



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO. "DR. FEDERICO GÓMEZ"
NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

**ASIGNACIÓN DE DOSIS DE TACROLIMUS
SEGÚN EL GENOTIPO CY3A5
EN NIÑOS EN PROGRAMA DE TRASPLANTE RENAL
Y LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO A 12 MESES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA
ANA CATALINA ALVAREZ ELÍAS

TUTOR
DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO
JEFE DE LABORATORIO DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA
Y METABOLISMO MINERAL ÓSEO.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO. "DR. FEDERICO GÓMEZ"

CO-TUTOR
DRA. MARÍA DEL PILAR GARCÍA ROCA
LABORATORIO DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA Y METABOLISMO MINERAL ÓSEO.
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO. "DR. FEDERICO GÓMEZ"

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD
DR. ONOFRE MUÑOZ HERNÁNDEZ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO. "DR. FEDERICO GÓMEZ"

MÉXICO D.F. ENERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**ASIGNACIÓN DE DOSIS DE TACROLIMUS Y MICOFENOLATO SEGÚN EL
GENOTIPO EN NIÑOS EN PROGRAMA DE TRASPLANTE RENAL Y LA EVOLUCIÓN
DEL INJERTO A 12 MESES.**

Modificación de título por factibilidad.
Acuerdo No. AA46-(CM/SCA/SO170/15)

**ASIGNACIÓN DE DOSIS DE TACROLIMUS SEGÚN
EL GENOTIPO CY3A5
EN NIÑOS EN PROGRAMA DE TRASPLANTE RENAL
Y LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO A 12 MESES**

REG No. HIM/2013/030

Alumna Maestría en Ciencias:
Ana Catalina Alvarez Elías.

Tutora:
Dra. Mara Medeiros Domingo
Jefe del Lab. de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo

Co-Tutora:
Dra en C María Inés del Pilar García Roca
Lab. de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo.

Responsable de la Entidad:
Dr. Onofre Muñoz Hernández
Director de Investigación

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres, por enseñarme a luchar por mis objetivos, y levantarme una y otra vez sin importar las veces que sea necesario, y lo difícil que parezca el camino, al día siguiente siempre saldrá el sol para todos.

A Richie, por su apoyo incondicional, especialmente durante la Residencia de Nefrología Pediátrica, sin él, jamás hubiera podido hacer ambas cosas y por siempre tener las palabras correctas... "tú puedes". Gracias por ser mi partner, mi cómplice, gracias por creer en mi y en lo que creo.

A Pili, por ser la mejor compañera de trabajo y amiga, gracias por ser una hormiguita incansable y hacer una magia indescriptible con éste proyecto, por tu ética y profesionalismo en todo momento, por esforzarte siempre más de lo que te piden.

A la Dra. Mara por darme la oportunidad de pertenecer a una protocolo tan importante y regalarme el significado de lo que es "hacer investigación" por darme su apoyo en todo momento y procurar mi crecimiento profesional día a día.

Al Dr. Garduño por ser un gran maestro, creer en mi y en mi proyecto, por enseñarme que un verdadero investigador, sólo está en búsqueda de la verdad.

Al Dr. Peter Kotanko, por enseñarme que ser grande es equivalente a ser sencillo, por creer en mi, por su valioso tiempo, su paciencia infinita, su compromiso con éste proyecto, sus enseñanzas en estadística, pero más aún por sus enseñanzas en la vida,

A La Dra. María Ferris, por enseñarme otro mundo, abrirme los ojos a tantas cosas nuevas, por sus consejos y siempre estar ahí cuando la necesito, por su sencillez pero a la vez esa gran fuerza ante la vida, por su entusiasmo, por quererme tanto sin conocerme, por ser una gran mentora y abrirme las puertas de su casa y su corazón.

Al Dr. Guido Filler, por cobijarme bajo su brazo como su alumna, siendo un gran mentor, por regalarme una nueva familia además de enseñarme investigación, pero más aún por creer en mi y hacerme creer en mi misma, por esa gran oportunidad de ser parte de su equipo, por tratarme como a una hija.

Al Dr. Luis Velázquez Jones, por ser mi maestro en Nefrología y un ejemplo de vida.

Al Dr. Gustavo Varela por su apoyo incondicional en la logística de éste proyecto.

Y sobre todo, a los NIÑOS y sus PADRES, por decidir participar con el corazón en éste estudio, con el único interés de ayudar a aquellos pequeños que vienen detrás de ellos, por el valor tan grande de querer un mundo mejor... un millón de GRACIAS.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	5
Resumen	7
Introducción	8
Planteamiento del Problema	16
Pregunta de Investigación	17
Justificación	17
Objetivos	17
Hipótesis	17
Metodología	18
Resultados	23
Discusión	31
Conclusiones	33
Anexos	35
Referencias Bibliográficas	39

Índice de Tablas y Figuras.

Tabla 1. Características demográficas de los sujetos de estudio de acuerdo a la maniobra	24
Tabla 2. Polimorfismos de CYP3A5 de los sujetos de estudio de acuerdo a la maniobra.	25
Tabla 3. Cambios en los diferentes parámetros evaluados durante las cuatro semanas de acuerdo a Genotipo y Maniobra: Dosis Tacrolimus mg/kg/día, Niveles Valle Tacrolimus, TFG ml/min/1.73 m ²	26
Figura 1. Niveles valle de tacrolimus de las distintas variantes alélicas de acuerdo al grupo de tratamiento en la cuarta semana de seguimiento.	28
Figura 2. Mediana de niveles valle de tacrolimus de acuerdo a variante alélica y grupo de tratamiento durante las cuatro semanas después del trasplante renal.	29
Figura 3. Análisis por intención de tratamiento. Kaplan-Meier del tiempo en alcanzar niveles valle objetivo de tacrolimus de acuerdo a variante alélica y grupo de tratamiento.	30

ABREVIATURAS

A	Base nitrogenada adenina
ABC	Área bajo la curva de la concentración plasmática contra tiempo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMF	Ácido micofenólico
AMP	Adenosin mono fosfato
ATP	Adenosintrifosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bp	Par(es) de base(s)
C	Base nitrogenada citosina
CYP	Citocromo P450
°C	Grado Celsius o centígrado
C ₀	Concentración en valle del fármaco
C _{min}	Concentración mínima del fármaco
C _{max}	Concentración máxima de fármaco
CTP	Citosin trifosfato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
D	Dosis
d	Día
DAG	Diacilglicerol
EDTA-K2	Etilén diamino tetracético dipotásico
ERCT	Enfermedad Renal Crónica Terminal
DVR	Donador vivo relacionado
DF	Donador fallecido o donador cadavérico
FKBP	Proteína de unión a tacrolimus
g	Gramo
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito macrófago
G	Base nitrogenada guanina
GTP	Guanosin trifosfato
h	Hora
HLA	Antígeno linfocitario humano del complejo mayor de histocompatibilidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IRC	Insuficiencia renal crónica
IFN	Interferón gama
IL-2	Interleucina 2
IC	Inhibidor de calcineurina
IMPDH	Inosin monofosfato deshidrogenasa
IP3	Inositol trifosfato
kg	Kilogramo
KDa	Kilodaltones
L	Litro
m ²	Metros cuadrados
min	Minutos
mg	Miligramos

ABREVIATURAS

mL	Mililitros
μ L	Microlitros
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
MRP-2	Proteína de resistencia a múltiples fármacos 2
NAPRTCS	North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies
NFAT	Factor nuclear activador de linfocitos T
NF B	Factor Nuclear B
ng	Nanogramos
n	Tamaño de muestra
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
PA-1	Activador de proteína 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pM	Picomolar
pmol	Picomoles
PKC	Proteíncinasa C
sc	Superficie corporal
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo en una sola base
T	Base nitrogenada timina
Tac	Tacrolimus
TCR	Receptor de células T
TNF	Factor de necrosis tumoral alfa
Tmax	Tiempo máximo
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media, tiempo medio de eliminación
TTP	Timidin trifosfato
TR	Trasplante renal
Vd	Volumen de distribución
UGT	Glucoronil transferasa
UV	Ultravioleta
TFG	Tasa de Filtración Glomerular

ASIGNACIÓN DE DOSIS DE TACROLIMUS SEGÚN EL GENOTIPO CYP3A5 EN NIÑOS EN PROGRAMA DE TRASPLANTE RENAL Y LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO A 12 MESES.

RESUMEN

Las implicaciones de la enfermedad renal crónica terminal (ERCT) son diferentes en los niños que en los adultos. El trasplante renal (TR), es el tratamiento de elección en la ERCT en los niños. El rechazo es la principal complicación inmunitaria después del trasplante renal. La individualización de la dosis de los inmunosupresores es complicada por el estrecho índice terapéutico, así como, la variabilidad inter e intraindividual, lo que hace necesario el monitoreo farmacológico constante para su dosificación. Actualmente se proporciona una dosis estándar a todos los pacientes con trasplante renal que se ajusta según los niveles en sangre. Algunos pacientes pueden tardar en alcanzar los niveles objetivo más de una semana y otros pueden llegar a tener niveles tóxicos con la misma dosis. Tacrolimus es uno de los inmunosupresores más utilizados actualmente en el trasplante renal y se ha demostrado su vínculo con los polimorfismos de las enzimas *CYP3A5*, una de las enzimas encargada de su metabolismo. Desconocemos si el proporcionar una dosis acorde al genotipo desde el inicio permite evitar rechazo y toxicidad por éste fármaco

OBJETIVO: Estudiar si la administración de dosis de tacrolimus según genotipo *CYP3A5* permite alcanzar niveles objetivo en la primera semana del trasplante y disminuir el número de episodios de rechazo agudo o de toxicidad por éste fármaco en el primer año después del trasplante.

HIPÓTESIS: Los pacientes en quienes se adjudica dosis por genotipo alcanzan niveles terapéuticos de tacrolimus más rápido que aquellos a quienes se les proporciona dosis convencional y tienen menos episodios de rechazo-toxicidad en el seguimiento a un año.

Materiales y métodos: Se realizó un ensayo clínico aleatorizado, simple ciego, de una cohorte de pacientes pediátricos, en protocolo de trasplante renal. Los polimorfismos para el genotipo de *CYP3A5* se determinaron por secuenciación directa previo al trasplante, de marzo de 2013 a septiembre de 2015. Se incluyó a todos los pacientes que recibieron tacrolimus. Se excluyó aquellos que no contaron con muestra suficiente o resultados no concluyentes de la genotipificación. La dosis inicial de tacrolimus se administró en dos brazos. 1. Grupo Convencional: dosis máxima de 0.10 mg/kg/día, sin importar genotipo. 2. Grupo de Asignación (acorde a variante alélica): AA *1*1, al menos 0.20 mg/kg/día. AG *1*3: al menos 0.15 mg/kg/día, GG *3*3, al menos 0.10 mg/kg/día; con ajuste de dosis para alcanzar niveles valle del fármaco de 8 ng/mL.

Resultados: 74 pacientes (mediana de edad 14.5 años, 38 varones), seguidos durante un mes. La distribución de genotipos, en el grupo de dosis convencional (n=44) fue: AA *1*1 4.5%, AG *1*3 29.5%, GG *3*3 66.0%. En el grupo de asignación de dosis de acuerdo a genotipo (n=30) AA *1*1 13.3%, AG *1*3 56.6%, GG *3*3 30.0%. La mediana de semanas para alcanzar niveles valle (análisis de Kaplan-Meier por intención de tratamiento) fueron: AA *1*1: 4 semanas, AG *1*3: 2 semanas, GG *3*3: 1 semana, sin mostrar diferencias entre los grupos ($p=0.123$).

Discusiones y Conclusiones: La frecuencia de polimorfismos corrobora los datos de la literatura en población mexicana. Es prematuro determinar la efectividad de la estrategia de asignar dosis de acuerdo a genotipo, ya que el cálculo de tamaño de muestra es de 110 pacientes (55 por brazo; asumiendo $\beta=20\%$ y $\alpha=0.05$). Esperamos que al completar el estudio el impacto de los polimorfismos en el tiempo para alcanzar niveles de tacrolimus pueda definirse. El seguimiento de ésta cohorte permitirá identificar la utilidad de la estrategia de asignación de dosis y el impacto de dichos polimorfismos en la supervivencia del injerto a largo plazo.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad renal se define como el daño renal por un tiempo igual o mayor a 3 meses, con presencia de anormalidades estructurales y funcionales del riñón con o sin disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG) y una o más de las siguientes características:

- Alteración de la composición de la orina o sangre.
- Alteraciones en exámenes de imagen
- Alteraciones en la biopsia renal, o en los pacientes que presentan TFG menor de 60 ml/min/1.73 m² igual o mayor a 3 meses con o sin signos descritos previamente [1].

Las guías KDOQI clasifican a la enfermedad renal crónica en 5 estadios que son [2]

- Estadio 1: TFG mayor a 90 ml/min/1.73
- Estadio 2: TFG entre 89 y 60
- Estadio 3: entre 59 y 30
- Estadio 4: entre 29 y 15
- Estadio 5: menor a 15 se considera Enfermedad Renal Crónica Terminal (ERCT) [3-6]

Las implicaciones de la ERCT son diferentes en los niños que en los adultos. Además de la anemia, hipertensión arterial, desequilibrio electrolítico, enfermedad óseo-metabólica, proteinuria y oliguria, afecta el desarrollo neuropsicológico y de los diferentes órganos, por lo que el reemplazo de la función renal es de suma importancia [5, 7, 8].

