alterando el sitio de unión para el factor esteroideogénico 1 (SF-1) de la región transcripcional reguladora 5'. Se determinó la expresión del genotipo TT (Homocigoto alelo T: Timina), TC (Heterocigoto) ó CC (Homocigoto alelo C: Citosina) mediante la técnica de PCR en tiempo real.

#### B. Polimorfismo Intron 2 W/C de la enzima sintasa de aldosterona.

\* Conversión del intrón 2 de la sintasa de aldosterona (CYP11B2), el cual, es parcialmente reemplazado por el intrón correspondiente al gen de la enzima CYP11B1. Se determinó la expresión del genotipo WW (Homocigoto silvestre o Wild), WC (Heterocigoto), ó CC (Homocigoto de conversión) mediante la técnica PCR punto final.

### **Variables histológicas**

#### ***Variables dependientes, nominales.***

Edema endotelial (Presente/Ausente)

Necrosis de miocitos (Presente/Ausente)

Microangiopatía trombótica (Presente/Ausente)

Vacuolación isométrica, microvesiculaciones y/o microcalcificaciones en túbulos proximales (Presente/Ausente)

Arteriopatía hialina (Presente/Ausente)

Grado de arteriopatía (Presente/Ausente)

Atrofia tubular (Presente/Ausente)

Fibrosis intersticial (Presente/Ausente)

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS o proporciones según corresponda. La comparación de medias entre dos grupos se llevó a cabo mediante la prueba T de student para muestras independientes o con su alternativa no paramétrica (U de Mann Whitney). La comparación de proporciones entre dos grupos se efectuó con prueba de  $X^2$ . La comparación de las diferentes variables analizadas al dividir la población de estudio de acuerdo al genotipo se efectuó con ANOVA de 1 factor, empleando como prueba de comparación múltiple de medias el test de Bonferroni. La búsqueda de asociaciones se realizó con el

coeficiente Rho de Spearman. Se usó como un valor de significancia una  $p$  menor de 0.05. Se empleó el paquete estadístico SPSS versión 15 para Windows.

## **VARIABLES GENÉTICAS**

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes de Aldosterona Sintasa se determinaron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante de la prueba de chi-cuadrada ( $X^2$ ). Las diferencias entre grupos se determinó usando la prueba de  $X^2$  de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2 x 2 usando el programa estadístico EpiInfo v 5.0. Cuando el número comparado en alguna celda fue menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) fue evaluado como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS Y ECONÓMICAS**

A todos los pacientes se les informó de manera verbal y sin dejar alguna duda la naturaleza del estudio y los beneficios, los cuales, no serían obtenidos de manera directa, sino con la posibilidad de contribuir a la generación de un conocimiento, el cual, pudiera en un futuro generar beneficios tangibles. Por otro lado, se les entregó una hoja de consentimiento informado.

Las intervenciones a las que se sometieron los pacientes, fueron: la toma de muestra de sangre (20 ml) para la extracción del DNA, lo cual se llevó a cabo en el departamento de Nefrología en el área de investigación clínica. Se explicó que las complicaciones como hematoma en el sitio de punción, infección, flebitis,

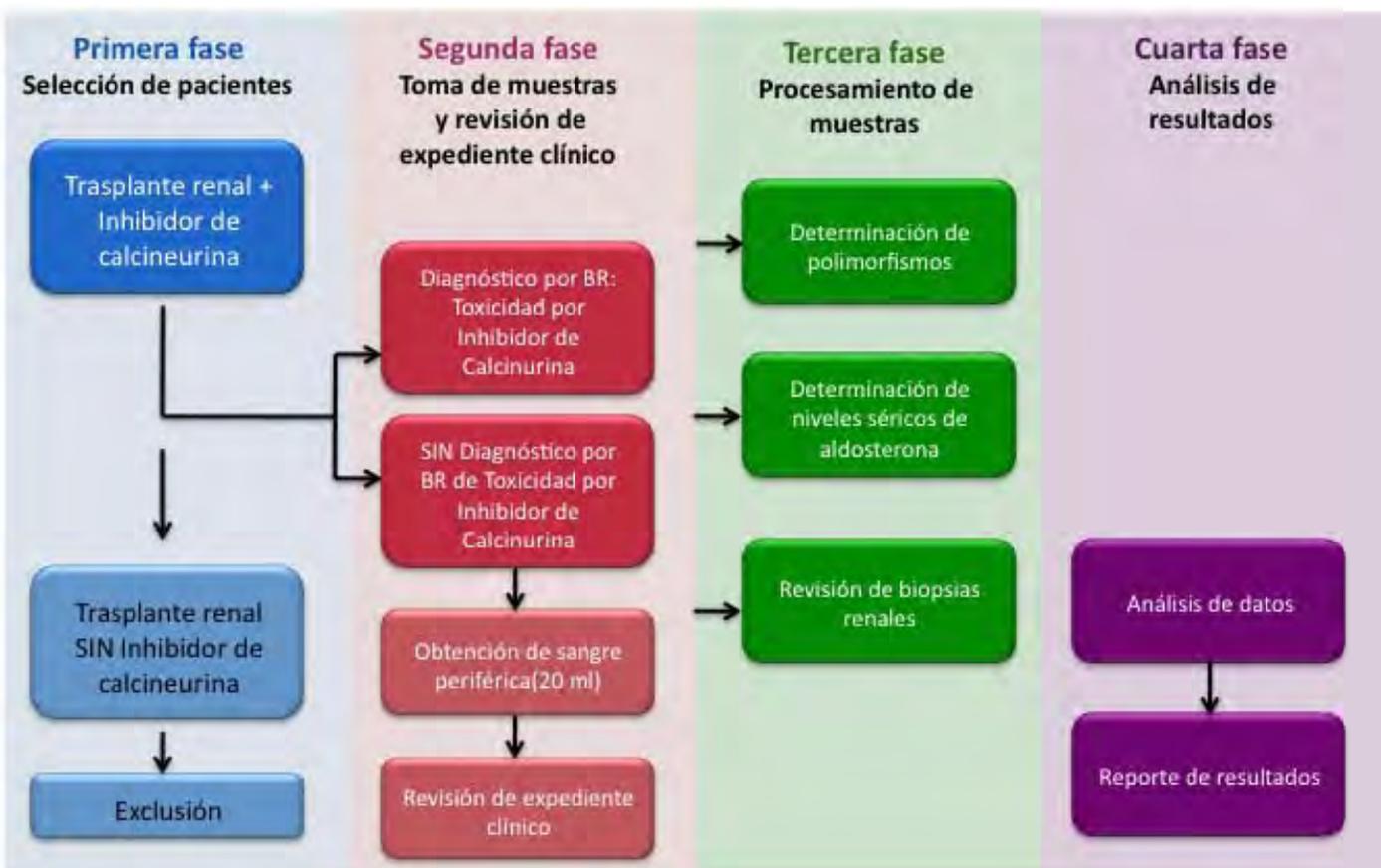
eran mínimas y generalmente resolvían al cabo de 3 a 4 días, sin necesidad de realizar alguna intervención relevante.

La realización de biopsia del injerto renal se llevó a cabo de acuerdo a las guías del Departamento de Nefrología, lo cual fue aceptado a través del consentimiento informado, explicando los beneficios de una biopsia de control para detectar alteraciones que pueden no ser sospechadas durante la consulta externa. El procedimiento se llevó a cabo mediante 24 hrs de hospitalización en el cuarto piso de Nefrología, para la realización del procedimiento y vigilancia de complicaciones como sangrado, hematoma o infección. Los costos de la hospitalización fueron cubiertos por fondos asignados a los protocolos de Investigación clínica de Trasplantes, no generando por lo mismo ningún costo para el paciente.

Se explicó a los pacientes y familiares que los resultados de ambas intervenciones serían estrictamente confidenciales y en caso de identificar algún resultado importante, se les localizaría de inmediato para realizar el ajuste necesario en el tratamiento.

A los pacientes no se les solicitó estudios adicionales, por lo que no se generaron gastos extraordinarios al paciente, por otro lado, los estudios de los polimorfismos de la Sintasa de Aldosterona, se realizaron por parte del departamento de Biología Molecular de nuestro Instituto, los gastos generados por este concepto fueron cubiertos por dicho departamento, por lo que nuevamente no se generaron gastos para los pacientes.

## DIAGRAMA DE FLUJO



**Figura 7. Diagrama de flujo de procedimientos a realizar durante la investigación**

## **PROCEDIMIENTOS**

1. Se identificaron los pacientes con diagnóstico de Nefrotoxicidad por Inhibidores de calcineurina mediante Biopsia renal en la base de datos del servicio de patología. Para el grupo control se incluyeron pacientes con trasplante renal con al menos 6 meses de tratamiento con un inhibidor de calcineurina y que hubieran sido sometidos a biopsia del injerto renal de acuerdo con las guías del departamento de nefrología, descartando nefrotoxicidad por el medicamento inmunosupresor.
2. Se revisaron en el expediente las variables clínicas y bioquímicas anteriormente especificadas y se vaciaron en la hoja de captura de datos.
3. El reclutamiento de los pacientes y la revisión del expediente clínico para obtener las variables clínicas se realizó por el investigador principal.
4. Se tomaron muestras de sangre para la obtención de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica para posteriormente identificar los polimorfismos del gen de la sintasa de aldosterona, empleando iniciadores

ya establecidos; de igual forma, se tomaron 2 muestras para determinar los niveles séricos de aldosterona. La toma de muestras para la medición de las variables genéticas fué responsabilidad del investigador principal.

5. La extracción del DNA y la determinación de los polimorfismos de la sintasa de aldosterona, se realizaron en el departamento de Biología molecular como se describe en el Apéndice 1 y 3 respectivamente.
6. La determinación de los niveles séricos de aldosterona se llevó a cabo mediante la técnica de Radioinmunoensayo en el laboratorio de Nefrología (Apéndice 4).
7. La toma de biopsia de injerto renal se llevó a cabo en el piso de Hospitalización de Nefrología a través de la técnica descrita en el Apéndice 5.
8. Las biopsias renales se analizaron en el Departamento de Nefropatología con la técnica y criterios descritos en el Apéndice 6.
9. Fecha de inicio del estudio: 1 de junio del 2009.
10. Fecha de conclusión del estudio: 26 de junio del 2010.

## HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

### ***RELACION ENTRE LOS POLIMORFISMOS -344 T/C e Int 2 W/C DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA SINTASA DE ALDOSTERONA Y EL DESARROLLO DE NEFROTOXICIDAD POR INHIBIDORES DE CALCINEURINA EN PACIENTES SOMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ".***

#### **INVITACIÓN A PARTICIPAR**

Usted esta invitado a participar en el estudio que incluye a pacientes con insuficiencia renal crónica que han recibido un trasplante renal y que se encuentran en tratamiento con tacrolimus (Prograf) o ciclosporina (Neoral), conocidos como inhibidores de calcineurina. El objetivo del estudio es determinar si algunos de los pacientes en tratamiento con dichos medicamentos tienen alguna alteración genética que predispone al desarrollo de toxicidad por estos fármacos.

Es conocida la asociación entre la toxicidad por niveles elevados de tacrolimus o ciclosporina y la sobrevida del injerto renal, motivo por el cual consideramos de importancia conocer si existen factores genéticos que puedan determinarse desde el momento en que se realiza el trasplante a fin de evitar complicaciones futuras que impliquen una disminución en la vida del injerto renal.

Su aceptación en el estudio no implica la administración de medicamentos diferentes a los que usted recibe hasta la actualidad. Usted continuaría recibiendo su tratamiento en forma regular, únicamente se obtendrá una muestra sanguínea para llevar a cabo el estudio genético, así como la realización de una biopsia renal de control para su seguimiento, y la cual nos permitirá identificar en forma temprana alteraciones en su injerto renal, lo cual serviría para dar un tratamiento oportuno de los hallazgos.