El trasplante renal (TR), se prefiere sobre las terapias de reemplazo renal (diálisis peritoneal y hemodiálisis) ya que restablece la función renal, promueve el crecimiento adecuado, corrige la osteodistrofia, evita la anemia, disminuye el estrés producido por el tratamiento con diálisis, promueve mejor desarrollo psicosocial, aumenta la calidad de vida y a largo plazo tiene menor costo que la diálisis [9-11].

Por otro lado, la supervivencia del injerto depende de múltiples factores entre los que destacan la calidad del tejido renal, compatibilidad, condiciones pre-existentes, la edad del receptor y del donador, diferencias raciales, transfusiones de sangre previas y tiempo de isquemia fría, entre otros [8, 12]

El rechazo del injerto es la principal complicación inmunitaria después del trasplante. Se define como: una serie de acontecimientos en los que el injerto se reconoce como ajeno. Éste proceso supone la participación de las respuestas inmunitarias local y sistémica implicando a los linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células B, células NK, macrófagos y citocinas: el establecimiento de una lesión inflamatoria local; la inducción de la expresión del CMH y finalmente el deterioro de la función renal y la necrosis del tejido trasplantado. [13] De acuerdo a su aparición cronológica después del trasplante renal se clasifican en:

Rechazo hiperagudo: Tiene lugar desde minutos a horas después de pinzar los vasos del órgano trasplantado. Éste acontecimiento es producido por anticuerpos citotóxicos preformados anti-HLA clase I (isotipo IgG) o anti-ABO (isotipo IgM) en el receptor. Éstos anticuerpos se unen a las superficies endoteliales de las arteriolas del injerto, activan el complemento y producen una lesión grave, que incluye trombosis y obliteración de la vasculatura del injerto. [13]

Rechazo agudo acelerado: Sucede a los pocos días del trasplante (entre 24 horas y 4 días). Ocurre cuando el receptor ha sido sensibilizado mediante interacciones previas con el antígeno del injerto, generalmente mediante trasplantes previos o transfusiones y se piensa que representa una respuesta inmunitaria de memoria a la sensibilización previa.

Éste tipo de rechazo puede representar una combinación de lesión celular y mediada por anticuerpo. [13]

Rechazo agudo: Tiene lugar de días a semanas después de la cirugía, es una alteración inflamatoria sistémica que en su manifestación completa puede asociarse con múltiples síntomas constitucionales incluyendo fiebre, escalofríos, mialgias y artralgias. Muchos de éstos síntomas son manifestaciones de la liberación de citocinas (p ej. TNF, IL-1); la expresión de la IL-2 e IFN-gamma se ha demostrado que aumenta antes del desarrollo del infiltrado intersticial típico. El 90% de los rechazos agudos están principalmente mediados por una respuesta inmune celular. Aproximadamente el 10% de los episodios de rechazo están mediados por una respuesta humoral. [13]

Rechazo crónico (nefropatía crónica del injerto): Conduce a la pérdida tardía del injerto, se caracteriza por esclerosis glomerular, atrofia tubular, rotura de la membrana basal glomerular y fibrosis intersticial. Aparece lentamente en meses a años y produce pérdida progresiva de la función renal. El proceso de cicatrización después de episodios repetidos de rechazo agudo, la lesión crónica del injerto por respuesta de hipersensibilidad retardada, la isquemia crónica, la formación de anticuerpos, la toxicidad de los inhibidores de calcineurina y los fármacos que favorecen la producción de TGF-beta se propusieron como estímulos de la fibrosis generalizada.

El mecanismo inmunitario relacionado con el rechazo del injerto se inicia por el reconocimiento del injerto a través del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) del receptor el cual activa a los linfocitos T mediante la interacción del antígeno (HLA del donador) y el TCR del linfocito del receptor. El TCR por su nombre en inglés "*T cell receptor*", es un receptor celular asociado a una vía de señalización intracelular caracterizado por pertenecer a la familia de los receptores con actividad enzimática intrínseca y por poseer como ligandos a péptidos pequeños asociados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la membrana plasmática de macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. Esta interacción promueve la fosforilación de la tirosina presente en la fosfolipasa C gamma, del receptor, y la hidrólisis del fosfatidil difosfato (PIP2) con la subsecuente aparición del inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG), estas moléculas promueven el incremento de calcio y la activación de la proteínkinasa C (PKC) y dan lugar a la estimulación del factor nuclear κ B (NF κ B), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y el factor nuclear activador de células T (NFAT), estos factores pasan al núcleo celular y se acoplan a regiones promotoras en el DNA y promueven la producción de IL-2, IL-4 y factores citotóxicos. [12, 14].

Con el objetivo de ordenar esta serie de acontecimientos alrededor del rechazo al injerto renal, y de ésta forma mejorar el diagnóstico, se creó la Clasificación Banff.

La Clasificación Banff de la Patología del Injerto Renal, se originó en la primera reunión realizada en Canadá en 1991, como parte de las actividades de la Sociedad Internacional de la Comisión de Rechazo Renal Agudo, manteniendo su éxito en los esfuerzos de numerosos expertos para redefinirla y expandirla con reuniones cada 2 años. [49]

La última reunión se realizó en Brasil en 2013, dando lugar a las siguientes modificaciones:

Banff 2013 Meeting Report

Revised (Banff 2013) classification of antibody-mediated rejection (ABMR) in renal allografts [18]

Acute/active ABMR; all three features must be present for diagnosis^{1,2} 1. Histologic evidence of acute tissue injury, including one or more of the following:

Microvascular inflammation (g > 0³ and/or ptc > 0) Intimal or transmural arteritis (v > 0)⁴ Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause Acute tubular injury, in the absence of any other apparent

cause

2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following: Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections) At least moderate microvascular inflammation ([g p ptc] ! 2)⁵ Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated⁶

3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSAs) (HLA or other antigens)

Chronic, active ABMR; all three features must be present for diagnosis^{1,7} 1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including one or more of the following:

Transplant glomerulopathy (TG) (cg > 0)⁸, if no evidence of chronic thrombotic microangiopathy Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)⁹ Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes¹⁰

2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following: Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections) At least moderate microvascular inflammation ([g p ptc] ! 2)⁵ Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated⁶

3. Serologic evidence of DSAs (HLA or other antigens)

C4d staining without evidence of rejection; all three features must be present for diagnosis¹¹

1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections) 2. g 1/4 0, ptc 1/4 0, cg 1/4 0 (by light microscopy and by EM if available), v 1/4 0; no TMA, no peritubular capillary basement membrane multilayering, no acute tubular injury (in the absence of another apparent cause for this) 3. No acute cell-mediated rejection (Banff 97 type 1A or greater) or borderline changes

cg, Banff chronic glomerulopathy score; EM, electron microscopy; ENDAT, endothelial activation and injury transcript; g, Banff glomerulitis score; GBM, glomerular basement membrane; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; ptc, peritubular capillary; TCMR, T cell-mediated rejection; v, Banff arteritis

score. ¹For all ABMR diagnoses, it should be specified in the report whether the lesion is C4d-positive (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections; C4d > 0 by IHC on paraffin sections) or without evident C4d deposition (C4d0 or C4d1 by IF on frozen sections; C4d0 by IHC on paraffin sections).

²These lesions may be clinically acute, smoldering or subclinical. Biopsies showing two of the three features, except those with DSA and C4d without histologic abnormalities potentially related to ABMR or TCMR (C4d staining without evidence of rejection; see footnote 11, below) may be designated as “suspicious” for acute/active ABMR. ³Recurrent/de novo glomerulonephritis should be excluded.

⁴It should be noted that these arterial lesions may be indicative of ABMR, TCMR or mixed ABMR/TCMR. “v”

lesions are only scored in arteries having a continuous media with two or more smooth muscle layers. ⁵In the presence of acute TCMR, borderline infiltrates or evidence of infection, ptc !2 alone is not sufficient to define moderate microvascular inflammation and g must be !1.

⁶At present the only validated molecular marker meeting this criterion is ENDAT expression (4), and this has only been validated in a single center (University of Alberta). The use of ENDAT expression at other centers or other test(s) of gene expression within the biopsy as evidence of ABMR must first undergo independent validation as was done for ENDAT expression by Sis et al (4).

⁷Lesions of chronic, active ABMR can range from primarily active lesions with early TG evident only by EM (cg1a) to those with advanced TG and other chronic changes in addition to active microvascular inflammation. In the absence of evidence of current/recent antibody interaction with the endothelium (those features in the Second Section), the term active should be omitted; in such cases DSA may be present at the time of biopsy or at any previous time posttransplantation.

⁸Includes GBM duplication by EM only (cg1a) or GBM double contours by light microscopy. ⁹!7 layers in one cortical peritubular capillary and !5 in two additional capillaries (17), avoiding portions cut tangentially. ¹⁰While leukocytes within the fibrotic intima favor chronic rejection, these are seen with chronic TCMR as well as chronic ABMR, and are therefore helpful only if there is no history of TCMR. An elastic stain may be helpful as absence of elastic lamellae is more typical of chronic rejection and multiple elastic lamellae

are most typical of arteriosclerosis, although these findings are not definitive. ¹¹The clinical significance of these findings may be quite different in grafts exposed to anti-blood-group antibodies (ABO-incompatible allografts), where they do not appear to be injurious to the graft (18,19) and may represent accommodation.

However, with anti-HLA antibodies such lesions may progress to chronic ABMR (20) and more outcome data are needed.

Consensus reached in development of the revised Banff classification of antibody-mediated rejection (ABMR) [18]

1. ABMR (both acute/active and chronic, active) may now be diagnosed in the absence of C4d deposition. However, in the absence of C4d, additional evidence of current or recent antibody interaction with the vascular endothelium must be present; this will help avoid overdiagnosis of ABMR. Such evidence may be morphologic, in the form of at least moderate microvascular inflammation, or molecular, as detailed in Table 2 and in the text.

2. As the criteria in Table 2 apply to both for-cause and protocol biopsies, and because similar biopsy findings may be seen in acute and smoldering lesions of ABMR, the term “acute/active” is used rather than just “acute.” Further studies are needed to directly compare graft outcomes in patients diagnosed with acute/active ABMR in different clinical settings, as well as with preformed/recurrent versus de novo DSAs. Where deemed appropriate the pathologist may comment that the biopsy findings and clinical circumstances suggest a lesion that is acute or smoldering. Likewise, a comment may be made as to the relative activity and chronicity in cases of chronic, active ABMR.

3. Intimal arteritis (v1 and v2) should be included among lesions satisfying histologic criteria for ABMR, based on findings of Lefaucheur et al (21) that were recently published and presented at the 2013 Banff meeting. In ABMR, intimal arteritis is associated with an inferior prognosis; however, these lesions are more commonly associated with mixed ABMR/TCMR than with “pure” ABMR, and may also be seen in pure TCMR in the absence of DSAs. Intimal arteritis may be the only histologic manifestation of ABMR, although this quite uncommon (8 of 64 cases with DSA and intimal arteritis in Lefaucheur et al [21] lacked glomerulitis and peritubular capillaritis).

4. Diffuse (C4d3) and focal (C4d2) peritubular capillary C4d staining by IF and IP as well minimal (C4d1) staining by IP should be considered C4d-positive, the latter because of the lower sensitivity of staining by IP on paraffin sections (22) and evidence that C4d1 by IP is associated with microvascular inflammation (11). There was disagreement on whether to consider C4d1 on frozen sections as C4d- positive; a small majority felt it should not be although the clinical significance of C4d1 needs further investigation.

DSA, donor-specific antibody; IF, immunofluorescence; IP, immunoperoxidase; TCMR, T cell-mediated rejection.

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos del rechazo ha permitido la generación de terapias dirigidas a prevenir o revertir la actividad inmunitaria contra el injerto por parte del receptor. Existen diversas estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención del rechazo y tratar en lo posible de individualizar la terapia, las que han sido agrupadas en las siguientes tres etapas:

1. **Etapa de inducción** en la cual se establece la pauta profiláctica para prevenir y retrasar el rechazo agudo, en la que son administradas elevadas dosis de inmunosupresor. Entre los fármacos empleados se encuentran anticuerpos antilinfocitos poli o monoclonales, anticuerpos contra el receptor de IL-2 (CD25), esteroides, y mayores dosis de inmunosupresores de mantenimiento.

2. **Etapa de mantenimiento** en la que se administran dosis más bajas de inmunosupresores con respecto a la etapa de inducción. En esta fase se trata de encontrar la dosis mínima del inmunosupresor, necesaria para evitar el rechazo (eficacia) y minimizar los eventos adversos (toxicidad). Los fármacos empleados en esta etapa son:

- a) los esteroides
- b) los antiproliferativos, azatioprina y micofenolato de mofetilo
- c) los inhibidores mTor como sirolimus, everolimus y

d) los inhibidores de calcineurina como la ciclosporina y el tacrolimus.

3. Etapa de tratamiento del rechazo se caracteriza por la utilización de inmunosupresión intensa durante un periodo corto de tiempo con el objetivo de inhibir la activación del sistema una vez que hubo reconocimiento del injerto.

Ninguno de los fármacos anteriormente mencionados por sí solo es efectivo para inhibir completamente la activación de los linfocitos T. Desde 1996 hasta la fecha se han empleado esquemas de tratamiento que involucran más de un inmunosupresor en el tratamiento de los pacientes con trasplante, niños y adultos con buenos resultados en la prevención de rechazo [14-16].

Los inmunosupresores requieren de monitorización del fármaco por su estrecho índice terapéutico y significativa variabilidad inter e intra individual, en las concentraciones sanguíneas. Ésta variabilidad puede estar dada por factores como interacciones fármaco-nutrientes, interacciones fármaco-enfermedad, insuficiencia renal, inflamación e infección, género, edad, polimorfismo y masa hepática. [69]

Los inhibidores de calcineurina, ciclosporina y tacrolimus, han mostrado su utilidad en el tratamiento de inducción y mantenimiento del trasplante, debido a que se ha comprobado gran eficacia como inhibidores de la respuesta inmunitaria, y mejoran la sobrevida del injerto, de donador vivo y cadavérico, 80% a 5 años [17], pero la individualización de la dosis es complicada por el estrecho índice terapéutico y la variabilidad inter e intraindividual que presentan. Además, existen factores propios del individuo como el desarrollo orgánico del paciente, la presencia y naturaleza de la enfermedad existente, el género, el estado nutricional, la adherencia al tratamiento y la herencia genética que complican aún más la dosificación [5, 17-20], lo que hace necesario el monitoreo farmacológico constante, para mantener los niveles sanguíneos adecuados.

TACROLIMUS

Química

Tacrolimus (Tac) pertenece al grupo de los macrólidos con actividad antimicrobiana restringida. Este fármaco es producido por el hongo *Streptomyces tsukubaensis*, fue descubierto en 1984 en Japón [8] y aprobado por la FDA en 1994.

Dosis.

La dosis inicial es de 0.1 a 0.15 mg/Kg/día, administrado dos veces al día; con esta dosificación se alcanzan concentraciones estables entre el tercer y cuarto día. El tipo de trasplante, el uso de otros inmunosupresores y el tiempo post-trasplante son factores que determinan los niveles en valle de tacrolimus que se pretenden alcanzar [21]. En pacientes con trasplante renal después de una dosis promedio de tacrolimus de 0.16 mg/Kg/d, el ABC fue de 104 ng*h/L mientras que en trasplante hepático el ABC fue de 252 ng*h/L seguido de una dosis promedio de 0.3 mg/Kg/d. Existe correlación entre el ABC y la C_{min} posterior a la primera dosis oral de tacrolimus con un valor $r = 0.9$ y en estado estacionario de $r = 0.83$, lo que sugiere que la C_{min} de Tac es un buen indicador de la exposición sistémica [8, 23, 27]. La dosis terapéutica descrita es de 0.2 a 0.3 mg/kg/día dividida en dos dosis, para paciente de trasplante renal. [86]

Farmacocinética.

Distribución.

La distribución de Tac en sangre depende del hematocrito, la concentración de proteínas en el plasma y la concentración del fármaco [23]. En sangre tacrolimus se une entre el 72 y 77% a la albúmina, a la alfa-1-glicoproteína ácida y a eritrocitos.

El volumen de distribución (V_d) de Tac administrado por vía intravenosa en adultos es de 1 a 1.5 L/Kg, mientras que en niños es de 2.6 a 2.7 L/Kg, lo que indica que en los niños, el

Vd es de hasta 1.8 veces más alto que en adultos [8]. En pacientes pediátricos, después de una administración oral, se alcanza un Vd de 9 L/Kg [8, 25, 26].

La biodisponibilidad depende de la expresión de las isoenzimas CYP3A4, CYP3A5 y la glicoproteína P (P-gp), la función y actividad de estas proteínas varía marcadamente entre individuos y esto se ha relacionado con la presencia de los polimorfismos en los genes que codifican a CYP3A4, CYP3A5 y a la P-gp [28].

Efectos Adversos y Toxicidad.

El tacrolimus presenta un estrecho índice terapéutico, así como una gran variabilidad interindividual, errores en la dosificación de Tac pueden llevar al paciente trasplantado a rechazo o a la presentación de toxicidad, para evitar esto, actualmente se hace un monitoreo constante de los niveles sanguíneos.

Los eventos adversos de Tac incluyen: nefrotoxicidad, alteraciones en el metabolismo de la glucosa, hipertensión, molestias gastrointestinales, hiperkalemia, infecciones por agentes oportunistas, enfermedad linfoproliferativa, hirsutismo, hipertrofia gingival, disfunción neurológica e hiperlipidemia [8, 23, 30].

Nefrotoxicidad por inhibidores de la Calcineurina:

La nefrotoxicidad es un efecto secundario importante de los inhibidores de la calcineurina y es el principal inconveniente de éstos fármacos. Hay una disminución funcional del flujo sanguíneo y en el filtrado glomerular ya que producen vasoconstricción de la microvasculatura renal dosis dependiente reversible que afecta principalmente a la arteriola aferente. [13] Síndromes descrito de nefrotoxicidad de los inhibidores de la calcineurina:

- Exageración de la disfunción precoz del injerto después del trasplante
- Disminución aguda reversible del filtrado glomerular.
- Enfermedad microvascular aguda.
- Disminución crónica progresiva del filtrado glomerular.
- Hipertensión y alteraciones electrolíticas: retención de sodio y edema, hiperpotasemia, hipomagnesemia, acidosis hiperclorémica, hiperuricemia. [13]

Se sospecha clínicamente, así como ante la presencia de elevación de creatinina, asociada a niveles supratrapéuticos del fármaco. El diagnóstico se corrobora mediante biopsia renal que distingue tres lesiones características:

1. Tubulopatía aguda, con marcada vacuolización tubular, donde las lesiones son reversibles con la disminución de la dosis.
2. Arteriopatía, donde los miocitos son reemplazados por depósitos hialinos. La reversibilidad de las lesiones aún está en debate.
3. Microangiopatía trombótica, acompañada de falla renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia. [50]

Subfamilia CYP3A.

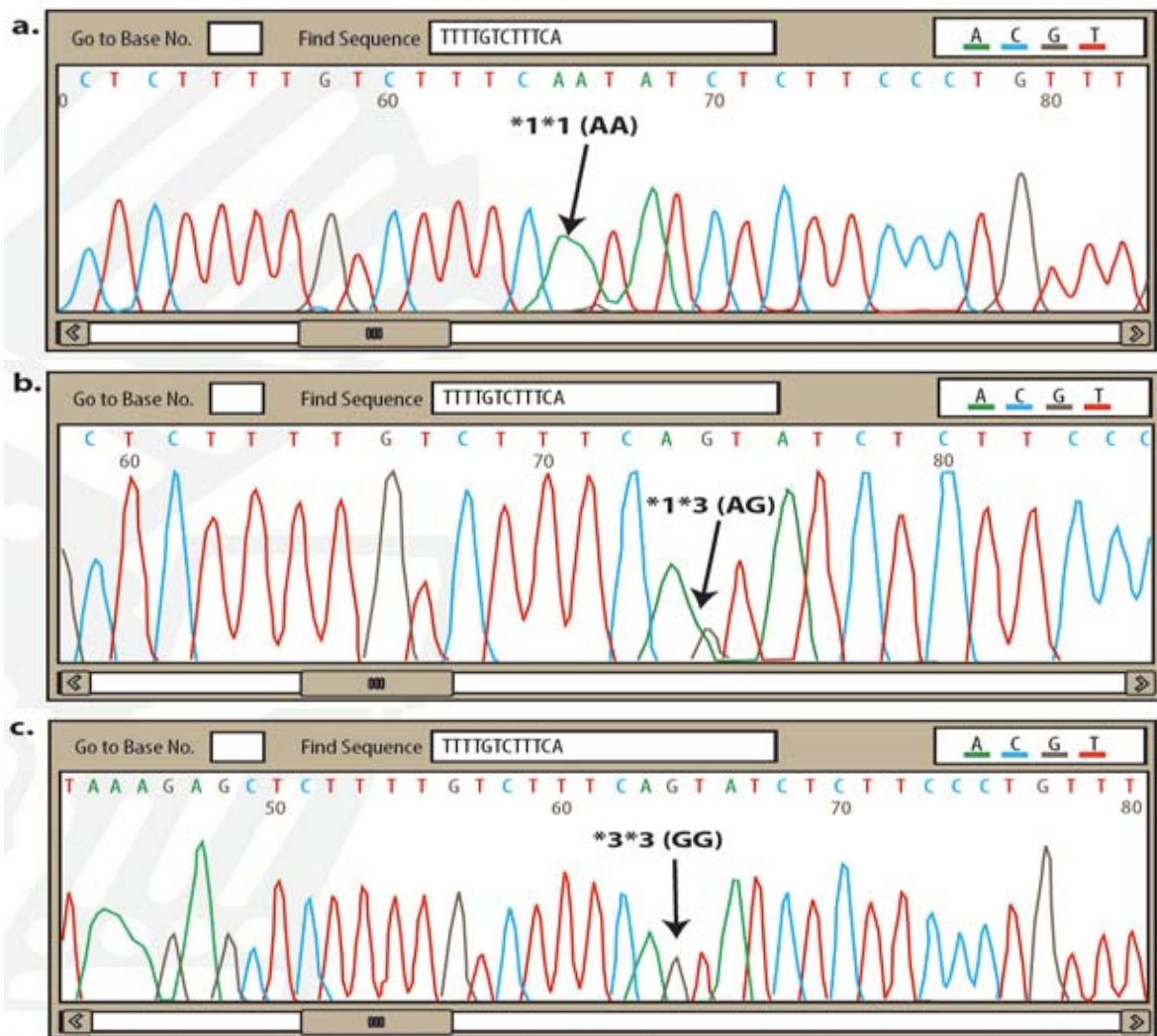
El metabolismo de Tac depende de la expresión hepática e intestinal de las enzimas metabolizadoras de fase I de la subfamilia CYP3A, responsable de la biotransformación de 50% de los medicamentos que se utilizan en el área clínica, esta subfamilia presenta cuatro isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, estas proteínas son el producto de los genes que llevan su mismo nombre, los cuales se encuentran localizados en el cromosoma 7 [33].

El CP3A4 es el de mayor proporción en los microsomas hepáticos, este citocromo al igual que el CYP3A5 metaboliza al tacrolimus. La variante genotípica CYP3A4*1B se ha estudiado ampliamente, tiene una mayor actividad enzimática, su posible efecto ha sido discutido, pero no ha sido comprobado en todos los grupos estudiados, probablemente por su baja frecuencia. [34, 35]

El CYP3A5 es codificado por el gen del mismo nombre, localizado en el cromosoma 7p21, produce un transcrito de 1720 pb producto de 13 exones, los cuales codifican para una proteína de 502 aminoácidos. Se conocen algunas variantes en las regiones intrónicas, las cuales afectan el empalme del ARN mensajero alterando la función de la proteína, entre ellas se encuentran las variantes alélicas *CYP3A5*3* y *CYP3A5*6*.

El *CYP3A5*3* es uno de los polimorfismos más estudiados en relación al metabolismo de los inhibidores de calcineurina. Este polimorfismo se debe al cambio de una adenina (A) por una guanina (G) en la posición 6986 del gen (A6986G o también identificado como rs776746), dicha variación produce un codón de paro prematuro en el exón 3, lo que promueve la producción de una proteína no funcional. Los individuos con genotipo para *CYP3A5*1*1* expresan la proteína funcional o normal [29, 36, 37]. La variante polimórfica *CYP3A5*3*3* expresa una proteína corta no funcional.

Electroferograma de los 3 polimorfismo intrónico 3 del gen CY3A5. a) Genotipo *CYP3A5*1*1*(AA), b) genotipo *CYP3A5*1*3*, c) genotipo *CYP3A5*3*3*.



Modificado de: García-Roca P, et al. "Correlación del genotipo *MDR1* (*ABCB1*) y *CYP3A5* con el perfil farmacocinético del tacrolimus en niños con trasplante renal". Tesis de doctorado en ciencias, mayo 2013.

En un estudio realizado en el 2008 84% de caucásicos, 49% de asiáticos y 15 % de negros presentaban el genotipo *CYP3A5*3*3* [38], este mismo autor en un estudio realizado en el 2004 relacionó la concentración del tacrolimus en las primeras dos semanas después del trasplante con el genotipo del gen *CYP3A5* y encontró que los individuos con la variante alélica *CYP3A5*3*3* tuvieron bajos niveles del tacrolimus comparados con aquellos con genotipo *CYP3A5*1*1* ó *CYP3A5*1*3* [39]. En ese mismo año se estimó que de 10 a 20% de caucásicos, de 40 a 50% de asiáticos, de 60 a 70 % de hispanos y más de 80% de afro-americanos fueron expresadores altos para la proteína *CYP3A5* [40].

Los individuos homocigotos para *CYP3A5*3* con trasplante de órgano sólido, alcanzaron concentraciones hasta dos veces más altas de Tac que los individuos con genotipo *CYP3A5*1* [29, 41-44]. Por otro lado, existen evidencias de portadores del genotipo *CYP3A5*3*3* que requieren menores dosis de Tac sugiriendo que el genotipo puede promover información para individualizar la dosis de Tac [29, 45, 46]. Se ha reportado altas dosis ajustadas de Tac (C_0 h/dosis, C_2 h/dosis o ABC/dosis) en individuos que expresaban por lo menos un alelo *CYP3A5*1* con respecto a los individuos que presentaban el alelo *CYP3A5*3*.