La decisión de participar implica que usted tenga un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta.

Cualquier duda adicional puede ser aclarada por el investigador responsable.

Una vez que usted lea este escrito y aclare sus dudas, podrá decidir si desea participar en el estudio o no.

#### **PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE.**

Se revisarán sus antecedentes en el expediente clínico, se realizará una toma de muestra sanguínea para identificar variantes genéticas, así como para medir los niveles de aldosterona, la cual es una hormona que participa en la regulación de la presión arterial y en el control del sodio (sal) en el cuerpo. Se revisará el material obtenido por biopsia renal, la cual, deberá realizarse durante una hospitalización de 24 hrs, los riesgos que pueden presentarse son secundarios al procedimiento invasivo como sangrado o infección.

#### **EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS**

Cuando la sangre es obtenida, usted podrá experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local. Estos riesgos se reducen al emplear al personal especializado para la obtención de muestras. Para realizar la biopsia renal se utiliza anestesia local en el sitio de punción y deberá permanecer 4 hrs en reposo con una compresión en el sitio de punción para evitar la complicación de sangrado.

#### **BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO**

Entre los principales beneficios, se encuentra el conocer si tiene alguna variante genética que le pudiera predisponer al desarrollo de daño renal en forma temprana. Identificar en forma temprana

cambios del tejido del injerto secundarios a toxicidad o en su caso situaciones como rechazo subclínico que no puede determinarse por exámenes de laboratorio.

**CONSIDERACIONES ECONOMICAS**

Usted no pagaría ningún costo adicional por los estudios realizados.

**CONFIDENCIALIDAD**

Los datos generados durante este estudio tendrán un carácter estrictamente confidencial. Sólo los investigadores tendrán acceso a los datos generados durante el estudio.

**DERECHO A ABANDONAR EL ESTUDIO**

Su participación se considera completamente voluntaria y usted puede desistir de participar o continuar en el estudio en el momento que lo desee. Esta determinación no afectará de ninguna manera su relación con el hospital o el grupo médico.

Si usted considera que cualquiera de los puntos antes mencionados no está claro, o le surgen dudas nuevas, le suplicamos aclararlas con el investigador responsable antes de determinar si participará o no en el estudio.

**AUTORIZACIÓN**

He leído el contenido de este escrito y he decidido por voluntad propia participar en este estudio. Sus objetivos generales, los particulares y los riesgos posibles e inconveniencias me han sido explicados y aclarados a satisfacción. Mi firma indica también que he recibido una copia de la presente autorización para participar.

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Teléfono

\_\_\_\_\_  
Firma de quien obtiene el consentimiento

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo

## CAPITULO III

### RESULTADOS

Se estudiaron en total 79 pacientes trasplantados con tratamiento inmunosupresor que incluyera un Inhibidor de calcineurina, a quien se hubiese realizado biopsia de injerto renal de acuerdo a las guías del Departamento de Nefrología.

El total de 79 pacientes, se dividieron en 2 grupos: **Grupo A**: 55 pacientes con biopsia de injerto renal que descartó nefrotoxicidad\*; **Grupo B**: 24 pacientes con diagnóstico de nefrotoxicidad\* por biopsia.

*\*La definición de nefrotoxicidad se basa en los siguientes criterios histológicos: Presencia de nódulos hialinos y/o arteriopatía grado 2 ó 3.*

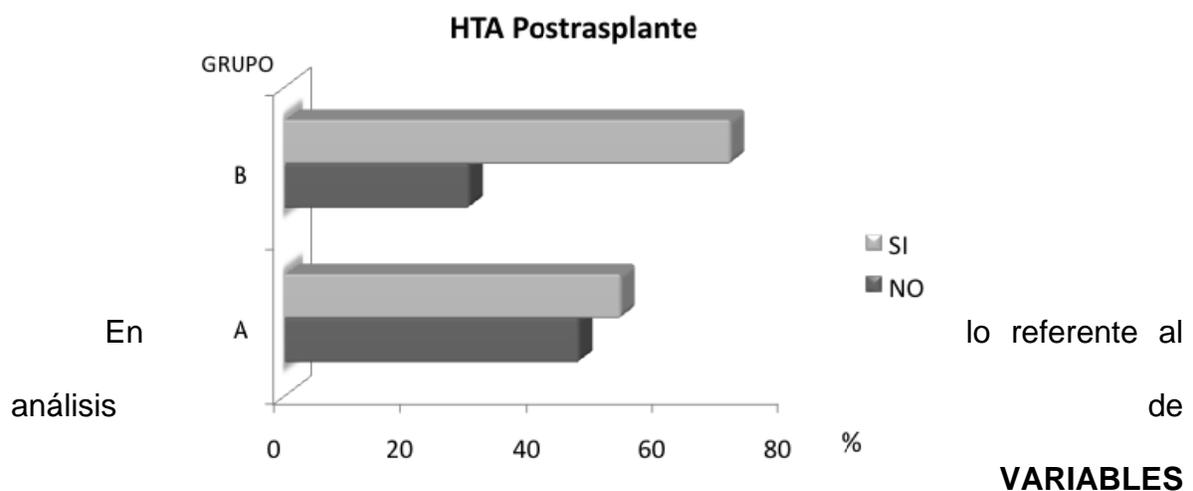
De los casos estudiados, 46 correspondieron al género masculino (58%) y 33 casos al género femenino (42%), **Grupo A** 33 (60%) hombres y 22 (40%) mujeres; **Grupo B** 13 (54%) hombres y 11 (46%) mujeres.

Evaluando la distribución de **VARIABLES CLÍNICAS**, se encontró en el grupo total de estudio una Edad promedio de  $30.3 \pm 10.5$  años (rango de 15 a 61 años); en el **Grupo A**, la edad fue de  $29.2 \pm 9.9$  años (rango de 15 a 56 años); en el **Grupo B** de  $33.3 \pm 12.2$  años (rango de 16 a 61 años). El peso promedio en la población total fue de  $64.6 \pm 12.8$  kg (rango de 30.5 a 99 kg); en el **Grupo A** fue de  $64 \pm 12.3$  kg (rango de 42 a 99 kg); en el **Grupo B** de  $64.7 \pm 13.3$  kg (rango de 30 a 88 kg). La talla promedio fue de  $1.61 \pm 0.1$  m (rango de 1.3 a 1.8 m); en el

**Grupo A** fue de  $1.61 \pm 0.09$  m (rango de 1.3 a 1.8 m); en el **Grupo B** de  $1.59 \pm 0.1$  m (rango de 1.3 a 1.8 m). El IMC general fue de  $24.4 \pm 4$  (rango de 17 a 36); en el **Grupo A** fue de  $24.2 \pm 4$  (rango de 17 a 36); en el **Grupo B** de  $24.9 \pm 4.1$  (rango de 17 a 34.7). No hubo diferencias significativas en los grupos etáreos, distribución por sexos ni en el resto de variables clínicas antes mencionadas entre ambos grupos (Tabla 1).

Al momento de la biopsia en el grupo total, la presión arterial sistólica promedio fue de  $129.4 \pm 22$  mmHg (rango 90 a 220 mmHg); en el **Grupo A**  $124 \pm 18.6$  mmHg (rango 90 a 188 mmHg); en el **Grupo B**  $140 \pm 26.1$  mmHg (rango 104 a 220 mmHg) ( $p=0.011$ ). La presión arterial diastólica promedio fue de  $80.6 \pm 13.8$  mmHg (rango 60 a 124 mmHg); en el **Grupo A**  $77 \pm 12.6$  mmHg (rango 60 a 124 mmHg) en el **Grupo B**  $87 \pm 13.7$  mmHg (rango 70 a 120 mmHg) ( $p=0.003$ ).

El desarrollo de Hipertensión arterial postrasplante se encontró en un 71% de los pacientes en el **Grupo B** y en el 53% de los pacientes en el **Grupo A** ( $p=NS$ ).



**BIOQUÍMICAS**; en el grupo total, la creatinina sérica basal fué de  $1.7 \pm 1.15$

mg/dl (rango de 0.7 a 8.0 mg/dl); en el **Grupo A** fue de  $1.7 \pm 1.34$  mg/dl (rango de 0.7 a 8.0 mg/dl); en el **Grupo B** de  $1.67 \pm 0.6$  mg/dl (rango de 0.9 a 3.5 mg/dl). La creatinina sérica al momento de la biopsia promedio fué de  $2.3 \pm 1.8$  mg/dl (rango de 0.7 a 10.8 mg/dl); en el **Grupo A** fue de  $2.3 \pm 2.1$  mg/dl (rango de 0.7 a 10.8 mg/dl); en el **Grupo B** de  $2.1 \pm 0.9$  mg/dl (rango de 0.9 a 5.2 mg/dl). En ambas mediciones de creatinina, no hubo diferencia significativa entre grupos.

Al momento de la biopsia, el ácido úrico promedio fué de  $7.2 \pm 2.1$  mg/dl (rango de 3.6 a 12.6 mg/dl); **Grupo A**  $6.7 \pm 1.9$  mg/dL (rango de 3.6 a 12.4 mg/dl); **Grupo B**  $8.2 \pm 2.3$  (rango de 4.6 a 12.6 mmHg),  $p=0.008$ .

Los niveles de Inhibidor de calcineurina al momento de la biopsia en el grupo total fue de  $8.8 \pm 5.2$  ng/ml (rango de 1.1 a 24.9 ng/ml); **Grupo A** de  $8.6 \pm 5.2$  ng/ml (rango 1.1 a 24.9 ng/ml); **Grupo B** de  $9.0 \pm 4.4$  ng/ml (rango de 1.3 a 15.4 ng/ml). La diferencia no fue significativa ( $p=0.8$ ).

Los niveles de creatinina sérica promedio un año posterior a la biopsia renal fue  $1.76 \pm 0.64$  mg/dl (rango 1.0 a 4.1 mg/dl); en el **Grupo A**  $1.59 \pm 0.52$  mg/dl (rango 1.0 a 3.7 mg/dl); en el **Grupo B**  $1.94 \pm 0.76$  mg/dl (rango 1.0 a 4.1 mg/dl). La diferencia entre ambos grupos no fue significativa ( $p=0.09$ ).

Los niveles de aldosterona promedio fueron de  $228.4 \pm 165.6$  pg/ml (rango 33 a 819 pg/ml); **Grupo A** de  $221 \pm 144.3$  pg/ml (rango 35 a 621.9 pg/ml); **Grupo B** de  $249 \pm 221$  pg/ml (rango 33 a 819 pg/ml); sin embargo, no hubo diferencias al comparar las cifras entre ambos grupos ( $p=0.65$ ).

No se encontró diferencia significativa en el resto de las variables numéricas analizadas, los resultados se muestran en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de acuerdo al diagnóstico o exclusión de Nefrotoxicidad.