En un estudio realizado por nuestro grupo en pacientes con trasplante renal que incluyó pacientes mexicanos pediátricos y adultos, se determinó la frecuencia de los genotipos presentes en el gen *CYP3A5*, 52.2% (152 pacientes) mostraron el genotipo no expresador *CYP3A5*3*3*, 6.2% (18 pacientes) y 41.6% (121 pacientes) mostraron los genotipos *CYP3A5*1*1* y *CYP3A5*1*3* respectivamente, que se consideraron del tipo expresador. En este mismo estudio publicamos que los pacientes con genotipo *CYP3A5*3*3* tuvieron menores requerimientos en la dosis de tacrolimus al ser comparados con los genotipos *CYP3A5*1*1* y *CYP3A5*1*3*, para alcanzar niveles en valle similares.

Por otro lado, se estudió la relación entre las variantes polimórficas del gen *CYP3A5* y la farmacocinética de tacrolimus en 51 pacientes pediátricos, en este estudio se observó que los niños con genotipo *CYP3A5*3*3* requirieron menor dosis de tacrolimus (0.06 mg/Kg/d) con respecto a los genotipos *CYP3A5*1*1* y *CYP3A5*1*3* (0.15 y 0.13 mg/Kg/d). El grupo con genotipo *CYP3A5*3*3* alcanzó mayor C_{max}/D (253.3 ng*mL/mg*Kg*d), $ABC_{0-12 h}$ (1918.6 h*ng*mL/mg*Kg*d) y menor CL (0.133 L/h), mientras que, los grupos con genotipo *CYP3A5*1*1* y *CYP3A5*1*3* mostraron una mayor dosis (0.15 y 0.13 mg/Kg/d) una menor C_{max}/D (80.7 y 149.7 ng*mL/mg*Kg/d), menor ABC_{0-12h} (537,3 y 848,7 h*ng*mL/mg*Kg*d) y un mayor aclaramiento (0.527 y 0.374 L/h) respectivamente (47). Los grupos con genotipo *CYP3A5*1*1* y *CYP3A5*1*3* presentaron 57.1% de rechazos agudos, mientras que el grupo *CYP3A5*3*3* mostró 27.6% de rechazos [48].

En un estudio realizado a 241 pacientes con tacrolimus durante el primer año post trasplante renal se realizó genotipificación para: *CYP3A5*3*, *CYP3A4*22*, *CYP3A4*1B*, y *ABCB1*; obteniéndose como resultado que los pacientes que expresaban *CYP3A5* ameritaban significativamente dosis mayores de tacrolimus. Se concluye que el impacto del alelo *CYP3A4*22* en la farmacocinética de tacrolimus como segundo factor genético significativo sumado al alelo *CYP3A5*1* influye en las concentraciones sanguíneas para el ajuste de dosis de pacientes con trasplante renal. [51]

En 2008 se estudiaron 136 pacientes y se correlacionó el polimorfismo *CYP3A5* con la dosis diaria requerida de tacrolimus. Se realizó seguimiento a la semana 6 meses y 12 meses posterior al trasplante. Los polimorfismos *CYP3A5*1*1* requirieron una dosis mayor de tacrolimus, que el genotipo *CYP3A5*3/*3* que requirió dosis menores. Los resultados prevalecieron constantes a lo largo del seguimiento a 6 y 12 meses. [41]

Un estudio realizado a 99 pacientes, 49 con tratamiento de tacrolimus y 50 con ciclosporina, para determinar la influencia de las variantes alélicas de los polimorfismos CYP3A5 y CYP3A4 en las concentraciones de ambos fármacos. Se observó que las variantes intrónicas 6 C>T para CYP3A4 y el alelo CYP3A5*3, ameritaron de 1.6 a 2.0 veces más la dosis convencional de ambos fármacos, especialmente de tacrolimus. Concluyeron que dichos polimorfismos están asociados a alteraciones en el metabolismo de ciclosporina y micofenolato. Por lo que sugieren la realización de genotipificación de los pacientes pretrasplante para ajustar dosis de acuerdo a genotipo y disminuir riesgo de nefrotoxicidad. [52]

Otros estudios han demostrado tanto en trasplante renal como hepático una asociación significativa entre niveles bajos de tacrolimus y rechazo, y las altas concentraciones con presencia de nefrotoxicidad. El monitoreo de niveles valle o pre-dosis de sangre entera sigue siendo el método de elección. Con el fin de obtener un balance óptimo de eficacia terapéutica y la ocurrencia de efectos adversos, los médicos deben individualizar la terapia farmacológica de los pacientes. Debido a que todos los pacientes tienen variabilidad en ambas, farmacocinética y farmacodinamia, obtener la meta siempre es complicado. El objetivo de una ventana terapéutica, especialmente en regímenes combinados debe ser definida para evitar infra-exposición con un incremento en el riesgo de rechazo o sobre exposición con riesgo de toxicidad. Debido a que el riesgo de rechazo disminuye a través del tiempo, la ventana terapéutica para una droga inmunosupresora debe variar también con el tiempo. Además, como se ha demostrado los inhibidores de la calcineurina inducen nefrotoxicidad, por lo que el riesgo acumulativo para toxicidad se incrementa con el tiempo. [69]

La terapia con monitoreo farmacológico, está basada en la teoría que un incremento proporcional de la dosis va a resultar en un incremento proporcional de la exposición al fármaco. Aunque los datos en población de mantenimiento muestran cierta linealidad, en algunos casos como es en el período de post-trasplante temprano, la absorción de las drogas puede cambiar obviamente y puede NO SER LINEAL. [69] Los primeros ensayos clínicos que evaluaron tacrolimus sin monitorear niveles en sangre, ocasionaron neuro y nefro toxicidad. La farmacocinética de tacrolimus es altamente variable. Sin embargo, otros estudios de pacientes trasplantados de riñón e hígado mostraron una significativa asociación con la concentración de niveles bajos de tacrolimus con rechazo y alta concentración con nefrotoxicidad. [69]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se proporciona una dosis estándar a todos los pacientes con trasplante renal que se ajusta según los niveles en sangre, una vez que se ha alcanzado el estado estacionario. Algunos pacientes pueden tardar en alcanzar los niveles objetivo más de una semana y otros pueden llegar a tener niveles tóxicos con la misma dosis, cualquiera de las dos situaciones repercute en la sobrevida del injerto. La dosis de tacrolimus requerida para alcanzar niveles terapéuticos depende del tipo de polimorfismo en las enzimas CYP3A5 de los pacientes. No se sabe si el proporcionar una dosis acorde al genotipo desde el inicio permitirá evitar rechazo y toxicidad por este medicamento.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

- ¿El adjudicar la dosis de tacrolimus por genotipo de *CYP3A5* permite que los pacientes alcancen de una forma más rápida (en la primera semana) niveles terapéuticos, que aquellos a quienes se les proporciona dosis convencional?
- Ésta asignación de dosis de acuerdo a genotipo *CYP3A5* y la obtención de niveles terapéuticos de forma mas efectiva ¿permite la disminución de episodios de rechazo y nefrotoxicidad?

JUSTIFICACIÓN.

La sobrevida del injerto renal, depende en gran porcentaje de la efectividad de la inmunosupresión administrada, lo que evita episodios de rechazo. La supervivencia del injerto también se ve alterada por la nefrotoxicidad de los fármacos inmunosupresores.

El estrecho índice terapéutico de los fármacos inmunosupresores como el tacrolimus amerita una estrecha vigilancia por la variabilidad inter e intra individual y las consecuencias en la supervivencia del injerto que de ellas se derivan, por lo que es importante establecer nuevas estrategias de dosificación y monitorización para optimizar el seguimiento terapéutico.

El alto costo en salud mental y física así como económico de las terapias de rechazo, obliga a realizar estudios como el presente, para mejorar las condiciones del paciente trasplantado renal.

Los pacientes pediátricos a lo largo de su vida necesitarán más de un injerto renal por lo que es importante optimizar las condiciones para una mejor supervivencia del injerto.

OBJETIVOS:

- Identificar si la genotipificación de *CYP3A5* y la consecuente administración de dosis propuesta de tacrolimus de acuerdo a este genotipo pre trasplante, permite alcanzar niveles terapéuticos, en la primera semana del postquirúrgico y mantener constantes los niveles posteriormente.
- Determinar si existe una relación positiva entre la determinación de genotipo *CYP3A5* pre trasplante y la dosificación propuesta de acuerdo a ella, con la sobrevida del injerto, lo cual se medirá a través de la disminución de el número de episodios de rechazo agudo, rechazo crónico y nefrotoxicidad en el primer año.

HIPÓTESIS

- Los pacientes en quienes se proporciona dosis de tacrolimus de acuerdo genotipo *CYP3A5* pre trasplante renal, alcanzarán niveles terapéuticos de tacrolimus más rápido (dentro de la primera semana después del trasplante) que aquellos a quienes se les proporciona dosis convencional.
- Los pacientes que reciben dosis de tacrolimus de acuerdo a genotipo *CYP3A5* presentarán disminución de 17% de episodios de rechazo y nefrotoxicidad en comparación con el grupo control a los 12 meses de seguimiento.

METODOLOGÍA

Estudio de pruebas diagnósticas Fase V según Feinstein, Fase IV según Sackett.

Ensayo clínico, simple ciego, aleatorizado simple.

Experimental, longitudinal, prospectivo, comparativo, de una cohorte de pacientes pediátricos en programa de trasplante renal, que recibieron régimen inmunosupresor con tacrolimus después del trasplante. Tipo de maniobra: adaptativa.

Criterios de Inclusión

1. Pacientes pediátricos, menores de 18 años, de Marzo de 2013 a Septiembre de 2015.
2. Ambos géneros
3. Que recibieron inmunosupresión con formulación de tacrolimus una vez realizado el trasplante.
4. Contar con la firma del padre o tutor del consentimiento informado y asentimiento del paciente (en mayores de 6 años)

Criterios de Exclusión

1. Pacientes a los cuales no se tomó muestra suficiente durante el estudio.
2. Pacientes de los que no se obtuvieron los datos completos durante el seguimiento.

Criterios de Eliminación

1. Deseo voluntario de abandonar el estudio
2. Pacientes en quienes se documentó falta de persistencia terapéutica.

Los pacientes que se incluyeron en el estudio se aleatorizaron de forma simple, mediante tabla de número aleatorios en dos grupos:

Grupo A: Pacientes en lista de espera de trasplante renal, a quienes se realizó genotipo antes del trasplante de *CYP3A5* y se proporcionó dosis de tacrolimus de acuerdo al genotipo, al momento del trasplante de la siguiente forma:

1. Genotipo *CYP3A5* AA *1*1 (metabolizador rápido) Recibieron 0.20 mg/kg/día dosis inicial y se ajustó según niveles en valle de tacrolimus.
2. Genotipo AG *1*3 heterocigoto (metabolizador intermedio). Recibieron dosis inicial de 0.15 mg/kg/día y se ajustó según niveles en valle de tacrolimus
3. Genotipo GG *3*3. (metabolizador lento. Recibieron dosis inicial 0.10 mg/kg/día y ajustó según niveles en valle de tacrolimus.

Grupo B: Pacientes en lista de espera de trasplante renal, quienes recibieron la dosis de tacrolimus estándar al momento del trasplante.

Dosis de 0.10 mg/kg/día dividido en dos dosis ajustando la dosis para alcanzar niveles terapéuticos en valle de tacrolimus.

Este grupo también fue genotipificado para *CYP3A5*, antes del trasplante renal.

Los niveles terapéuticos se encuentran establecidos en el protocolo de Trasplante Renal del Servicio de Nefrología Pediátrica de la siguiente manera:

PERÍODO (meses)	NIVELES OBJETIVO (ng/mL)
0 – 3	8 – 10
4 – 6	7 – 9
7 – 12	5 – 7

Cálculo del Tamaño de la muestra:

El estudio de NAPRTCS (North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies) reporta que la incidencia de rechazo agudo el primer año es de 13% en los injertos de 2007 a 2010, y en nuestra Institución es de **30%**. Consideramos que al proporcionar una inmunosupresión individualizada obtendremos resultados similares al NAPRTCS es decir, una disminución de 17%.

Al hacer el cálculo del tamaño de muestra empleamos una potencia de 80% y un valor alfa de 0.05 obtuvimos un tamaño de muestra de 49 individuos.

Consideramos un 10% de pérdidas de aquellos pacientes que no completan el año de seguimiento porque regresaron a sus lugares de origen o cumplieron la mayoría de edad. Se planeó un estudio de 55 sujetos por cada brazo seguidos a un año.

Seguimiento:

PERÍODO (meses)	Intervalo de Registro
0 – 3	Cada 7 días
4 – 6	Cada 15 días
7 – 12	Cada 30 días
TOTAL (observaciones)	24

Se registró:

- Tiempo necesario para alcanzar niveles.
- Dosis ponderales de tacrolimus.
- Delta de dosis entre la dosis inicial y cada una de los períodos.
- Delta de niveles valle de tacrolimus.