	<b>Total N=79 (%)</b>	<b>Grupo A N=55 (%)</b>	<b>Grupo B N=24 (%)</b>	<b>Valor de p</b>
Edad (años)	30.3 ± 10.5	29.2 ± 9.9	33.3 ± 12.2	0.158
Rango	15 a 61	15 a 56	16 a 61	
Sexo				0.631
Masculino	46 (58)	33 (60)	13 (54)	
Femenino	33 (42)	22 (40)	11 (46)	

Peso (kg)	64.6 ± 12.8	64 ± 12.3	64.7 ± 13.3	
Rango	30.5 a 99	42 a 99	30 a 88	0.818
Talla (m)	1.61 ± 0.1	1.61 ± 0.09	1.59 ± 0.1	
Rango	1.3 a 1.8	1.3 a 1.8	1.3 a 1.8	0.493
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	24.4 ± 4	24.2 ± 4	24.9 ± 4.1	
Rango	17 a 36	17 a 36	17 a 34.7	0.466
<b>PAS</b> (mmHg)	129.4 ± 22	124 ± 18.6	140 ± 26.1	
Rango	90 a 220	90 a 188	104 a 220	<b>0.011</b>
<b>PAD</b> (mmHg)	80.6 ± 13.8	77 ± 12.6	87 ± 13.7	
Rango	60 a 124	60 a 124	70 a 120	<b>0.003</b>
Cr Basal (mg/dl)	1.7 ± 1.15	1.7 ± 1.34	1.67 ± 0.6	
Rango	0.7 a 8.0	0.7 a 8.0	0.9 a 3.5	0.889
Cr BR (mg/dl)	2.3 ± 1.8	2.3 ± 2.1	2.1 ± 0.9	
Rango	0.7 a 10.8	0.7 a 10.8	0.9 a 5.2	0.568
BUN BR (mg/dl)	32.3 ± 21.8	32.2 ± 25.3	32.4 ± 18.4	
Rango	8 a 143	8 a 143	10.2 a 79	0.963
PrU BR (mg/24h)	0.42 ± 0.3	0.48 ± 0.39	0.36 ± 0.22	
Rango	0.03 a 6.0	0.03 a 6.0	0.1 a 1.9	0.471
<b>AU BR</b> (mg/dl)	7.2 ± 2.1	6.7 ± 1.9	8.2 ± 2.3	
Rango	3.6 a 12.6	3.6 a 12.4	4.6 a 12.6	<b>0.008</b>
COL BR (mg/dl)	183 ± 43.4	177 ± 38.7	194 ± 51.9	
Rango	84 a 311	101 a 271	84 a 311	0.180
TG BR (mg/dl)	202 ± 125	195 ± 130	219 ± 120	
Rango	53 a 848	53 a 848	98 a 461	0.432
K BR (mEq/L)	4.25 ± 0.6	4.2 ± 0.5	4.3 ± 0.7	
Rango	3.1 a 6.6	3.1 a 5.9	3.3 a 6.6	0.720
GLU BR (mg/dl)	93 ± 24	95.5 ± 24.8	85.4 ± 20.9	
Rango	39 a 205	63 a 205	39 a 133	0.090
Niv ICN BR (ng/ml)	8.8 ± 5.2	8.6 ± 5.2	9.0 ± 4.4	
Rango	1.1 a 24.9	1.1 a 24.9	1.3 a 15.4	0.832
Cr 1@ BR (mg/dl)	1.76 ± 0.64	1.59 ± 0.52	1.94 ± 0.76	
Rango	1.0 a 4.1	1.0 a 3.7	1.0 a 4.1	0.091
Aldosterona(pg/ml)	228.4 ± 165.6	221 ± 144.3	249 ± 221	
Rango	33 a 819	35 a 621.9	33 a 819	0.654

BR: Biopsia renal; Niv ICN: Niveles de Inhibidor de calcineurina. Los valores se muestran en Media ± DS. La significancia estadística fue calculada por la prueba T de student.

Del total de pacientes, sólo se logró obtener muestra de sangre para la determinación de polimorfismos genéticos de 54 pacientes, los cuales correspondieron 40 al **Grupo A** y 14 al **Grupo B**.

El análisis de las **VARIABLES GENÉTICAS** se observa en la *Tabla 2*, la cual, muestra la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas para el

polimorfismo -344 T/C de la sintasa de aldosterona. Se encontraron 15 alelos T (Timina) en el **Grupo B** (53.6%) y 43 (53.7%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ); 13 alelos C (Citosina) en el **Grupo B** (46.4%) y 37 (46.3%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ). Al analizar los genotipos, se encontraron 4 homocigotos para el genotipo TT (28.5%) en el **Grupo B**, comparado con 12 (30%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ). Para el genotipo CC resultaron 3 (21.5%) en el **Grupo B** y 9 (22.5%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ). En lo que respecta al estado Heterocigoto para el genotipo TC, hubo una frecuencia de 7 (50.1%) casos en el **Grupo B** y 9 (47.5%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ).

**Tabla 2. FRECUENCIA ALELICA Y GENOTIPICA DEL POLIMORFISMO  
-344 T/C DE LA SINTASA DE ALDOSTERONA  
COMPARACIÓN GRUPO CON TOXICIDAD(B) VS GRUPO CONTROL(A)**

<b>ALELO</b>	<b>GRUPO A N=40 (%)</b>	<b>GRUPO B N=14 (%)</b>	<b>OR (95% IC)</b>	<b>p</b>
T	43 (53.7)	15 (53.6)	0.99 (0.38-2.57)	0.98
C	37 (46.3)	13 (46.4)	1.01 (0.39-2.60)	0.98

GENOTIPO	GRUPO A N=40 (%)	GRUPO B N=14 (%)	OR (95% IC)	<i>p</i>
TT	12 (30)	4 (28.5)	0.93 (0.20-4.22)	0.91
TC	19 (47.5)	7 (50.1)	1.11 (0.28-4.40)	0.87
CC	9 (22.5)	3 (21.4)	0.94 (0.16-4.90)	0.93

Para el polimorfismo Intron 2 W/C de la sintasa de aldosterona (*Tabla 3*), se expresaron 20 alelos tipo silvestre (W) en el **Grupo B** (71.4%) y 53 (66.3%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ); 8 alelos de Conversión (C) en el **Grupo B** (28.6%) y 27 (33.7%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ). Cuando se analizaron los genotipos, se encontraron 7 homocigotos para el genotipo WW (50%) en el **Grupo B**, comparado con 19 (47.5%) en **Grupo A** ( $p=NS$ ). Para el genotipo CC resultó 1 en el **Grupo B** (7.1%) y 6 en el **Grupo A** (15%) ( $p=NS$ ). En lo que respecta al genotipo Heterocigoto WC, hubo una expresión de 6 casos en el **Grupo B** (42.8%) y 15 (37.5%) en el **Grupo A** ( $p=NS$ ).

**Tabla 3. FRECUENCIA ALELICA Y GENOTIPICA DEL POLIMORFISMO Int 2 W/C DE LA SINTASA DE ALDOSTERONA COMPARACIÓN GRUPO CON TOXICIDAD(B) VS GRUPO CONTROL (A)**

<b>ALELO</b>	<b>GRUPO A N=40 (%)</b>	<b>GRUPO B N=14 (%)</b>	<b>OR (95% IC)</b>	<b><i>p</i></b>
W	53 (66.3)	20 (71.4)	1.27 (0.45-3.64)	0.61
C	27 (33.7)	8 (28.6)	0.79 (0.27-2.20)	0.61

<b>GENOTIPO</b>	<b>GRUPO A N=40 (%)</b>	<b>GRUPO B N=14 (%)</b>	<b>OR (95% IC)</b>	<b><i>p</i></b>
WW	19 (47.5)	7 (50)	1.11 (0.28-4.40)	0.87
WC	15 (37.5)	6 (42.8)	1.25 (0.31-5.08)	0.72
CC	6 (15)	1 (7.1)	0.44 (0.02-4.40)	0.45

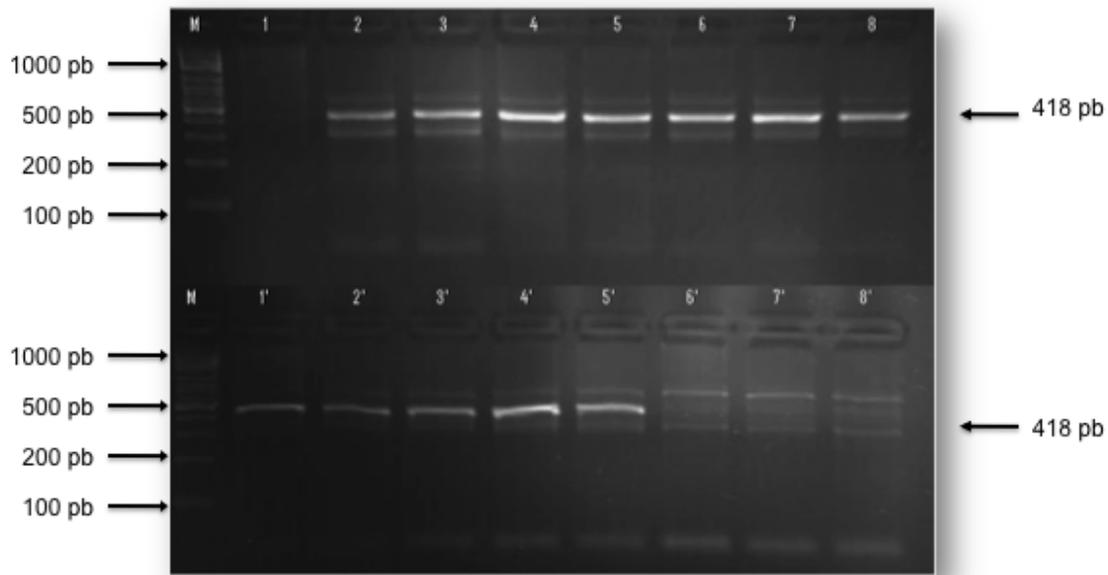


Figura 8. Se observa en un gel de agarosa al 1.8% los distintos genotipos analizados por PCR alelo específica del polimorfismo Intron 2 W/C. En el pozo 1 se determinó el genotipo Homocigoto tipo Conversión (CC) de 428 pb; de los pozos 2 al 5 se expresa el genotipo Heterocigoto silvestre/conversión de 418 pb (WC); del pozo 6 al 8 está presente el genotipo Homocigoto tipo silvestre de 418 pb (WW). Se midieron con el marcador *Hae III*x174 de 100pb. El gel se observó utilizando Bromuro de etidio mediante luz UV.

Se compararon las variables clínicas y bioquímicas con los genotipos de cada polimorfismo, los resultados se muestran en las *Tablas 4 y 5*.

No se encontró diferencia significativa con ninguna de las variables analizadas al compararlas entre los genotipos del polimorfismo -344 T/C. (Los valores se muestran en la *Tabla 4*).