Se tomó del expediente clínico:

- Datos demográficos.
- Diagnóstico por biopsia renal
- Descripción Histopatológica
- Exámenes de laboratorio
- Tratamiento
- Número de episodios de rechazo
- Número de episodios de nefrotoxicidad.
- Efectos adversos.
- Talla.
- Creatinina sérica
- Tasa de filtrado glomerular, de acuerdo a fórmula de Schwartz. Utilizamos constante de corrección de acuerdo a edad y género. La tasa de filtrado glomerular se estimó con la fórmula de Schwartz (eTFG)(1).
$$eTFG (mL \cdot min / 1,73) = k \frac{L}{Scr} (mg/dL)$$
 en donde: L: talla en cm, Scr: creatinina sérica k: valor constante de 0.55 para niños y niñas adolescentes, y de 0.70 para varones adolescentes.
- Biometría hemática.
- Albúmina sérica.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

VARIABLE NIVEL METODOLÓGICO	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE DATO	ESCALA DE MEDICIÓN
INDEPENDIENTE	Genotipo CYP3A5	Cualitativa Ordinal	Polimorfismos: 1*1* (rápido) 1*3* (intermedio) 3*3* (lento)
DEPENDIENTE	Niveles de Tacrolimus	Cuantitativa Continua	De 0 a 20 ng/L en sangre.
DEPENDIENTE	Tiempo en alcanzar niveles terapéuticos	Cuantitativa Continua	Días
DEPENDIENTE	Rechazo	Cualitativa Ordinal	Según Clasificación Banff 2013
DEPENDIENTE	Nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina	Cualitativa nominal policotómica	Biopsia Renal: Tubulopatía aguda Arteriopatía MAT
DEPENDIENTE	Tasa de Filtrado Glomerular	Cuantitativa Continua	Fórmula de Schwartz
DEPENDIENTE	Dosis de Tacrolimus	Cuantitativa Continua	1*1*: 0.20 mg/k/día 1*3*: 0.15 mg/k/día 3*3*: 0.10 mg/k/día
CONFUSORA	Marca de Medicamento	Cualitativa nominal policotómica	Janssen (Prograf) Pisa Landsteiner (Limustin) Akrocell Vitae (Tenacrine) RAAM (Octralin)
INTERACCIÓN	Fuente del Injerto	Cualitativa nominal policotómica	Cadavérico Vivo Relacionado Vivo No Relacionado
INTERACCIÓN	Tiempo de Isquemia	Cuantitativa Continua	Minutos
INTERACCIÓN	Infección por CMV	Cualitativa nominal dicotómica	SI / NO
INTERACCIÓN	Hemoglobina	Cuantitativa Continua	g/dL
INTERACCIÓN	Albumina	Cuantitativa Continua	g/dL
CONFUSORA	Apego Terapéutico	Cualitativa nominal dicotómica	SI / NO

APEGO TERAPÉUTICO.

DEFINICIÓN ADHERENCIA TERPÉUTICA (SEGÚN LA OMS): el grado en el que la conducta de un paciente, en relación con la toma de medicación, el seguimiento de una dieta o la modificación de hábitos de vida se corresponde con las recomendaciones acordadas con el profesional sanitario. [57]

(PACIENTES CRÓNICOS). ADHERENCIA se define como el número total de días de toma de medicación de acuerdo con las pautas del prescriptor durante el periodo de seguimiento. [58]

PERSISTENCIA se define como el número de días de utilización continua de la medicación durante un período específico. (en el caso de trasplante renal si excede 3 días de NO utilización continua del medicamento se define como que **NO ES PERSISTENTE**. [58]

Un investigador (cegado del expediente clínico) interrogó a los pacientes adolescentes, y a los padres o tutores de los pacientes menores, acerca de las especificaciones de la terapéutica indicada (marca y posología). Los datos fueron comparados con lo asentado por el médico tratante en el expediente clínico. En cada consulta se realizaron maniobras educativas y conductuales referentes al apego terapéutico. [63] Se aplicó encuesta validada, para adherencia terapéutica y se comparó ambos resultados.

METODOLOGÍA PARA LA GENOTIPIFICACIÓN

Recolección de muestras sanguíneas

En tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante, se tomaron 5 mL de sangre periférica a cada paciente, la muestra se mantuvo a 4 C hasta el momento de la purificación de ADN, el cual se extrajo mediante el kit QIAamp ADN mini kit. La concentración y pureza del ADN obtenido se analizó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, para verificar la integridad del ADN.

Primers

Se utilizaron los cebadores ya diseñados en nuestro laboratorio para los genes *CYP3A5*. Los cuales fueron diseñados a partir de la base de datos de genes y genomas de ENSEMBL, del European Bioinformatics Institute Well come Trust sanger Institute y el software PRIMER3 del Whitehead Institute for Biomedical Research. La amplificación de cada uno de los fragmentos se hizo por PCR y los productos obtenidos se analizaron por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, para verificar la correcta correspondencia de la amplificación mediante marcadores de peso molecular.

Purificación de los productos de PCR

Los productos resultantes de la amplificación por PCR, fueron tratados con ExoSAP-IT (USB) para eliminar el exceso de dATP, dCTP, dGTP y dTTP residual.

Reacción de Secuenciación

Los productos de PCR purificados de cada exón de los genes *CYP3A5*, fueron secuenciados en un analizador genético de capilar ABI Prism 310 (Applied Biosystems), se usaron el kit Big Dye Terminator v3.1 para llevar a cabo la reacción de secuenciación. Se analizaron las secuencias mediante un análisis de alineamiento con el software DNAMAN (Lynnon BioSoft).

Descripción de análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva, se expresaron los datos como mediana y rango intercuartil para variables con distribución no normal. Los datos demográficos fueron analizados con ji cuadrada y prueba exacta de Fisher, de igual manera la frecuencia de variantes alélicas en ambos grupos. Las diferencias entre dosis de tacrolimus, niveles valle de tacrolimus, delta de dosis, delta de niveles y tasa de filtrado glomerular calculada fueron evaluadas con prueba de Kruskal-Wallis entre los grupos de acuerdo a variante alélica y tratamiento inicial. El tiempo en alcanzar niveles entre la maniobra y los genotipos fue analizado con curvas de supervivencia de prueba de Kaplan-Meier.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto se apegó a las recomendaciones internacionales para investigación en seres humanos (Declaración de Helsinki 2013), y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>.

Los procedimientos a los que se sometieron los pacientes fueron considerados de riesgo medio. Se tomaron 3 mL de sangre para hacer la determinación de las variantes alélicas de los genes *CYP3A5*.

RECURSOS MATERIALES

El proyecto se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Nefrología Pediátrica y Metabolismo Mineral Óseo, el cual cuenta con la infraestructura para la total realización del proyecto.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

Para la manipulación tanto del material biológico como de los reactivos que se emplearon durante el desarrollo del proyecto fue necesario utilizar de manera permanente elementos de protección personal: bata, guantes y en algunos casos protectores como cubre bocas o lentes, mantenidos en buenas condiciones de higiene. Los desechos generados a partir de las muestras biológicas fueron contenidos dentro de un recipiente rojo, específicamente para líquidos. Las puntas para micro pipetas, tubos, gasas, algodón entre otros instrumentos que estuvieron en contacto con material biológico, se depositaron en un contenedor especialmente para desechos sólidos. En el caso de los desechos punzocortantes se colocaron en un solo recipiente rojo destinado para ese fin. Cada contenedor se encontró debidamente etiquetado. En cuanto al otro tipo de desechos no biológicos empleados para el trabajo de laboratorio. Se depositaron en un recipiente destinado a este tipo de productos.

FINANCIAMIENTO DEL ESTUDIO

El estudio fue financiado por: Fondos Federales.

RESULTADOS.

Realizamos el reporte preliminar de 74 pacientes seguidos a un mes (44 de grupo de dosis convencional y 30 del grupo de asignación de dosis de acuerdo a genotipo).

Las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla 1. La mediana de edad en el grupo de dosis convencional fue mayor que en la maniobra (15 años [RIQ 13.00-16.75], vs 14 años [RIQ 10.75-15.00]), sin embargo la mediana de ambos grupos se encuentra en el grupo etario de adolescentes. La fuente del injerto estuvo distribuida equitativamente en ambos grupos. Hubo un porcentaje más alto de pacientes con un riesgo intermedio para citomegalovirus en el grupo de asignación de dosis de acuerdo al genotipo que en el convencional (86.7% vs. 64%). La causa de la enfermedad renal más frecuente fue indeterminada seguida de uropatía.

La distribución de las variantes alélicas de acuerdo al grupo de dosificación (maniobra) están expresadas en la tabla 2. La variante alélica AA cuenta únicamente con 6 sujetos de estudio (8.1%), mientras que la variante alélica GG cuenta con el mayor número de sujetos 38 (51.4%) de toda la muestra analizada.

El análisis realizado de la muestra fue por Intención de Tratamiento. Las dosis de inicio de tacrolimus en el grupo que se asignó la dosis de acuerdo a genotipo, fueron significativamente mayores que las dosis en el grupo convencional, tabla 3. A pesar de esto, no se evidencian diferencias a favor del grupo de asignación de dosis sino hasta la cuarta semana de seguimiento; donde se observan niveles valle por arriba de 8 ng/mL en las variantes alélicas AA *1*1 [8.90 ng/mL, RIQ (6.62-10.50)] y AG *1*3 [8.60 ng/mL, (6.00-13.30)] en comparación con el grupo de dosis convencional, AA *1*1 [5.35 ng/mL (3.80-5.35)] AG *1*3 [7.50 ng/mL, (7.50-11.45)] alcanzando diferencias estadísticamente significativas ($p=0.038$), figura 1. A su vez el resumen de delta de niveles valle de tacrolimus, que representa el incremento de niveles alcanzados desde la semana uno hasta la semana cuatro, presentó deltas mucho mayores en el grupo de asignación de dosis de acuerdo a genotipo [AA *1*1 5.500 ng/mL (2.800-7.675), AG *1*3 3.500 ng/mL (0.350-8.400)], que en el grupo de dosis convencional [AA *1*1 0.95 (0.100-0.950), AG *1*3 1.700 (-2.950-6.35)] sin alcanzar significancia estadística ($p=0.726$), tabla 3. Nuevamente las variantes alélicas en las que se puede observar diferencias son las que no expresan la proteína.

En la figura 2, se observa como la variante alélica GG *3*3 de ambos grupos mantiene niveles valle por arriba del objetivo para el tiempo de trasplante posterior a la primera semana. En contraste, la variante alélica AG *1*3 tiene un comportamiento muy similar en ambos grupos hacia la tercera semana, presentando una disminución de los mismos hacia la cuarta semana en el grupo de dosis convencional. La variante alélica AA *1*1, presenta un comportamiento errático en el grupo de dosis convencional, mientras que el el grupo de asignación logra alcanzar niveles valle objetivo hacia la cuarta semana de seguimiento, sin embargo el la variante con menor número de pacientes por grupo, por lo que su evaluación del comportamiento ante la maniobra al momento es incierta.

AL evaluar el tiempo en alcanzar niveles de tacrolimus entre ambos grupos de acuerdo a variante alélica, no se encontraron diferencias. La mediana de tiempo para ambos fue la misma, siendo mas eficiente para alcanzar niveles la variante alélica GG *3*3 (semana 1) que la AG *1*3 (semana 2) . No es posible graficar la variante alélica AA *1*1, debido al reducido número de pacientes en cada grupo.

Tabla 1. Características demográficas de los sujetos de estudio de acuerdo a la maniobra

n=74	CONVENCIONAL n=44	ASIGNACIÓN n=30	P
Edad Mediana (RIQ)	15.00 (13.00-16.75)	14.00 (10.75-15.00)	0.066 ♣
Género: n, (%) Femenino Masculino	17 (38.6) 27 (61.4)	19 (63.3) 11 (36.7)	0.058
Fuente del Injerto: n, (%) Vivo Fallecido	18 (40.9) 26 (59.1)	12 (40.0) 18 (60.0)	1.000
Riesgo para CMV: n (%) Bajo Intermedio Alto	1 (2.3) 27 (61.4) 16 (36.4)	0 26 (86.7) 4 (13.3)	0.056
Diagnóstico: n, (%) Desconocido Uropatía Glomerulopatía Otra	24 (63.2) 8 (18.2) 11 (25.0) 1 (2.3)	14 (36.8) 10 (33.3) 5 (16.7) 1 (2.3)	0.467

Chi cuadrada y Prueba exacta de Fisher, para un valor de p significativo $<0.05^*$

♣ Diferencias obtenidas mediante prueba de U de Mann-Whitney.

CMV: Citomegalovirus, RIQ: Rango Intercuartil, n=Tamaño de muestra.

Tabla 2. Polimorfismos de CYP3A5 de los sujetos de estudio de acuerdo a la maniobra.

Variante Alélica	CONVENCIONAL n=44	ASIGNACIÓN n=30	TOTAL	<i>p</i>
AA *1*1 n, (%)	2 (4.5) ♣	4 (13.3) ♣	6 (8.1) ♣	0.009*
AG *1*3 n, (%)	13 (29.5)	17 (56.6)	30 (40.5)	
GG *3*3 n, (%)	29 (66)	9 (30)	38 (51.4)	
TOTAL	44	30	74	

Chi cuadrada y Prueba exacta de Fisher ♣

Tabla 3. Cambios en los diferentes parámetros evaluados durante las cuatro semanas de acuerdo a Genotipo y Maniobra: Dosis Tacrolimus mg/kg/día, Niveles Valle Tacrolimus, TFG ml/min/1.73 m².