En cuanto al polimorfismo Int 2 W/C, en aquellos pacientes con el genotipo homocigoto Silvestre WW, se encontraron mayores niveles de Inhibidor de calcineurina al momento de la biopsia ( $10.4 \pm 5.3$  ng/dl, rango 7.6 a 13.3 ng/dl), en comparación con los genotipos WC ( $6.4 \pm 2.3$  ng/dl, rango 5.0 a 7.7 ng/dl) y CC

( $6.5 \pm 4.3$  ng/dl, rango 1.9 a 11 ng/dl);  $p=0.02$ . Los niveles de creatinina un año posterior a la realización de la BR se encontraron en el  $1.5 \pm 0.3$  mg/dl (rango 1.0 a 2.57 mg/dl) con el genotipo WW;  $1.64 \pm 0.5$  mg/dl (rango 1.0 a 2.8 mg/dl) para el WC y  $1.97 \pm 0.16$  mg/dl (rango 1.8 a 2.1 mg/dl) para el CC ( $p=0.25$ ). El tiempo promedio de seguimiento posterior a la BR fue de 37 meses, tiempo en el que se encontró una tasa de filtrado glomerular de  $63 \pm 21$  ml/min en el genotipo WW,  $54 \pm 26$  ml/min en el genotipo WC y  $48 \pm 2$  ml/min en el genotipo CC ( $p=0.26$ ). Los niveles de proteinuria al momento de la biopsia fueron de  $0.32 \pm 0.41$  mg/día,  $0.42 \pm 0.58$  mg/día y  $0.99 \pm 2.2$  mg/día en los genotipos WW, WC y CC respectivamente ( $p=0.24$ ). *Tabla 5*

Se compararon los niveles de aldosterona de acuerdo a cada genotipo. En el Int 2 W/C se encontró con el homocigoto WW:  $222.7 \pm 186.8$  pg/ml; con el WC:  $234.6 \pm 149.8$  pg/ml; y con el homocigoto CC  $243.9 \pm 168.5$  pg/ml ( $p=NS$ ). Para el polimorfismo -344 T/C, en el genotipo TT:  $207.3 \pm 141.6$  pg/ml; en el TC:  $249.8 \pm 186.1$  pg/ml; y en el CC:  $218.9 \pm 171.9$  pg/ml ( $p=NS$ ). *En ambos polimorfismos, no hubo significancia estadística entre los genotipos (Figuras 9 y 10).*

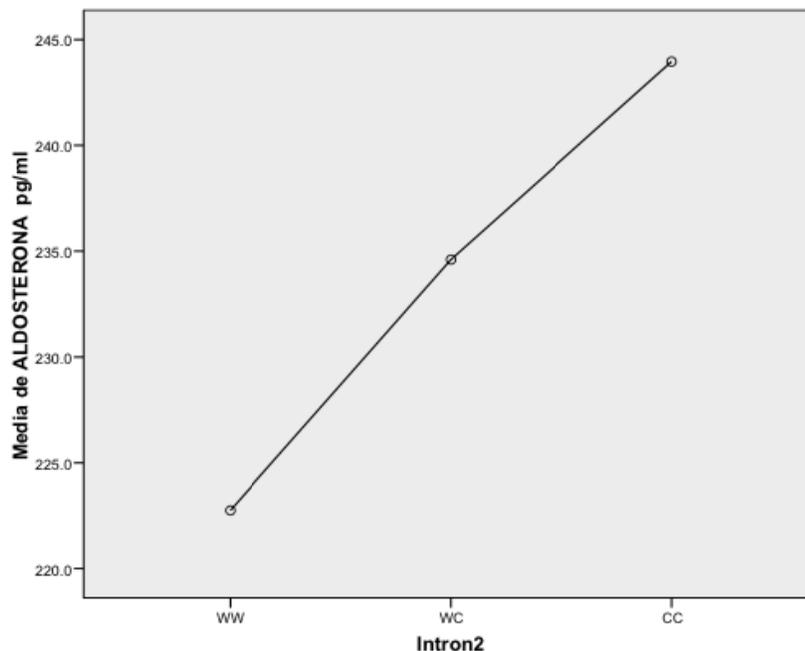


Figura 9. Media de Niveles de aldosterona según genotipo del Int 2 W/C

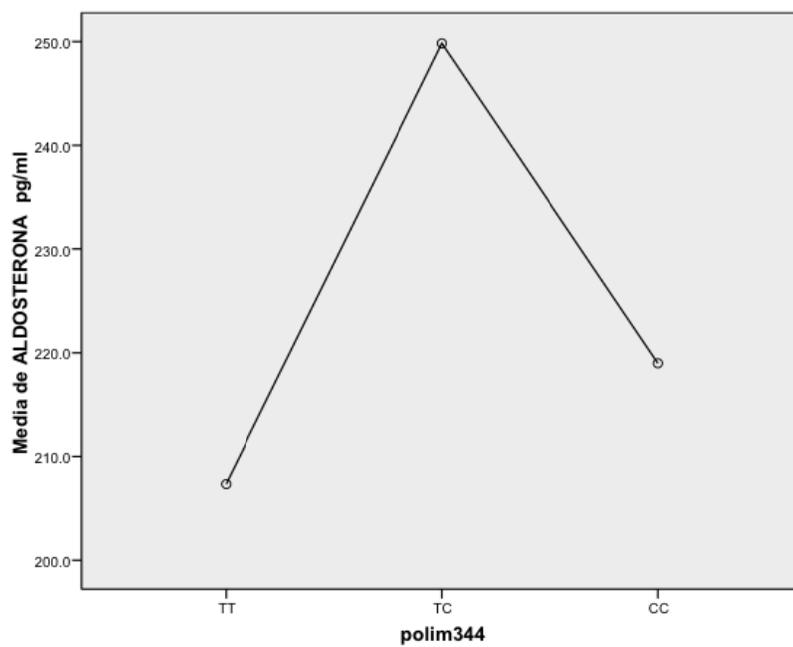


Figura 10. Media de Niveles de aldosterona según genotipo de -344 T/C

Tabla 4. Características clínicas y Bioquímicas de acuerdo a los genotipos del polimorfismo -344 T/C

	TT	TC	CC	p
PAS (mmHg)	124 ± 11	127 ± 24	128 ± 13	0.879
PAD (mmHg)	79 ± 11	79 ± 16	77 ± 8	0.843
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25.3 ± 5.1	23.8 ± 4	23.8 ± 3	0.497
Cr BR (mg/dl)	1.94 ± 0.8	2.1 ± 1.8	1.7 ± 0.8	0.619
BUN BR (mg/dl)	28.6 ± 15.3	26.1 ± 14.3	28.7 ± 19	0.836
PrU BR (mg/dl)	0.35 ± 0.46	0.60 ± 1.3	0.3 ± 0.2	0.603
AU BR (mg/dl)	6.5 ± 1.9	6.8 ± 1.6	6.5 ± 2.0	0.874
COL BR (mg/dl)	175 ± 43	181 ± 48	186 ± 44	0.832
TG BR (mg/dl)	210 ± 135	209 ± 174	184 ± 84	0.865
K BR (mEq/L)	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.6	4.1 ± 0.4	0.614
GLU BR (mg/dl)	85 ± 18	91 ± 19	96 ± 28	0.425
Cr 1@ BR (mg/dl)	1.67 ± 0.5	1.64 ± 0.4	1.45 ± 0.2	0.554
Niv IC BR (ng/ml)	6.7 ± 2.7	9.1 ± 5.8	8.9 ± 4.4	0.371

Los datos se muestran

Tabla 5. Características clínicas y Bioquímicas de los genotipos del polimorfismo Int 2 W/C.

	WW	WC	CC	p
PAS (mmHg)	127 ± 18	125 ± 20	126 ± 16	0.925
PAD (mmHg)	77 ± 12	79 ± 13	81 ± 15	0.843
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	24.8 ± 4.2	23.3 ± 3.7	25.3 ± 5.5	0.410
Cr BR (mg/dl)	2.09 ± 1.52	1.96 ± 1.44	1.84 ± 0.75	0.898
BUN BR (mg/dl)	28.5 ± 15.3	25.9 ± 16.4	27.9 ± 14.8	0.848
PrU BR (mg/dl)	0.32 ± 0.41	0.43 ± 0.58	0.99 ± 2.2	0.249
AU BR (mg/dl)	6.8 ± 1.8	6.6 ± 1.9	6.2 ± 1.5	0.700
COL BR (mg/dl)	181 ± 52	185 ± 39	161 ± 28	0.465
TG BR (mg/dl)	191 ± 101	240 ± 194	146 ± 66	0.278
K BR (mEq/L)	4.2 ± 0.5	4.1 ± 0.5	4.3 ± 0.4	0.678
GLU BR (mg/dl)	91 ± 21	88 ± 25	94 ± 12	0.835
Cr 1@ BR (mg/dl)	1.54 ± 0.3	1.64 ± 0.5	1.97 ± 0.16	0.252
Niv IC BR (ng/ml)	10.4 ± 5.3	6.4 ± 2.3	6.5 ± 4.3	<b>0.027</b>

Los datos se muestran

Al

comparar el desarrollo de HT postrasplante con los genotipos, no hubo diferencias significativas que identificaran un genotipo de riesgo para Hipertensión (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de pacientes con desarrollo de HT postrasplante de acuerdo a los genotipos de los polimorfismos -344 T/C e Int 2 W/C.

-344 TC					Int 2WC			
HAS pos TR	TT %	TC %	CC %	$p$	WW %	WC %	CC %	$p$
SI	41.7	66.7	36.4	0.162	45.8	66.7	40	0.336
NO	58.3	33.3	63.6		54.2	33.3	60	

valores representan % de pacientes con o sin diagnóstico de HT postrasplante, agrupados de acuerdo a genotipos. La significancia estadística fue calculada mediante la prueba de Chi-cuadrada de Pearson.

No hubo significancia estadística al correlacionar los genotipos del polimorfismo Intron 2 W/C y -344 T/C con el desarrollo o ausencia de nefrotoxicidad por ICN.

En lo que se refiere al análisis de **VARIABLES HISTOLÓGICAS**, se analizaron los genotipos de cada polimorfismo con las variables histológicas consideradas en el diagnóstico de nefrotoxicidad por ICN.

No se encontraron diferencias entre las variables histológicas de engrosamiento arteriolar (EA), arteriopatía hialina (AH) y grado de arteriopatía (AR) al compararlas entre los genotipos de ambos polimorfismos (*Tabla 7*).

Tabla 7. Características Histológicas de acuerdo a los genotipos de los polimorfismos -344 T/C e Int 2 W/C.

	EA-0 %	EA-1 %	<i>p</i>	AH-0 %	AH-1 %	AH-2 %	<i>p</i>	AR-0 %	AR-1 %	AR-2 %	<i>p</i>
TT	43.8	56.3		75	12.5	12.5		31.3	43.8	25	
TC	34.6	65.4		84.6	7.7	7.7		30.8	42.3	26.9	
CC	16.7	83.3	0.31	75	8.3	16.7	0.9	16.7	58.3	25	0.87
lw/lw	34.6	65.4		76.9	7.7	15.4		26.9	46.2	26.9	
lw/lc	33.3	66.7		81	14.3	4.8		28.6	42.9	28.6	
lc/lc	28.6	71.4	0.95	85.7	0	14.3	0.62	28.6	57.1	14.3	0.95

EA:

Engrosamiento arteriolar; AH: Arteriopatía hialina; AR: Grado de arteriopatía. Los valores representan % de pacientes con el hallazgo histológico. La significancia estadística fue calculada mediante prueba de Chi-cuadrada de Pearson.

Para el polimorfismo Int 2 W/C, la presencia de atrofia tubular, se encontró en el 8% de los pacientes con genotipo WW, en el 14.3% de los que expresaron genotipo WC y en el 28.6% de los pacientes con genotipo CC ( $p=0.35$ ). Para el polimorfismo -344 T/C, los porcentajes fueron 6.3 %, 16 % y 16.7% para los genotipos TT, TC y CC respectivamente ( $p=0.61$ ).

Se encontró mayor grado de fibrosis intersticial (*Grado II y III*) con el genotipo CC del polimorfismo Int 2WC en comparación con el resto de genotipos,

lo anterior, con un valor estadísticamente significativo, tal como se observa en la *Tabla 8 (p=0.03)*.

Tabla 8. Relación entre genotipos de Int 2WC y fibrosis intersticial.

La significancia estadística fue calculada mediante prueba de Chi-cuadrada de Pearson.	GENOTIPO	FI Grado 0	FI Grado I	FI Grado II	FI Grado III	p
	Int 2 WC	%	%	%	%	
	WW	7.7	76.9	15.4	0	
	WC	14.3	76.2	4.8	4.8	
	CC	28.6	14.3	<b>42.9</b>	<b>14.3</b>	<b>0.034</b>

## DISCUSIÓN

El objetivo principal del estudio, fué determinar si existía asociación entre los polimorfismos del gen que codifica para la sintasa de aldosterona con un mayor riesgo y/o magnitud en el desarrollo de Nefrotoxicidad por Inhibidores de Calcineurina.

No existen hasta el momento, estudios que asocien los polimorfismos del SRA con el desarrollo de nefrotoxicidad por inmunosupresores. En 2002, *Nicod y cols*, estudiaron polimorfismos de varios componentes del SRA evaluando su impacto con la función del injerto, siendo el genotipo TT del polimorfismo -344 T/C de la sintasa de aldosterona el que determinó de forma significativa la pérdida de función del injerto a largo plazo ( $p=0.002$ )<sup>(55)</sup>.

Este estudio se llevó a cabo en un grupo de pacientes mestizos mexicanos, con la finalidad de determinar la frecuencia de los polimorfismos -344T/C e Int 2W/C en dos grupos; uno que desarrolló cambios histológicos de toxicidad por ICN y otro grupo sin el desarrollo de los mismos, y con base en lo anterior, poder identificar si existe algún genotipo de riesgo para nefrotoxicidad por inmunosupresores en los pacientes trasplantados.

En la evaluación genética, no se encontraron diferencias en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo que desarrolló toxicidad y el grupo sin toxicidad por ICN. En cuanto al polimorfismo -344 T/C, se determinó la presencia del alelo T en el 53.6% de los casos y el alelo C en el 46.4% para ambos grupos. El genotipo TC fué el más frecuente en la población total estudiada. En el polimorfismo Int 2WC, el alelo W estuvo presente con mayor frecuencia que el C en ambos grupos de estudio ( $p=NS$ ). No hubo significancia estadística al correlacionar los genotipos de los polimorfismo Intron 2 W/C y -344 T/C con el desarrollo o ausencia de nefrotoxicidad por ICN. Esta distribución genética es similar a lo reportado en 2009 por un grupo de investigación en La India, ND<sup>(70)</sup>, quienes encontraron la expresión del alelo T en el 60% y alelo C en

el 40% del grupo de casos (HTA) y controles (sanos)  $p=0.38$ . En el polimorfismo Int 2W/C reportaron mayor frecuencia del alelo W en los controles y alelo C en el grupo de los casos ( $p= 0.00$ ).

En cuanto a la función del injerto un año posterior a la biopsia renal, se observó una tendencia de mayor nivel de creatinina sérica en el grupo con toxicidad, aunque esta diferencia no fué significativa. A diferencia de lo encontrado por *Nicod y cols*<sup>(55)</sup>, quienes consideran el alelo T como predictor de pérdida de función renal a largo plazo, en este estudio, el alelo T se encontró con la misma frecuencia en ambos grupos, independientemente de la función del injerto a un año de seguimiento.

La CYP11B2, es la enzima clave que limita la síntesis de aldosterona, por lo que existen numerosas investigaciones que analizan la relación entre los polimorfismos del gen que codifica para ésta enzima con la síntesis y secreción de aldosterona en los padecimientos donde se ha implicado a ésta hormona<sup>(35,49,50,53)</sup>. Debido a éste fundamento, se consideró importante además de los polimorfismos, la determinación de los niveles séricos de aldosterona, ya que se ha considerado como una de las principales vías implicadas en los mecanismos que inducen isquemia y fibrosis renal al favorecer la vasoconstricción y expresión del TGF  $\beta$ <sup>(33)</sup>, lo cual contribuye a la nefrotoxicidad por ICN.

En este estudio no se encontró diferencia significativa en los niveles de Aldosterona entre el grupo de pacientes con toxicidad y el grupo sin toxicidad. Al evaluar los diferentes genotipos, hubo una tendencia a tener mayores niveles de

aldosterona cuando está presente el alelo de conversión (C) del polimorfismo Int2 W/C. En lo que respecta al polimorfismo -344T/C, el genotipo heterocigoto TC es el que presentó mayor nivel de aldosterona, aunque en ambos casos la diferencia no alcanzó significancia estadística. Si se comparan los resultados de este estudio con lo reportado por *Mulatero y cols*<sup>(35)</sup>, quienes analizan el polimorfismo -344 T/C en sujetos hipertensos en relación a los niveles de aldosterona, ellos encontraron mayor expresión del alelo C en los sujetos con HTA y niveles altos de aldosterona, en comparación con los sujetos hipertensos con niveles normales de esta hormona ( $p=0.00$ ).

La mayoría de las publicaciones que estudian los niveles séricos de aldosterona con HTA, muestran que el hallazgo principal, no es el incremento de los niveles de ésta hormona, sino un aumento en la relación Aldosterona/Renina (RAR), lo anterior se ha sugerido como una hipersensibilidad a la Angiotensina II. En un estudio de *Pitt y cols*<sup>(63)</sup> encontraron que una población de caucásicos hipertensos con aumento de la relación Aldosterona/Renina expresaban los alelos T del polimorfismo -344 T/C y el alelo C del Int 2W/C con mayor frecuencia que aquéllos sujetos con una relación baja ( $p=0.02$ ). En contraste, *Tamaki y cols*<sup>(64)</sup> reportaron mayor frecuencia del alelo C del polimorfismo -344 T/C en pacientes japoneses con RAR incrementada ( $p=0.00$ ). Lo anterior puede ser el reflejo de una verdadera diferencia genética entre poblaciones, lo cual, eleva la importancia de los estudios realizados en población mestiza mexicana.

Se ha encontrado que la Hipertensión es un factor independiente que contribuye a la pérdida progresiva de la función del injerto en 2 grandes

estudios<sup>(65,66)</sup>. Se sugiere que la presencia de diferencias genéticas en la regulación de la presión arterial, favorecen el desarrollo de Hipertensión arterial postrasplante, y por lo tanto, contribuyen a una aceleración en la pérdida de la función del injerto<sup>(67)</sup>.

Se encontró diferencia significativa en las cifras de presión arterial sistólica ( $p=0.011$ ) y diastólica ( $p=0.003$ ) en ambos grupos al momento de realizarse la biopsia renal, siendo mayores en el grupo con nefrotoxicidad. El desarrollo de HT postrasplante se presentó en un 71% de los pacientes con nefrotoxicidad vs un 53 % en el grupo sin nefrotoxicidad ( $p=NS$ ). *Nejatizadeh y cols*, en 2009, estudiaron la relación entre los polimorfismos de la sintasa de aldosterona, la actividad plasmática de renina (PRA) y los niveles séricos de aldosterona (PAC) con el riesgo de desarrollar HTA, ellos encontraron a los alelos T (-344 T/C) y C (Int 2W/C) como haplotipos de riesgo para el desarrollo de HTA, así como un aumento en los niveles séricos de aldosterona y la relación Aldosterona/Renina en estos sujetos<sup>(70)</sup>. A diferencia de ellos, en este estudio, no hubo una relación de mayores niveles de aldosterona en aquellos pacientes que desarrollaron HT postrasplante.

En otro estudio del polimorfismo -344 T/C de la sintasa de aldosterona en relación al riesgo de desarrollo de HTA, *Davis y cols*<sup>(49)</sup> en 1999 encontraron mayor frecuencia del alelo T (60%) vs el alelo C (40%) en el grupo de sujetos Hipertensos en comparación con los controles sanos T (53%) vs C (47%)  $p=0.009$ . En este estudio, no hubo relación entre algún genotipo de los 2 polimorfismos con mayor susceptibilidad a desarrollar HT postrasplante a diferencia de lo publicado en otras investigaciones<sup>(49,67,70)</sup>.

Como se sabe, los niveles de ICN no son la mejor herramienta para predecir el desarrollo de nefrotoxicidad, ya que están influenciados por muchos factores poco controlables como son: la toma en un horario irregular de los mismos, la determinación de niveles séricos posterior a la toma de la dosis y en nuestra población, el cambio a marcas genéricas posterior a los 6 meses del trasplante renal, lo cual, hace más difícil lograr una estabilidad en el nivel óptimo de éstos inmunosupresores<sup>(71)</sup>. A pesar de lo antes mencionado, se analizaron los niveles de ICN al momento de la biopsia, encontrando de forma significativa mayores niveles séricos del inmunosupresor en el grupo de pacientes con genotipo homocigoto silvestre (WW) del polimorfismo Int 2 W/C en relación a sus otros dos genotipos ( $p=0.02$ ). Lo anterior es importante, ya que puede estar relacionado con diferencias en el metabolismo de los inmunosupresores, a cargo de la enzima citocromo P450 3A a nivel hepático<sup>(71)</sup>, o algún otro aspecto farmacocinético de éstos medicamentos.

Es importante resaltar la presencia de niveles de ácido úrico mayores en el grupo con nefrotoxicidad ( $p=0.008$ ). Estudios recientes consideran el papel del ácido úrico en la disfunción endotelial, provocando envejecimiento y muerte celular por arriba de 6 y 9 mg/dl respectivamente. Los mecanismos implicados son la activación de estrés oxidativo de forma local y la sobrerregulación de algunos componentes del SRA<sup>(68)</sup>, efectos que pueden ser bloqueados con fármacos IECA y ARA II. Debido a que el papel del ácido úrico se ha considerado responsable del riesgo cardiovascular y de la progresión de enfermedades renales<sup>(69)</sup>, surge la necesidad de realizar más estudios para evaluar éste aspecto, con la posibilidad

de considerarlo un marcador temprano de daño vascular secundario al uso de inmunosupresores.

Al evaluar las alteraciones histológicas por ICN con los distintos genotipos, no se encontró relación entre algún alelo o genotipo con el desarrollo de mayor grado de nefrotoxicidad evaluada por engrosamiento arteriolar, nódulos hialinos arteriolares y grado de arteriopatía.

Al evaluar el grado de fibrosis intersticial, se encontró que el genotipo homocigoto de conversión (CC) del Int 2W/C presentaba mayor grado de fibrosis intersticial en comparación con los genotipos WW y WC ( $p=0.03$ ). Lo cual sugiere, al menos en nuestro estudio, que las vías profibróticas principales pueden ser dependientes de otros mediadores distintos a la aldosterona, como la vía del TGF $\beta$ , siendo un fundamento para abrir líneas de investigación alternas.

Otro hallazgo importante, fue la presencia de engrosamiento arteriolar en el 65% de los pacientes, cuyo tiempo promedio de uso de ICN hasta el momento de la biopsia, fué de 25 meses. Aunque en grados iniciales y aislado, éste dato histológico no hace el diagnóstico de toxicidad por ICN, se considera un cambio temprano que finalmente contribuirá a la hipoperfusión glomerular crónica y disminución progresiva de la función del injerto secundaria al uso de ICN, lo que es similar a lo observado en estudios de seguimiento con el uso de estos inmunosupresores; *Nankivell y cols*, observaron dos fases de daño renal que contribuyen a la NCI. En el daño temprano se observan cambios tubulointersticiales secundarios a factores inmunológicos, en el tardío (posterior a

un año de trasplante), los cambios se encontraron a nivel microvascular y glomerular con grados progresivos de arteriopatía hialina, engrosamiento arteriolar, glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial por el uso de ICN. Estos hallazgos fueron universales posterior a los 10 años de tratamiento con ICN<sup>(11)</sup>.