SEMANA UNO.							
n=74	AA *1*1 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=4)	AA *1*1 Convencional (n=2)	AG *1*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=17)	AG *1*3 Convencional (n=13)	GG *3*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=9)	GG *3*3 Convencional (n=29)	<i>p</i>
Dosis Inicial [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.191 (0.132-0.199)	0.086 (0.085-0.086)	0.121 (0.108-1.52)	0.080 (0.054-0.090)	0.108 (0.103-0.141)	0.085 (0.064-0.095)	0.000*
Dosis a la primera semana [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.192 (0.106-0.227)	0.125 (0.120-0.125)	0.150 (0.140-0.187)	0.136 (0.105-0.160)	0.120 (0.100-0.142)	0.100 (0.080-0.134)	0.001*
Niveles Valle de Tacrolimus [ng/mL] (Mediana, RIQ 25-75)	2.95 (1.40-4.70)	4.40 (2.00-4.40)	4.40 (2.55-8.20)	5.20 (3.20-9.00)	6.60 (5.45-11.80)	9.20 (6.20-12.20)	0.004*
TFG [ml/min/1.73] (Mediana, RIQ 25-75)	87.18 (63.00-190.78)	106.35 (85.93-106.35)	74.25 (47.17-92.46)	63.38 (39.8-104.57)	86.77 (57.86-134.35)	92.61 (65.73-107.39)	0.636
Delta de dosis del día cero a la semana uno [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.0000 (-0.0262-0.0292)	0.0390 (0.0349-0.0390)	0.0410 (-0.0010-0.0590)	0.0500 (0.0345-0.0800)	0.000 (-0.0040-0.0230)	0.028 (-0.0009-0.0475)	0.033*
SEMANA DOS.							
n=74	AA *1*1 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=4)	AA *1*1 Convencional (n=2)	AG *1*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=17)	AG *1*3 Convencional (n=13)	GG *3*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=9)	GG *3*3 Convencional (n=29)	<i>p</i>
Dosis a la segunda semana [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.291 (0.175-0.426)	0.190 (0.170-0.190)	0.220 (0.197-0.295)	0.160 (0.125-0.165)	0.140 (0.095-0.182)	0.120 (0.090-0.145)	0.000*
Niveles Valle de Tacrolimus [ng/mL] (Mediana, RIQ 25-75)	4.60 (1.10-5.47)	12.05 (6.50-12.05)	7.30 (4.85-9.95)	6.60 (5.45-10.60)	12.00 (8.50-14.20)	11.80 (8.80-16.00)	0.000*
TFG [ml/min/1.73] (Mediana, RIQ 25-75)	87.18 (63.00-107.25)	76.22 (76.06-76.22)	70.12 (57.06-110.39)	73.15 (49.59-104.23)	93.50 (73.32-116.80)	98.63 (68.42-108.96)	0.847
Delta de dosis de la semana uno a la dos [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.0800 (0.0495-0.2372)	0.0650 (0.0500-0.0650)	0.0700 (0.0125-0.1275)	0.0300 (-0.0100-0.0500)	0.0250 (-0.0315-0.0400)	0.0200 (0.0000-0.0425)	0.014*
Delta de Niveles de Tacrolimus de la semana uno a la dos [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	1.100 (-2.275-2.300)	7.650 (4.500-7.650)	1.700 (-0.800-4.350)	2.900 (-0.950-4.350)	3.300 (-0.350-8.150)	4.700 (-1.900-7.950)	0.531
SEMANA TRES							
n=74	AA *1*1 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=4)	AA *1*1 Convencional (n=2)	AG *1*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=17)	AG *1*3 Convencional (n=13)	GG *3*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=9)	GG *3*3 Convencional (n=29)	<i>p</i>
Dosis a la tercera semana [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.338 (0.203-0.561)	0.170 (0.140-0.170)	0.250 (0.200-0.300)	0.160 (0.133-0.180)	0.120 (0.074-0.150)	0.120 (0.080-0.150)	0.000*
Niveles Valle de Tacrolimus [ng/mL] (Mediana, RIQ 25-75)	6.95 (6.57-7.70)	5.60 (5.10-5.60)	7.90 (6.85-13.25)	8.80 (7.00-12.45)	8.80 (6.67-11.10)	11.70 (9.40-14.45)	0.009*
TFG [ml/min/1.73] (Mediana, RIQ 25-75)	81.91 (72.58-132.45)	94.83 (85.93-94.83)	80.14 (67.43-128.79)	82.00 (60.73-126.50)	95.66 (71.43-123.43)	98.31 (68.67-117.63)	0.983
Delta de dosis de la semana dos a la tres [mg/kg]	0.0510 (0.0232-0.1357)	-0.0200 (-0.0300 - 0.0200)	0.0090 (-0.0100-0.0370)	0.0000 (0.0000-0.0135)	-0.0050 (-0.0475-0.0000)	0.0000 (-0.0150-0.0100)	0.009*

(Mediana, RIQ 25-75)							
Delta de Niveles de Tacrolimus de la Semana dos a la tres [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	2.900 (1.175-5.975)	-6.450 (-11.50- -6.450)	1.200 (0.350-5.400)	1.400 (-1.65-5.00)	-3.000 (-4.525-0.825)	1.000 (-5.200-3.600)	0.079
SEMANA CUATRO							
n=74	AA *1*1 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=4)	AA *1*1 Convencional (n=2)	AG *1*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=17)	AG *1*3 Convencional (n=13)	GG *3*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=9)	GG *3*3 Convencional (n=29)	p
Dosis a la cuarta semana [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.338 (0.194-0.725)	0.175 (0.150-0.175)	0.250 (0.195-0.297)	0.120 (0.090-0.180)	0.120 (0.088-0.174)	0.094 (0.070-0.128)	0.000*
Niveles Valle de Tacrolimus [ng/mL] (Mediana, RIQ 25-75)	8.90 (6.62-10.50)	5.35 (3.80-5.35)	8.60 (6.00-13.30)	7.50 (7.50-11.45)	9.85 (6.50-18.77)	12.05 (8.67-14.35)	0.038*
TFG ml/min/1.73] (Mediana, RIQ 25-75)	91.16 (81.15-135.09)	85.73 (76.38-85.73)	88.00 (62.90-119.36)	82.00 (62.44-118.05)	87.38 (75.74-102.19)	100.58 (73.83-116.75)	0.828
Delta de dosis de la semana tres a la cuatro [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.0000 (-0.0095-0.164)	0.0050 (0.0000-0.0050)	0.0000 (-0.0285-0.0205)	0.0000 (-0.0400-0.0020)	0.0000 (-0.0136-0.0365)	-0.0020 (-0.0295-0.000)	0.528
Delta de Niveles Valle de la semana tres a la cuatro [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	1.90 (-0.32-3.22)	-0.25 (-1.30- -0.25)	0.00 (-5.45-4.25)	-1.30 (-7.20-2.25)	2.25 (-2.00-11.02)	-0.25 (-3.90-4.42)	0.537
RESUMEN DE DELTAS SEMANA UNO A SEMANA CUATRO							
n=74	AA *1*1 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=4)	AA *1*1 Convencional (n=2)	AG *1*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=17)	AG *1*3 Convencional (n=13)	GG *3*3 Asignación de acuerdo a Genotipo (n=9)	GG *3*3 Convencional (n=29)	p
Resumen Delta de dosis del día cero a la semana cuatro [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	0.1390 (0.0582-0.5370)	0.0890 (0.0649-0.0890)	0.1250 (0.0810-0.1630)	0.0840 (0.0280-0.0965)	0.0000 (-0.0220-0.0520)	0.0284 (-0.0132-0.0484)	0.000*
Resumen Delta de Niveles Valle de la semana uno a la cuatro [mg/kg] (Mediana, RIQ 25-75)	5.500 (2.800-7.675)	0.95 (0.100-0.950)	3.500 (0.350-8.400)	1.700 (-2.950-6.35)	-0.500 (-6.35-10.50)	0.600 (-2.25-6.25)	0.726

Kruskal-Wallis, para un valor de p significativo <0.05*

Figura 1. Niveles valle de tacrolimus de las distintas variantes alélicas de acuerdo al grupo de tratamiento en la cuarta semana de seguimiento.

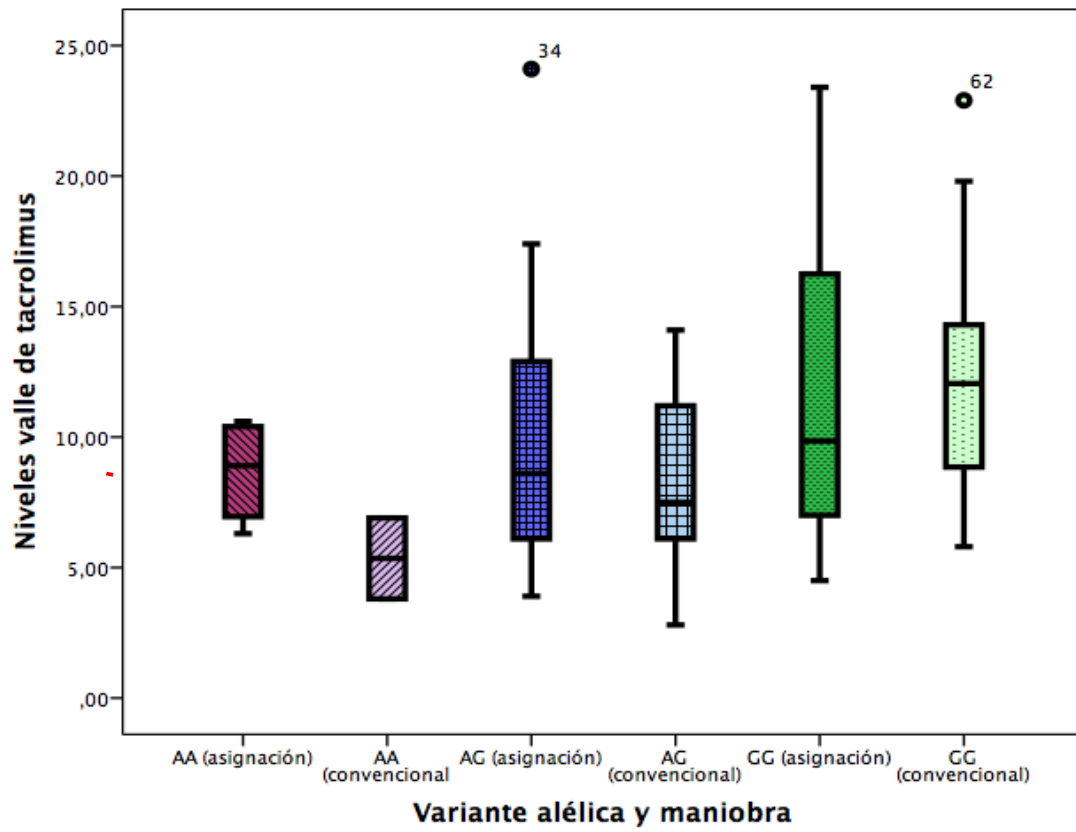


Figura 2. Mediana de niveles valle de tacrolimus de acuerdo a variante alélica y grupo de tratamiento durante las cuatro semanas después del trasplante renal.

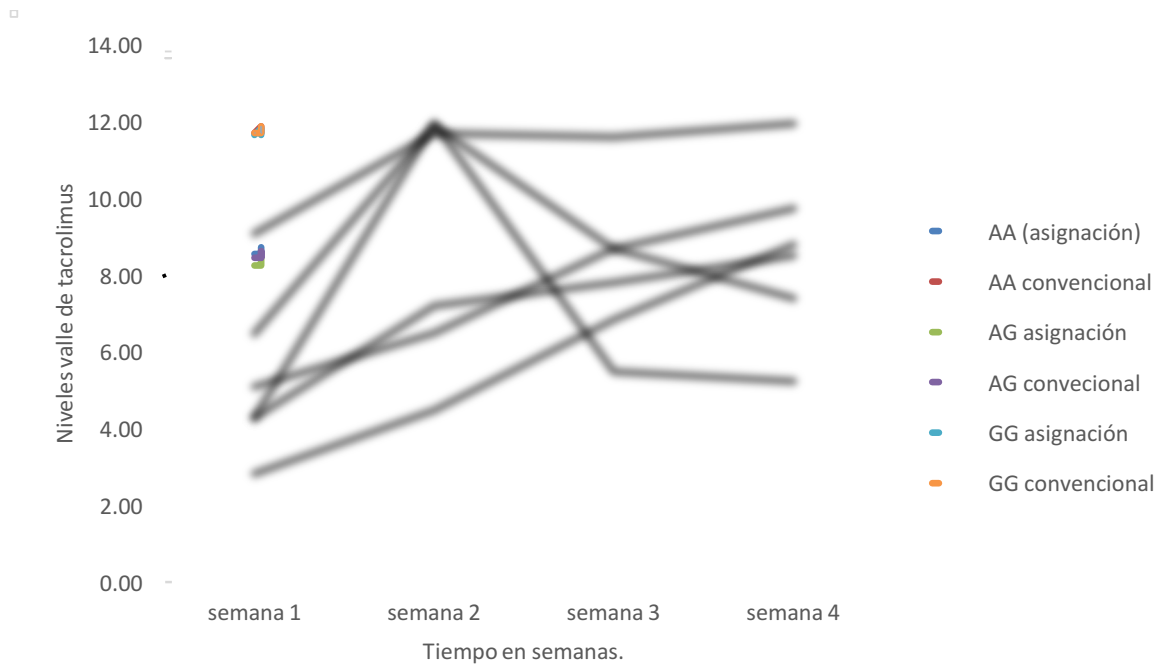
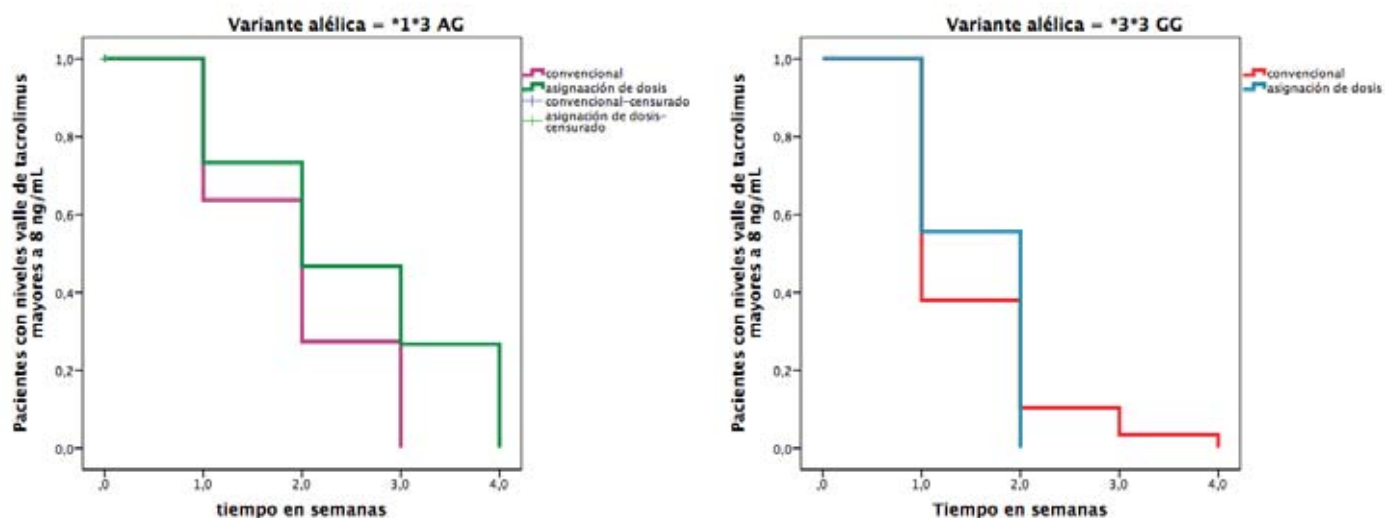


Figura 3. Análisis por intención de tratamiento. Kaplan-Meier del tiempo en alcanzar niveles valle objetivo de tacrolimus de acuerdo a variante alélica y grupo de tratamiento.



VARIANTE ALÉLICA Y GRUPO DE TRATAMIENTO	MEDIA DE TIEMPO (SEMANAS)	MEDIANA DE TIEMPO (SEMANAS)	LOG-RANK
AA *1*1 Asignación	4.00	4	0.123
AA *1*1 Convencional	2.00	2	
AG *1*3 Asignación	2.46	2	
AG *1*3 Convencional	1.90	2	
GG *3*3 Asignación	1.55	1	
GG *3*3 Convencional	1.51	1	

DISCUSIÓN.

La frecuencia de polimorfismos de *CYP3A5* en nuestra serie con 51.4% de sujetos que no expresan la proteína coincide con lo previamente reportado en población mexicana. [47]

En nuestro estudio el grupo de no expresadores de la proteína (GG *3*3) que recibieron la dosis convencional, es decir la más baja (0.10 mg/kg/día) alcanzaron los niveles objetivo dentro de la primera semana, confirmando así que esta variante alélica es la más eficiente en términos de tiempo en alcanzar niveles objetivo de tacrolimus. Lo anterior también ha sido evidenciado en otras publicaciones, demostrando la deficiente exposición a tacrolimus de la variante alélica que expresa la proteína 1, en *CYP3A5* para tacrolimus, y sugieren la individualización de la dosis inicial acorde a genotipo. [72]

La influencia de la expresión del genotipo *CYP3A5* en el metabolismo de tacrolimus es muy clara, en un grupo pediátrico de 48 pacientes donde el grupo que expresa la proteína presentaba niveles más bajos en el post-trasplante, coincide con lo que reporta nuestro estudio, ya a pesar de la maniobra, el genotipo sigue siendo un fuerte factor de impacto para alcanzar niveles valle. [70]

También ha sido reportada la influencia de los genotipos en el tiempo para alcanzar niveles en 38 pacientes donde muestran que quienes expresan la proteína no alcanzaban los niveles objetivo incluso después de meses de iniciado el tratamiento, en contraste con los que no expresaban la proteína que alcanzaron los niveles objetivo dentro de las primeras dos semanas. [71]

En un estudio realizado en Japón, se reportó el seguimiento de pacientes, a los que se les administró formulación de tacrolimus de liberación prolongada. Las dosis ajustadas a niveles valle del fármaco fueron mayores en la variante alélica *3*3, mientras que en la variante *1 fueron menores (0.97 vs 0.59 ng/ml/mg p=0.001) siendo evidente la influencia del genotipo hasta el día 14 de la administración del fármaco. [79] Éstos hallazgos son contrarios a nuestro estudio, ya que la variante alélica con mayores requerimientos de dosis para alcanzar niveles valle objetivo fue la *1 y el tiempo en alcanzar niveles valle objetivo para la variante alélica *3*3 fue de una semana. Cabe mencionar que en el estudio japonés se, utilizó una presentación de tacrolimus de liberación prolongada, lo que pudo influir en los resultados. Sin embargo nuestros resultados coinciden con otro estudio realizado en Francia, con tacrolimus de liberación prolongada, pero en una muestra de pacientes pediátricos. Dicho estudio reportó que los pacientes con presencia del genotipo 3*3 tienen una menor depuración de tacrolimus que los sujetos con genotipo 1*3. [80]

Los resultados preliminares que reportamos del ensayo clínico, no muestran diferencias significativas en los grupos que expresan la proteína respecto al tiempo, sugiriendo inicialmente que la influencia del genotipo en la exposición a tacrolimus es más grande que los incrementos constantes de dosis, aunque éstos se hagan desde etapas tempranas del trasplante. En China analizaron la presencia del genotipo P450 oxirreductasa *POR*28* y lo compararon con los expresadores de proteínas de *CYP3A5*. Encontraron que hay menor exposición al fármaco en los homocigotos y pacientes con el alelo T del *POR*28* en población china. [73] En el presente estudio, no se realizó reacción de secuenciación para dicho polimorfismo, sin embargo puede ser una variante alélica que influya en la disposición del fármaco y deberá tomarse en cuenta en investigaciones futuras.

El polimorfismo de *CYP3A4*22*, también se ha descrito como una variante alélica de las enzimas metabolizadoras de tacrolimus. Reportan que los valores de C_0 son significativamente más elevados (media 23 ng/mL) para las variantes alélicas *CYP3A4*1/*22* (heterocigoto), en comparación con la variante *CYP3A4*1*1* (media 15 ng/mL), y asocian el polimorfismo *22 a concentraciones supra terapéuticas del fármaco. [83] No contamos con datos de ésta variante en nuestro estudio, sin embargo las diferencias significativas reportadas, demandan más investigaciones acerca de éstos polimorfismos en nuestra población y su influencia en el metabolismo de los inhibidores de la calcineurina.

La influencia de polimorfismos en la glicoproteína-p, conocida también como *ABCB1*, un transportador de membrana dependiente de ATP, cuya presencia puede limitar la absorción de tacrolimus a nivel intestinal, ha sido controversial. En 2004 se realizó un estudio donde evaluaron la influencia de los polimorfismos de *CYP3A5 A6986G*, *C3435T* y *MDR1 (ABCB1) G2677(A/T)*, en las farmacocinéticas de 28 pacientes, sin encontrar asociación alguna con los polimorfismos de *ABCB1*. [77]

En otro estudio realizado en Arabia Saudita, tampoco encontraron diferencias en las dosis y niveles valle de tacrolimus en los diferentes polimorfismos de *ABCB1*, e inclusive reportan, que no existe fuerte asociación entre los genotipos de *CYP3A5* y las variaciones en la farmacocinética de ésta droga. [81]

Sin embargo, otro estudio donde se evaluaron los diversos polimorfismos de *ABCB1*: *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* y haplotipos: *C-G-C* y *T-T-T*; encontraron una pequeña pero significativa diferencia en los requerimientos de dosis de tacrolimus entre haplotipos y sugieren una asociación menor en la farmacocinética. [78] El presente estudio tampoco evalúa influencia de glicoproteína-p.

Cabe mencionar, que no solamente el genotipo impacta en la disposición de tacrolimus. Además del genotipo *CYP3A5*, una edad menor de 12 años y las interacciones farmacológicas con azoles y esteroides, impactan en la disposición y metabolismo de tacrolimus. [74] No presentamos un análisis de interacciones farmacológicas en éste reporte preliminar.

En un estudio pediátrico con mas de 40 pacientes trasplantados de riñón y el mismo número de trasplante de hígado, demostraron que las dosis requeridas de tacrolimus para niños menores 5 años, fueron significativamente más altas. En el estudio señalan la influencia del genotipo *CYP3A5* en los pacientes receptores de riñón, pero no así, en los pacientes receptores de hígado, y concluyen que ambos cofactores (edad y genotipo) influyen en la disposición de tacrolimus. [82]

En el presente estudio es poco factible realizar un análisis por grupo de edad dado el reducido tamaño de muestra y a que el grupo etario predominante es de adolescentes.

Por otro lado la variante alélica *CYP3A51/3* se ha asociado a mayor prevalencia de hipertensión en después del trasplante. Está demostrado que ambas cifras, sistólica y diastólica, son significativamente más altas en el seguimiento a 6 meses y un año, así como el incremento secundario, de un mayor número de fármacos antihipertensivos. [85] Esto a consecuencia de los picos elevados y prematuros de los pacientes que manifiestan variantes alélicas que expresan la proteína (metabolizadores rápidos) exponiéndolos a vasoconstricción intermitente y nefrotoxicidad. La hipertensión arterial asociada al genotipo de *CYP3A5* no fue el motivo de estudio de la presente investigación, pero la presencia de hipertensión se relaciona al deterioro funcional del injerto a largo plazo, por lo que también debe ser motivo de investigaciones futuras.

Hasta la fecha no se cuenta con otro marcador inmunológico que indique el grado de inmunosupresión en los pacientes después del trasplante. Un estudio realizado a 310 pacientes con trasplante renal que presentaban anticuerpos HLA y MICA positivos después del procedimiento, demostró que los pacientes con niveles valle promedio por arriba de 11 ng/mL presentaron significativamente mayor supervivencia del injerto y menor rango de proteinuria en el seguimiento a 5 años, que aquellos que tuvieron niveles valle de tacrolimus menor o igual a 7 ng/mL. [84] Esto hace de vital importancia contar con niveles adecuados en sangre de los distintos inmunosupresores, para incrementar la supervivencia del injerto.

A pesar de tratarse de resultados preliminares, es evidente que el genotipo tiene una gran influencia en la biodisponibilidad del medicamento. Es necesario incluir a un mayor número de pacientes para completar el tamaño programado de muestra. El análisis de todos los genotipos se ve limitado por el reducido número de pacientes en el grupo de los metabolizadores rápidos, específicamente de la variante alélica AA *1*1 y a su vez, completar el seguimiento a un año para conocer las implicaciones en términos de biodisponibilidad temprana de tacrolimus en la supervivencia del injerto a largo plazo.

CONCLUSIONES.

- La frecuencia de polimorfismos corrobora los datos de la literatura en población mexicana.
- Es prematuro determinar la efectividad de la estrategia de asignar dosis de acuerdo a genotipo, ya que el cálculo del tamaño de muestra es de 110 pacientes (55 por brazo; asumiendo $\beta=20\%$ y $\alpha=0.05$).
- Esperamos que al completar el estudio el impacto de los polimorfismos en el tiempo para alcanzar niveles de tacrolimus pueda definirse.
- El seguimiento de esta cohorte permitirá identificar la utilidad de la estrategia de asignación de dosis y el impacto de dichos polimorfismos en la supervivencia del injerto a largo plazo.

DEBILIDADES DEL ESTUDIO.

- Fue una aleatorización simple y no mediante minimización.
- El cegamiento fue simple (pacientes), ya que al aplicar la maniobra el médico sólo pudo cegarse para el grupo de dosis convencional, no hubo cegamiento del médico tratante para la asignación de dosis.
- El reporte actual es de un seguimiento muy corto.
- En el seguimiento a un mes sólo se utiliza una marca de medicamento para todos los pacientes, sin embargo en el seguimiento posterior se han registrado hasta 9 marcas diferentes de medicamentos (no se muestran los datos en éste estudio).
- La persistencia terapéutica es uno de los parámetros más difíciles de evaluar a pesar de estrategias combinadas y la media de la población que evaluamos (adolescentes) se ha demostrado de alto riesgo para ésta eventualidad.
- La estimación de la Tasa de Filtrado Glomerular es mediante creatinina, por fórmula de Schwartz, que se ha demostrado es más imprecisa al sobreestimarla.
- No se realizó evaluación de otros polimorfismos reportados debido a la falta de recursos.

FORTALEZAS DEL ESTUDIO.