Se debe resaltar que en este estudio, además de encontrar asociación del genotipo CC del polimorfismo Int 2W/C con mayor grado de fibrosis intersticial, se observó de forma paralela una tendencia a presentar con el mismo genotipo: mayores cifras de PAD y proteinuria al momento de la BR, mayor niveles de creatinina sérica un año posterior a la realización de la BR y menor tasa de filtrado glomerular a los 37 meses de seguimiento, así como un perfil metabólico adverso representado por mayores cifras de IMC y glucosa sérica al momento de la biopsia. De igual forma, en el análisis histológico, el genotipo CC es el que presentó mayor atrofia tubular, engrosamiento arteriolar y arteriopatía grado I. Los niveles de aldosterona fueron también discretamente mayores con este genotipo. Las variables anteriores no alcanzaron significancia estadística, lo cual, puede estar relacionado al tamaño de la muestra incluido en este estudio, sin embargo, sugiere de forma interesante que pacientes con este perfil genético pueden tener mayor riesgo de desarrollar un deterioro acelerado de la función renal por múltiples factores. Cabe mencionar que de forma paralela se está llevando a cabo un estudio de genotipificación para los polimorfismos -344 T/C e Int 2 W/C en población abierta, la cual incluye un grupo de mestizos y dos grupos indígenas. Lo anterior nos dará información útil en cuanto a la frecuencia de cada genotipo en la población general, lo que podría complementarse en un futuro con

nuevas líneas de investigación que incluyan un número de muestra mayor y que estén enfocadas al seguimiento estrecho de los pacientes con el genotipo CC del Int 2WC, para determinar si se puede considerar como genotipo de riesgo para una evolución menos favorable en la función del injerto de los pacientes trasplantados.

Finalmente, en este estudio, se documentó la presencia de rechazo subclínico en el 5 % de los pacientes estudiados, cuya función del injerto se mantuvo estable desde el trasplante renal y con niveles séricos de creatinina menores a 1.0 mg/dl, lo cual, resalta la importancia de establecer las biopsias de protocolo en los programas de seguimiento de trasplante renal.

## **CONCLUSIÓN**

Este estudio sugiere que no existe una asociación entre los polimorfismos del gen de la sintasa de aldosterona y el desarrollo de Nefrotoxicidad por ICN. Se encontró una asociación entre el genotipo CC del Int 2 WC con mayor grado de fibrosis intersticial, así como mayores niveles séricos de inhibidor de calcineurina con el genotipo WW del mismo polimorfismo. En futuros estudios podría realizarse un seguimiento estricto en busca de asociación del genotipo CC del polimorfismo Int 2 W/C con menor sobrevida del injerto a largo plazo. Este estudio sugiere que el papel que juega la Aldosterona en la Nefrotoxicidad por ICN, no parece ser dependiente de los polimorfismos de la sintasa de aldosterona.

## **LIMITANTES**

- 1.- La principal limitante fue el tamaño de muestra, el cual, deberá de incrementarse para tratar de identificar diferencias significativas en particular en lo que se refiere a los hallazgos ya mencionados para el genotipo CC del Intron 2 W/C.
- 2.- La segunda, fue el tiempo de seguimiento, el cual deberá extenderse con el fin de identificar la evolución de cada subgrupo clasificados de acuerdo al genotipo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akcay A, Sezer S, Ozdemir F, et al. Association of the Genetic Polymorphisms of the Renin-Angiotensin System and Endothelial Nitric Oxide Synthase With Chronic Renal Transplant Dysfunction. *Transplantation* 2004;78:89-898.
2. Handbook of kidney transplantation. Danovitch, G. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins.
3. Kreis HA. Ponticelli: Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 2001;71(Suppl.):555-559.
4. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002;346:8-580-90.
5. Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Ben Abdallah T, et al. *Transplant Immunology* 2006;15:303-309.
6. Kapturczak M, Meier H, Kaplan B. Pharmacology of Calcineurin Antagonists. *Transplantation Proceedings*, 2004;36(Suppl 2 S), 25S-32S.
7. Busauschina A, Schnuelle P, Van der Woude FJ. Cyclosporine Nephrotoxicity. *Transplantation Proceedings*, 2004;36(Suppl 2 S);229S-233S.
8. Rusnak, Frank, and Pamela Mertz. Calcineurin: Form and Function. *Physiol Rev* 2000;80:1483–1521.
9. Gooch, Jennifer L. An emerging role for calcineurin A in the development and function of the kidney. *American Journal Physiology Renal Physiology* 2006;290:769–776.
10. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity *J Am Soc Nephrol*: 1990;1: 162-79.
11. 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: 2326-2333.
12. De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 333-46.
13. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney International* 1995; 52(Suppl): S63-S69.
14. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney International* 1990;37:1487-91.
15. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzzi G. Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *American Journal of Renal Physiology* 1986; 251:581-587.
16. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, et al. Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clinical Nephrology* 1986; 25 (Suppl 1): S83-S88.
17. Jenkins JK, Huang H, Ndebele K, Salahudeen AK. Vitamin E inhibits renal mRNA expression of COX II, HO I, TGFbeta, and osteopontin in the rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant* 2001; 71: 331-334.
18. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, et al. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am Journal of Renal Physiology* 1998;275:595-604.
19. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Angiotensin II blockade

- decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1997; 52: 660-73.
20. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney International* 2000; 58: 1174-85.
  21. Horisberger JD, Rossier BC. Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport. *Hypertension* 1992;19:221-227.
  22. Pérez-Rojas JM, et al. Acción novedosa de la aldosterona en la nefrotoxicidad por ciclosporina. *Revista de Investigación Clínica* 2005; 57 (2): 147-155.
  23. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;93:F2-F9.
  24. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone induced protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14552-7.
  25. Seok JH, Hong JH, Jeon JR, Hur GM, Sung JY, Lee JH. Aldosterone directly induces NaK-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 251-4.
  26. Christ M, Wehling M. Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 1999; 64: 35-41.
  27. Ngarmukos C, Grekin RJ. Non-traditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: 1122-1127.
  28. Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Renal Physiol* 1999; 277: 319-327.
  29. Hostetter T, Rosenberg M, Kren S, Greene E. Aldosterone induces glomerular sclerosis in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996;6:1016.
  30. Juknevičius I, Segal Y, Kren S, Lee R, Hostetter T. Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am J Renal Physiol* 2004; 286:1059-1062.
  31. Rocha R, Chander P, Khanna K, Zuckerman A, Stier C. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:451-8.
  32. Feria I, Pichardo I, Juárez P, Ramírez V, González M, Uribe N, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003; 63: 43-52.
  33. Kopp J, Klotman P. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 1990;1:162-179.
  34. Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ, Zhuang Z, Stratakis CA. Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1033-1036.
  35. Mulatero P, Schiavone D, Fallo F, Rabbia F, Pilon C, et al. CYP11B2 Gene Polymorphisms in Idiopathic Hyperaldosteronism. *Hypertension* 2000;35:694-698.
  36. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM A chimaeric 11 -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 1992;355:262-265.
  37. Imrie H, Freel M, Mayosi B, Connel J, et al. Association between Aldosterone Production and Variation in the 11-Hydroxylase (CYP11B1) Gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:5051-5056.
  38. Wyszynski DF. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Pan Am J Public Health* 1998; 3(1):26-34.
  39. Cowley A. The genetic dissection of essential hipertensión. *Nature Reviews*

- genetics. 2006;7:829-40.
40. Baca V. y Orozco L.. Genética de las enfermedades complejas. En E. Orozco y J. Luna. Ed. Instituto Politécnico Nacional. México. 2004:75-91.
  41. Venter J. C, Adams M. D. and Myers E. W. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-1351.
  42. Brookes A. The essence of SNP's. *Gene* 1999;2:177-186.
  43. Riva A, Kohane I., A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *BMC Bioinformatics*. 2004;5:1-8.
  44. Riva A, Kohane I., SNP: Retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics*. 2002;18:1681-1685.
  45. Newton EM. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:1425-1430.
  46. Stitzel N. O, Binkowski A. and Tseng Y. Y. TopoSNP: a topographic database of non-synonymous single nucleotide polymorphisms with and without disease association. *Nucleic Acids Research*. 2004;32: D520-D522.
  47. Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:1404-1407.
  48. Zhang K, Qin Z, Liu S, Haplotype Block Partitioning and Tag SNP Selection Using Genotype Data and Their Applications to Association Studies. *Genome Research*. 2004;14:908-916.
  49. Davis E, Holloway C, Ingram M. Aldosterone Excretion Rate and Blood Pressure in Essential Hypertension Are Related to Polymorphic Differences in the Aldosterone Synthase Gene CYP11B2. *Hypertension*. 1999;33:703-707.
  50. Sookoian S, Fernández GT, Pirola C. Association of the CS344T aldosterone synthase gene variant with essential hypertension: a meta-analysis. *Journal of Hypertension* 2007;25:5-13.
  51. Hulbocká Z, Jáchymová M, Heller S. Association of the -344T/C Aldosterone Synthase Gene Variant with Essential Hypertension. *Physiol. Res*. 2009;58:785-792.
  52. Lim PO, Jung RT, MacDonald TM . Is aldosterone the missing link in refractory hypertension? Aldosterone-to-renin ratio as a marker of inappropriate aldosterone activity. *J Hum Hypertension*. 2002;16:153–158.
  53. Huimin Yu H, Shuguang Lin S, Zhang Y. Intron-2 conversion polymorphism of the aldosterone synthase gene and the antihypertensive response to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Hypertens* 2008;26:251 – 256.
  54. Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene Frequencies and Admixture Estimates in Four Mexican Urban Centers. *Hum Biology*, 1990;62(6):791-801.
  55. Nicod J, Rihard A, Frey F. Recipient RAS gene variants and renal allograft function. *Transplantation* 2002;73(6):960-965.
  56. Broekroelofs J, Stegeman G, Navis G. Risk Factors for Long-Term Renal Survival after Renal Transplantation: A Role for Angiotensin-Converting Enzyme (Insertion/Deletion) Polymorphism? *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2075-2081.
  57. Slowinski T, Diehr P, Kleemann P. No association between renin-angiotensin system polymorphisms and early and long term allograft dysfunction in kidney transplant recipients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2004;19:2846-2851.
  58. Zhang G, Wang H, Wang F, Gene Polymorphisms of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Angiotensin II Type 1-Receptor Activating Antibodies in Renal Rejection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2007;213:203-214.
  59. Foy CA, McCormack LJ, Knowler WC, Barrett JH, Catto A, Grant PJ. The Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Gene I/D Polymorphism and ACE Levels

- in Pima Indians. *J Med Genet*, Abril 1996;33(4): 336-337.
60. Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrión L, Artigao M, División JA, Massó J, Vidal A, Fernández JA. Angiotensin-converting Enzyme (ACE) Gene Polymorphism, Serum ACE Activity and Blood Pressure in Spanish Mediterranean Population. *J Human Hypertension*, 2000;14(2):131-135.
  61. Miller A, et al. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res*, 16:1217-17, 1998.
  62. Lahiri DK, Nurnberger J. A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid research* 1991;9:19.
  63. Lim O, MacDonald T, Connel J. Variation at the Aldosterone Synthase (CYP11B2) Locus Contributes to Hypertension in Subjects with a Raised Aldosterone-to-Renin Ratio. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4398 – 4402.
  64. Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Kinoshita M. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension*. 1999;33:266-270.
  65. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 1998;53:217.
  66. Mange KC, Cizman B, Joffe M, Feldman HI. Arterial hypertension and renal allograft survival. *JAMA* 2000; 283: 633.
  67. Bresticker M, Nelson J, Huang C, Wolf J, Anderson B. Plasma renin activity in renal transplant patients with hypertension. *Am J Hypertension* 1991;4:623.
  68. Yu MA, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Kang DH. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 2010 Jun;28(6):1234-42.
  69. Goicoechea M, Vinuesa SG. Effect of Allopurinol in Chronic Kidney Disease Progression and Cardiovascular Risk. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010.
  70. Nejatizadeh A, Kumar R, Pasha M, et al. CYP11B2 gene haplotypes independently and in concurrence with aldosterone and aldosterone to renin ratio increase the risk of hipertensión. *Clinical Biochemistry*. 2010;43:136–141.
  71. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic Monitoring of Calcineurin Inhibitors for the Nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2: 374–384.

## **APÉNDICES**

### **Apéndice 1**

#### **Extracción de ADN**

Se tomaron 10 ml. de sangre periférica de cada individuo en tubos “vacutainer” con EDTA al 15% como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el ADN genómico mediante la técnica de extracción salina con Tritón X-100 (modificado de Lahiri y Numberger, 1991) que consistió en realizar la lisis de eritrocitos, seguida por la lisis de leucocitos para, posteriormente, precipitar las proteínas<sup>(61,62)</sup>. El ADN se suspendió con un regulador de Tris-EDTA (TE) pH 8.0. Una vez que se purificó el ADN, éste se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280nm para calcular la pureza, de igual forma se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, ADN se ajustó a una concentración de 200ng/ul con TE (Tris-EDTA) y se realizaron alícuotas de éste.

#### **Pasos para la extracción de ADN genómico con Tritón X-100**

1. Se extrajeron de 10 ml de sangre periférica y se recolectaron en un tubo “vacutainer” con EDTA al 15% como anticoagulante.
2. Se centrifugó la muestra de sangre a 3000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el plasma.

## **LISIS DE ERITROCITOS**

1. Se transfirió el paquete rojo a un tubo falcón y se añadieron 5 ml de TKM1 más 125  $\mu$ l de tritón, se mezclaron hasta que el tritón se homogenizó.
2. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante.

## **LISIS DE LEUCOCITOS**

1. Se adicionaron 800  $\mu$ l de TKM2 y 50  $\mu$ l de SDS al 20%.
2. Se incubó la mezcla a 55° C por 15 min.
3. Se adicionaron 300  $\mu$ l de NaCl = 6 M y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos.
4. Se transfirió el sobrenadante a dos tubos appendorf de 1.5 ml y se adicionaron 1000  $\mu$ l de etanol a temperatura ambiente, se mezcló por inversión hasta que se precipitaron las hebras de ADN.
5. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min.
6. Se lavó el botón de ADN con 1000  $\mu$ l de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min.
7. Se secó el botón de ADN durante 20 min, posteriormente se suspendió en 250  $\mu$ l de T.E., se mezcló e incubó durante 15 min a 55°C.

## Cuantificación, concentración y control de la pureza del ADN



El ADN se cuantificó en un Fluorímetro ND-1000 (NanoDrop).

Por espectrofotometría a 260 y 280 nm.

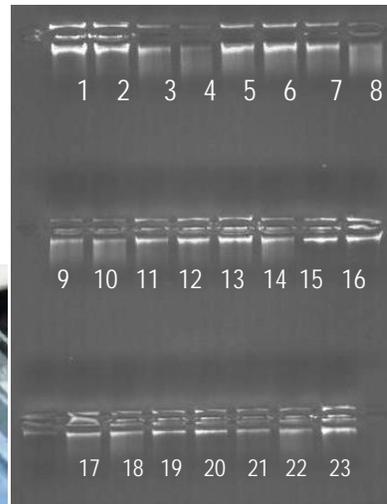
Su pureza se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} \times F \times d$$

Donde DO<sub>260</sub> es la densidad óptica a 260 nm, F es una constante igual a 0.05 (50µg de ADN=1DO a 260 nm) y d es el factor de dilución.

El criterio de pureza que se evaluó fue de 260 nm/280 nm  $\geq$  1.6, de igual forma, se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%.

Electroforesis en gel de agarosa para verificar la integridad del ADN.



Finalmente, el ADN se ajustó a una concentración de 200 ng/µL con TE (Tris-EDTA) y se realizaron alícuotas de éste, las cuales se guardaron a 4° C, -20° C y -70° C para su óptima preservación y uso posterior.

## Apéndice 2

### Estudio Genético.

Se estudiaron dos polimorfismos presentes en el gen de la sintasa de aldosterona, el -344C/T localizado en la región promotora y el Int2W/C localizado en el segundo intrón. El polimorfismo -344C/T (rs1799998) se determinó utilizando la técnica de PCR en tiempo real (Apéndice 3), utilizando un ensayo 5' TaqMan diseñado por la compañía Applied Biosystems. El polimorfismo Int 2 W/C se detectó utilizando iniciadores alelo específicos previamente reportados. Las reacciones se hicieron por separado, utilizando el Primer 1 con el Primer de reversa y el Primer 2 con el Primer de reversa. Los Primers a utilizar fueron: (Primer 1) 5'-TGGAGAAAAGCCCTACCCTGT-3' y (Primer de reversa) 5'-AGGAACCTCTGCACGGCC-3' para el alelo tipo silvestre y (Primer 2) 5'-CAGAAAATCCCTCCCCCTA-3' y (Primer de reversa) 5'-AGGAACCTCTGCACGGCC-3' para la variante. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: A) 94°C durante 2 minutos B) 94°C durante 1 minuto, 30 segundos a 66°C y 40 segundos a 72°C (repetición por 30 ciclos) y C) una extensión final de 7 minutos a 72°C (*Figura 11*). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer PCR System modelo 9700 de Applied Biosystems. Se visualizó en un gel de agarosa al 1.8% con una tinción con bromuro de etidio utilizando un Transiluminador de luz UV (UVP Transiluminator).

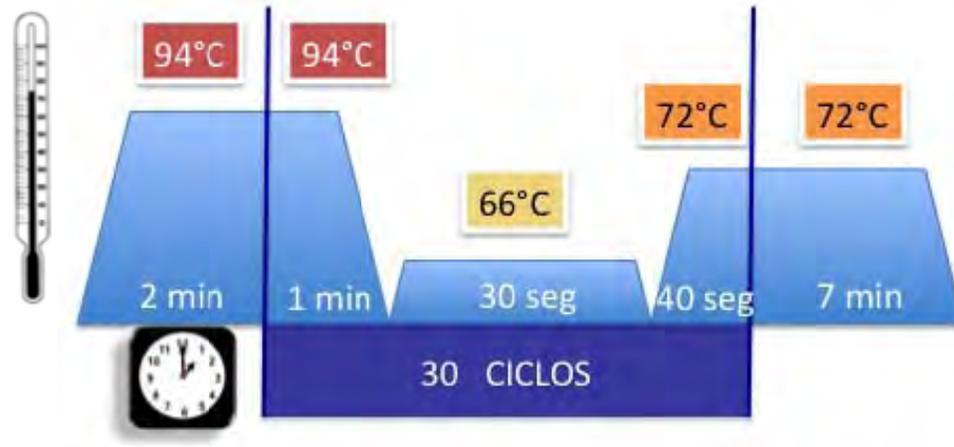


Figura 11.- Representación de la Amplificación del Polimorfismo Intron 2 W/T mediante técnica de PRC punto final.

Tabla 9.-Polimorfismos incluidos en el presente estudio, nombre, localización, ID SNP e iniciadores específicos.

GEN	POLIMORFISMO	LOCALIZACION	Identificación del SNP	Iniciador específico <i>Sentido /Anti sentido</i>
CYP11B2	-344 T/C	Región promotora	rs1799998	5'GTGTCAGGGCAGGGGGTA 3'. 5'AGGCGTGGGGTCTGGACT 3'.
	Intron 2 W/C Tipo Silvestre	Segundo intrón		5'TGGAGAAAAGCCCTACCCTGT 3'. 5'AGGAACCTCTGCACGGCC 3'.

	(Wild type)			
	Intron 2 W/C			
	Tipo Conversión (Conversion type)	Segundo intrón		5' CAGAAAATCCCTCCCCCCTA 3'. 5' AGGAACCTCTGCACGGCC 3'.

### Apéndice 3

#### Discriminación alélica por la técnica de PCR Tiempo Real.

Para llevar a cabo la técnica, de cada sitio polimórfico se sintetizaron los iniciadores específicos y las sondas de hibridación específica Taqman que detectan el cambio. Los ensayos de PCR en tiempo real para cada polimorfismo se sintetizaron por la compañía Applied Biosystems y los genotipos de cada muestra fueron determinados automáticamente estableciendo las medidas de fluorescencia alelo específica mediante lectura láser en un equipo de PCR en tiempo real ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System. Los resultados se analizaron empleando el software 2.2.2 para la discriminación alélica (Applied Biosystems) que permite definir los distintos alelos de forma exacta, como se muestra en la *Figura 12*.

Accesorios necesarios para la preparación de la reacción:

**TaqMan Universal PCR Master Mix:** Mezcla para la reacción de PCR que contiene AmpliTaq Gold ADN polimerasa, dNTPs (con dUTP), referencia pasiva ROX, 2X concentrado, para usar 1X. (*Tabla 10 y 11*)

**Agua ADNse free:** Para la dilución de ADN.

**ADN Genómico:** 10 ng/ $\mu$ l para la reacción.

Tabla 10 .-Componentes de la reacción Taqman.

Componentes	Volumen ( $\mu$ l) por reacción
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2X	5.0
TaqMan Assay on Demand	0.125
Agua ADNse free	0.875
ADN Genómico	4.0
Volumen Total	10.0

Tabla 11 .-Condiciones de termo ciclado para la cuantificación de ensayos de ADN

#### Temperaturas y Tiempos

Pasos de inicio		PCR 40 ciclos	
Activación AmpErase UNG	Activación AmpliTaq Gold ADN polimerasa	Desnaturalización inicial	Alineamiento Extensión
<b>HOLD</b>	<b>HOLD</b>	<b>CICLOS</b>	
2 min 50°C	<b>10 min 95°C</b>	<b>15 seg 95°C</b>	<b>1 min. 60°C</b>

Figura 12: Mapa de discriminación alélica, el ejemplo muestra el polimorfismo M235 T. Los puntos azules representan el genotipo homocigoto para el alelo CC, los puntos verdes el genotipo heterocigoto CT y los puntos rojos a los individuos homocigotos para el alelo T. Los cuadros negros son los controles negativos (NTC; No Templado Control).

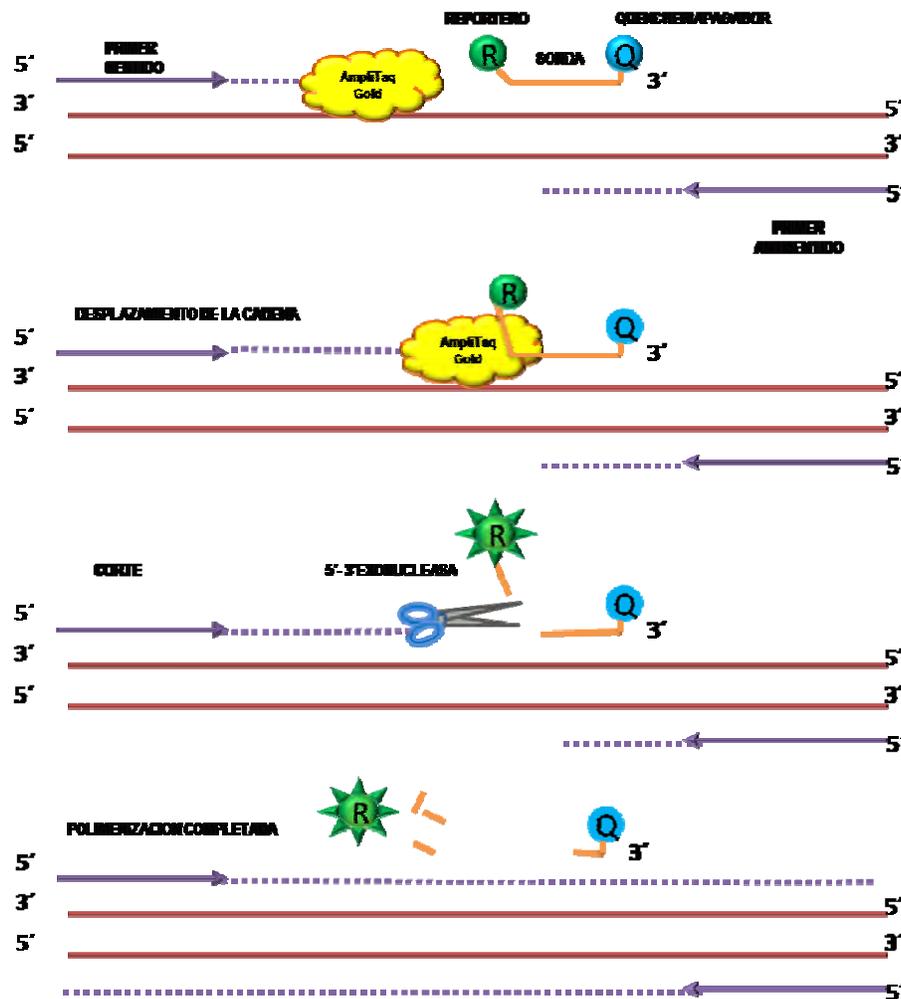
**Fundamento Sondas TaqMan. (Principio FRET; Fluorescent Resonant Energy Transfer)**

Una sonda TaqMan es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador no fluorescente, cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como Förster (o Fluorescent) Resonant Energy Transfer (FRET). Las sondas TaqMan tienen una  $T_m$  mayor que los primer's por lo que, durante la etapa de alineación, la primera en unirse a su secuencia específica es la sonda y, posteriormente los primer's, de tal forma que cuando la ADN polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5'-3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección ABI SDS 7900 HT (*Figura 13*). Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y ésta a su vez, es proporcional a la cantidad de templado generado, se permite visualizar el incremento de amplicón a lo largo de la reacción de PCR.

Para la determinación de SNP's se utilizaron en el mismo sistema de amplificación dos sondas, cada una de las cuales, presentó en la posición central una de las variantes del nucleótido dimórfico, utilizando como

reporteros a FAM y VIC para diferenciarlas en tres. La sonda que hibridó la secuencia blanco, fue escindida por la Taq polimerasa, mientras que un mismach en el nucleótido dimórfico redujo la eficiencia de unión de la sonda a la secuencia blanco y por lo tanto su degradación. De esta forma, un aumento en la señal de uno de los reporteros indicó homocigocidad para el nucleótido dimórfico que reportó la fluorescencia específica; mientras que la fluorescencia de VIC y FAM, indicó heterocigocidad.

Figura 13 : Fundamento Sonda Taq man; se muestra el fluoróforo y el quécher (bloqueador de la fluorescencia) acoplados a la sonda previo al proceso de amplificación y el fluoróforo activo luego de la formación del producto.



## **Apéndice 4**

### **Determinación de Niveles séricos de Aldosterona**

#### 1.- Obtención y Preparación de las muestras sanguíneas.

Las muestras se obtuvieron en ayunas, en reposo de 30 minutos y con el paciente en posición sentado. Posteriormente se centrifugaron a 4°C, se separó el plasma y se conservó congelado (-20°C).

#### 2.-Procedimiento

2.1. Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente (18-25°C) al menos 30 minutos antes de ser utilizados. Los estándares y el control se reconstituyeron 15 minutos antes de su utilización. El pipeteo de los reactivos en los tubos se realizó a temperatura ambiente (18-25°C).

2.2. Fueron necesarios los siguientes tubos: Grupo estandar "0" para la determinación de la unión máxima (Bo). Grupos estándar para determinar la curva estándar. Grupo de control para realizar el control. Grupo Sx para las muestras séricas a analizar. Se realizaron los ensayos por triplicado para los estándares y por duplicado con las muestras.

2.3. Se pipetearon 200 µl de estándares, control o muestras a analizar en los tubos correspondientes.

2.4. Se añadió 0.5 ml de aldosterona <sup>125</sup>I en todos los tubos.

- 2.5. Se mezcló ligeramente cada tubo con un agitador tipo Vortex.
- 2.6. Se incubaron durante  $3h \pm 5 \text{ min}$  a temperatura ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) con agitación de 400 r.p.m.
- 2.7. Se aspiró el contenido del tubo completamente hasta que desapareció los restos de colorante rojo.
- 2.8. Se midió la radioactividad unida a los tubos con un contador de centelleo gamma ajustado para la determinación del yodo  $^{125}\text{I}$ .

### 3.- Resultados.

- 3.1. Para cada grupo de tubos, se retiró el contaje de fondo y se calculó la media de los contajes.
- 3.2. Se calculó el porcentaje de unión de los estándares y de las muestras con relación al estándar 0.

$$B/Bo (\%) = \frac{\text{cpm Std o cpm Sx} \times 100}{\text{cpm Std}}$$

- 3.3. Se dibujó la curva estándar indicando la relación B/Bo (%) de los estándares en función de su concentración.
- 3.4. Se leyeron los valores de las muestras a partir de la curva, corrigiendo el valor leído por el factor de dilución.

#### 4.- Valores esperados.

Se tomaron como indicativos los valores encontrados en una población normal (regímenes de sodio normal).

SUJETOS NORMALES	PERCENTIL 5 (pg/ml)	MEDIANA (pg/ml)	PERCENTIL 95 (pg/ml)
Decubito	42	99	201.5
Bipedestación	97	201	626

*La conversión de pg/ml de aldosterona en pmol/L fue  $1 \text{ pg/ml} = 2.77 \text{ pmol/L}$*

#### 5.- Límite de detección.

El límite de detección se definió como la concentración mínima detectable distinta de cero con una probabilidad del 95%. El cálculo fue de 7 pg/ml.

6. Gama de medición: 7 a 1500 pg/ml.

## Apéndice 5

### Biopsia de injerto renal (Técnica).

La biopsia del injerto renal se realizó por un médico de Nefrología en la cama del paciente mediante guía ultrasonográfica, utilizando una pistola automática y una aguja 14 G. El procedimiento se realizó con el paciente en decúbito supino, se localizó el polo superior del injerto renal por vía ecográfica marcando la piel justo sobre ese punto. Se utilizó anestesia local y posteriormente se realizó una incisión de 3-4 mm con una hoja de bisturí, se introdujo la aguja de forma perpendicular. Mediante el transductor

ecográfico se visualizó el riñón al mismo tiempo que la aguja atravesó los planos musculares y fascias. A partir de ese momento, el vencimiento de una suave resistencia al introducir la aguja nos indicó que se atravesó la cápsula, momento en el que se disparó la pistola, posteriormente se retiró la aguja, ejerciendo de inmediato compresión sobre el sitio de punción. Se extrajeron dos cilindros de 1 cm de largo y dos milímetros de ancho. Se corroboró que la muestra era adecuada con el microscopio de luz y posteriormente se trasladaron en solución salina a Nefropatología para su proceso y tinción.

## **Apéndice 6**

### **Análisis histológico**

El análisis histológico se realizó en el Departamento de Nefropatología. De las biopsias de los pacientes de ambos grupos, se estudiaron 1 a 3 fragmentos cilíndricos de corteza renal procesados para microscopía de luz. Los tejidos se procesaron de acuerdo a las técnicas estandarizadas de rutina y fueron incluidos en parafina para la realización de cortes de 3 $\mu$ . Los cortes para microscopía de luz se tiñeron con Hematoxilina y eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), metenamina de

Jones y tricrómico de Masson. Se observaron bajo el microscopio a 200 X y 400X, en campos consecutivos siguiendo los parámetros de la clasificación de Banff para la calificación histológica. Los casos fueron analizados y catalogados en base a la evaluación de la morfología glomerular, vascular, tubular e intersticial.

Se consideraron criterios Histopatológicos de Nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina, de acuerdo a la clasificación de Banff los siguientes:

### **Nefrotoxicidad aguda**

#### *Arteriopatía aguda:*

- Edema endotelial
- Necrosis de miocitos (Etapa previa al acúmulo de nódulos hialinos)
- Microangiopatía trombótica

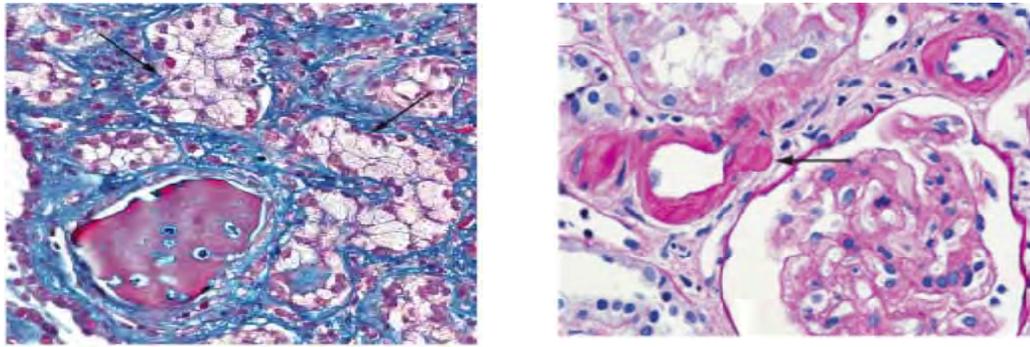
#### *Tubulopatía:*

- Vacuolación isométrica, microvesiculaciones y/o microcalcificaciones en túbulos proximales (*Figura 4*).

### **Nefrotoxicidad crónica**

#### *Arteriopatía hialina:*

- Presencia de nódulos hialinos en la media o adventicia de las arteriolas aferentes e interlobares (*Figura 5*).



**Figura 4. Vacuolización tubular isométrica (flechas) Tricrómico; x 200**

**Figura 5. Nódulo hialino (flecha) en la capa media de la arteriola aferente PAS; x 400**

### *Grado de Arteriopatía*

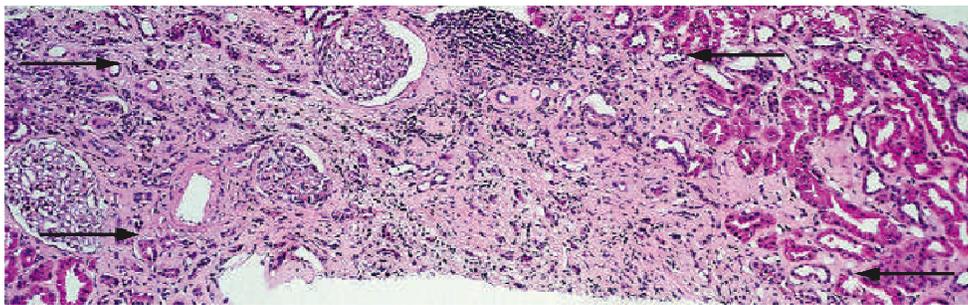
El grado de arteriopatía fue estimado en forma cuantitativa, considerando Grado cero para aquellas arteriolas sin alteraciones histológicas; Grado I se consideró a la presencia de: a) engrosamiento de la intima y/o media, b) hialinosis en la media o adventicia; Grado II: engrosamiento de la intima y/o media + hialinosis en la media o adventicia en uno o más vasos; Grado III Arteriolonefroesclerosis severa.

*\*La definición de nefrotoxicidad de acuerdo al grado de Arteriopatía se consideró a partir del grado 2 ó 3.*

### *Atrofia tubular*

### *Fibrosis intersticial grado II y III.*

La evaluación cualitativa y cuantitativa del daño tubular e intersticial se realizó con una escala de 0 a III; en donde el Grado 0 comprende fibrosis intersticial menor al 10%, Grado I corresponde a fibrosis intersticial del 11 al 25%, Grado II del 26 al 50% y Grado III mayor al 50% del tejido renal analizado (*Figura 6*).



**Figura 6. Atrofia tubular y fibrosis intersticial (flechas) Hematoxilina-eosina; x 100**