- Es un ensayo clínico aleatorizado en pacientes pediátricos.
- Innovador. Se cuenta con pocos estudios de tipo ensayo clínico, realizados en población pediátrica, donde se realice una maniobra relacionada con los polimorfismos de *CYP3A5*, al metabolismo de tacrolimus.
- Se incluyeron todos los grupos de edad lo que permite en futuros análisis corregir el modelo por edad.
- Seguimiento regular de los pacientes. El corto tiempo permite que no haya pérdidas el seguimiento de los sujetos.
- Se realizó genotipificación de las variantes alélicas más comunes y descritas a nivel mundial
- La genotipificación fue mediante secuenciación.
- En éste primer corte se utilizó una sola marca de medicamento para todos los sujetos. Pisa.
- Se tomo en cuenta la tasa de filtrado glomerular como parte de la evaluación del estudio, y no solo el tiempo, así mismo se evaluaron deltas en el tiempo.

ANEXOS

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: ASIGNACIÓN DE DOSIS DE TACROLIMUS SEGÚN GENOTIPO EN NIÑOS EN TRASPLANTE RENAL CON LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO A 12 MESES.

Introducción

Deseamos invitarlo a participar en este estudio de investigación que se llevará a cabo en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Su participación es voluntaria. Usted puede decidir no participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento. En cualquier caso no perderá ninguna forma de atención médica en el Hospital.

La investigación puede proporcionar información que ayude, en el futuro inmediato a otros niños con la misma enfermedad que la de su hijo(a).

Antes de decidir participar, lea con cuidado el presente documento y tómese el tiempo que requiera para realizar cualquier pregunta o discutir éste estudio con cualquier persona que participe en la investigación, con su familia o con cualquier otro profesional de la salud.

Finalidad del estudio

El tacrolimus es un medicamento que su hijo(a) recibirá para prevenir el rechazo del riñón trasplantado. El uso de estos medicamentos requiere que se vigilen los niveles en sangre ya que niveles bajos pueden favorecer el rechazo y niveles altos favorecer la toxicidad en el riñón por éste medicamento.

Se sabe que los niveles de los medicamentos pueden variar en cada persona dependiendo de las enzimas que se encargan de sacarlo de la sangre y la cantidad de la enzima está determinada por las variantes genéticas que cada individuo presenta.

El propósito del estudio es estudiar los genes que regulan dichas enzimas las cuales participan en la absorción y el metabolismo del tacrolimus. Además pueden ser las responsables de los efectos adversos de estos medicamentos.

Procedimiento del estudio.

Si usted acepta que su hijo participe en éste estudio solamente se le puncionará una vena del brazo, para obtener el ADN de su hijo con el cual se hará el estudio genético de las enzimas encargadas de metabolizar y eliminar el tacrolimus. Se tomará un volumen total de 3 mL de sangre. Los resultados se proporcionarán al médico tratante.

Riesgo y molestias

Su niño puede presentar dolor en el sitio de la punción venosa; éste dolor cede en los siguientes minutos después de la punción.

Beneficios

El conocer el genotipo de las enzimas que manejan el tacrolimus y el micofenolato permitirá ajustar mejor la dosis de los medicamentos y así disminuir el riesgo de rechazo del riñón trasplantado o el riesgo de toxicidad.

Procedimientos alternativos y costos

La obtención de la muestra y todo el estudio no tendrá costo para usted.

Accesibilidad de los investigadores y confidencialidad

Los médicos que atienden a su hijo estarán en todo momento dispuestos a responder a todas sus preguntas e inquietudes respecto a los resultados del estudio que se realizará a su hijo.

Se le asegura que toda la información que nos proporcione y la que resulte de las pruebas realizadas en su muestra de sangre serán mantenidas con absoluta confidencialidad y solo serán usadas para los fines de ésta investigación.

Durante el estudio usted recibirá información de los resultados que se vayan obteniendo del mismo, con el fin de actualizar ante usted la información científica al respecto para que usted pueda tomar las decisiones siguientes con mayor fundamento.

Normas acerca de las lesiones relacionadas con la investigación

Cualquier efecto colateral que se derive de la toma de la muestra de sangre será atendido prontamente con los recursos del Hospital.

Problemas o preguntas

Si surgiera alguna duda o inquietud sobre los procedimientos del estudio o la participación de su hijo(a) por favor póngase en contacto con la Dra Mara Medeiros Domingo o la Dra en C María Inés del Pilar García Roca o la Dra Ana Catalina Alvarez Elías en el Laboratorio de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo, en el 4º piso del edificio de Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez, o comuníquese al teléfono 5228-9917 extensión 4410.

Documento de consentimiento

Usted puede decidir no participar en el estudio. En cualquier caso, no perderá ninguna prestación a la que tenga derecho. Le sugerimos que conserve copia de éste documento para consultarlo posteriormente.

He leído o se nos han leído y explicado a nuestra satisfacción la presente carta de consentimiento, se me ha dado la oportunidad de expresar todas mis dudas e inquietudes relacionadas con el presente estudio de investigación, y estoy de acuerdo con los propósitos y procedimientos del mismo.

Por este medio otorgo mi consentimiento para que mi hijo(a) participe en el estudio.

Nombre y firma del niño(a) _____ Edad _____
Fecha _____ No. de Registro _____

Nombre y firma de madre, padre o tutor o responsable

Testigo 1

Nombre _____

Dirección _____

Relación con el paciente _____

Firma _____

Testigo 2

Nombre _____

Dirección _____

Relación con el paciente _____

Firma _____

Nombre de los investigadores con quienes puede referirse el familiar en caso de duda:
Dra. Mara Medeiros Domingo y/o Dra. María Inés del Pilar García Roca. Departamento de
Nefrología en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tel 5228-9917 ext 2366.

Firma de el o los investigadores responsables _____

**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA**

CARTA DE ASENTIMIENTO

Título del estudio: ASIGNACIÓN DE DOSIS DE TACROLIMUS SEGÚN GENOTIPO EN NIÑOS EN TRASPLANTE RENAL CON LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO A MESES.

INTRODUCCIÓN

Te pedimos que participes en este estudio de investigación que se llevará a cabo en el Hospital Infantil de México. No tienes que participar en el estudio si no quieres.

Se quiere conocer como maneja tu cuerpo las medicinas para tu riñón trasplantado.

Si decides entrar al estudio se tomará una muestra de sangre antes de tu trasplante.

El doctor te revisará para ver que todo esté bien, medirá que tan rápido late tu corazón y qué tan rápido estás respirando, también medirá tu presión arterial, revisará tu peso, la estatura y la temperatura. Después tomará una la muestra de sangre. Trataremos de hacer las cosas de forma que no duela tanto, pero a veces el piquete duele un poco y puede dejar un moretón.

Cuando el doctor te haga una pregunta es importante que contestes la verdad.

Puedes hacerle todas las preguntas que quieras. Tu participación en el estudio puede ayudar a otros niños.

Tus papás tienen que dar el permiso para que estés en el estudio y no tendrán que pagar nada por esto.

Si no quieres estar en el estudio, puedes irte y nadie se enojará contigo por esto.

_____ Si quiero entrar al estudio.

_____ No, no quiero entrar al estudio.

Nombre del niño _____.

Edad en años _____ Registro _____ Fecha _____

Declaración de los padres o Guardián:

Mi hijo parece entender el estudio en la medida de su capacidad y ha aceptado participar.

Nombre del padre o guardián _____

Firma _____ Fecha _____

Relación con el paciente _____

Dirección y teléfono _____

Testigo 1

Nombre _____

Dirección _____

Relación con el paciente _____

Firma _____

Testigo 2

Nombre _____

Dirección _____

Relación con el paciente _____

Firma _____

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1839-48.
2. K/DOQI N. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, clasification and stratification. *am J Kidney Dis* 2002;(suppl 1):S1-S266.
3. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296-305.
4. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006;2:288-96.
5. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003;349:1157-67.
6. Medeiros-Domingo M, al. e. Renal transplantation in children. *Rev Invest Clin* 2005;2.
7. Medeiros-Domingo M, Romero-Navarro B, Valverde-Rosas S, Delgadillo R, Varela-Fascinetto G, Munoz-Arizpe R. [Renal transplantation in children]. *Rev Invest Clin* 2005;57:230-6.
8. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:283-95.
9. RN F. Renal transplantation for children the only realistic choice. *Kydney INT* 1985;28:5-15.
10. Najarian JS, Almond PS, Gilliam KJ, Mauer M ea. Renal transplantation first five years of life. *Kidney Int* 1993;44:40-44.
11. Tejani A, K S. Long-term follow-up of grow in children post-transplantation. *Kidney Int* 1993;44:56-58.
12. RN F. Renal transplantation for children the only realistic choice. *Kidney INT* 1985;28:5-15
13. Danovitch G. *Trasplante Renal: Marbán libros*, 2002.
14. Abbas A, LAH. *Inmunología Celular y Molecular*, 2004.
15. Tejani A, K. S. Long-term follow-up of grow in children post-transplantation. *kidney Int* 1993;44:56-58.
16. Friis-Hansen B. Body water compartments in children: changes during growth and related changes in body composition. *Pediatrics* 1961;28:169-81.
17. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
18. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MCR et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody Associated Arterial Lesions. *American Journal of Transplantation* 2014; 14: 272–283.
19. Alexopoulos E, Papagianni A, Tsamelashvili M, Leontsini M, Memmos D. Induction and long-term treatment with cyclosporine in membranous nephropathy with the nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3127-32.
20. Balistreri WF, Heubi JE, Suchy FJ. Bile acid metabolism: relationship of bile acid malabsorption and diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:105-21.
21. Alberu J, Urrea EM. [Immunosuppression for kidney transplant recipients: current strategies]. *Rev Invest Clin* 2005;57:213-24.
22. Reyes-Pérez H, Medeiros-Domingo M. Uso de tacrolimus en pediatría. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006;63:276-85.

23. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:404-30.
24. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2003;63:1247-97.
25. Machida M, Takahara S, Ishibashi M, Hayashi M, Sekihara T, Yamanaka H. Effect of temperature and hematocrit on plasma concentration of FK 506. *Transplant Proc* 1991;23:2753-4.
26. Piekoszewski W, Jusko WJ. Plasma protein binding of tacrolimus in humans. *J Pharm Sci* 1993;82:340-1.
27. Hesselink D, van Gelder T, van Schaik R. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression? *Pharmacogenomics* 2005;6:323-37.
28. Zahir H, McLachlan AJ, Nelson A, McCaughan G, Gleeson M, Akhlaghi F. Population pharmacokinetic estimation of tacrolimus apparent clearance in adult liver transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2005;27:422-30.
29. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression? *Pharmacogenomics* 2005;6:323-37.
30. Reyes H, M. M. Tacrolimus en Pediatría. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006;63:276-85.
31. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, et al. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation* 2001;104:3091-6.
32. Christians U, Braun F, Schidt M KN, et al. Specific and Sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients. *Clin Chemist* 1992;38.
33. Eichelbaum M, Burk O. CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 2001;7:285-7
34. Reyes-Hernandez OD, Arteaga-Illan G, Elizondo G. Detection of CYP3A4*1B and CYP3A4*2 polymorphisms by RFLP. Distribution frequencies in a Mexican population. *Clin Genet* 2004;66:166-8.
35. Reyes-Hernandez OD, Lares-Asseff I, Sosa-Macias M, Vega L, Albores A, Elizondo G. A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations. *Pharmacology* 2008;81:97-103.
36. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-91.
37. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*;49:141-75.
38. MacPhee IA, Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation* 2008;85:163-5.
39. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:914-9.
40. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004;5:243-72.
41. Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;76:1233-5.

42. Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, et al. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* 2004;44:135-40.
43. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004;78:1182-7.
44. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005;79:499-502.
45. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1889-96.
46. Kreuz R, Zurcher H, Kain S, Martus P, Offermann G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;14:665-71.
47. Garcia-Roca P, Medeiros M, Reyes H, et al. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res* 2012;43:283-7.
48. García-Roca MIP. Correlación del genotipo *MDR1(ABCB1)* y *CYP3A5* con el perfil farmacocinético del tacrolimus en niños con trasplante renal. México, DF: CINVESTAV PIN/Hospital Infantil de México Federico Gómez, 2013:1-102.
49. Solez K, Racusen LC, The Banff classification revisited. *Kidney International* (2013) 83, 201–206.
50. Fogo AB, Cohen AH. *Fundamentals of Renal Pathology*. 2006 Springer Science Business Media, LLC
51. Kurzawski M, Dabrowska J, Dziwanowski K, Domanski L, Peruzynska M, Drozdziak M. CYP3A5 and CYP3A4, but not ABCB1 polymorphisms affect tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2014 Feb 15.
52. Laure Elens, Ron H van Schaik, Nadtha Panin, Martine de Meyer, Pierre Wallemacq, Dominique Lison, Michel Mourad Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. Reserch article. *Pharmacogenomics*, October 2011, Vol. 12, No. 10, Pages 1383-1396 , DOI 10.2217/pgs.11.90 (doi:10.2217/pgs.11.90)
53. Staatz CE, Duffull SB, Kiberd B, Fraser AD, Tett SE. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid during the first week after renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:507-16.
54. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:13-58.
55. Esquivel A, Gonzalez-Ramirez R, Alberu J, Gracida C, Medeiros M, Castaneda-Hernandez G. Comparison of dissolution properties of 2 enteric-coated formulations containing mycophenolate sodium: Myfortic vs Femulan. *Transplant Proc* 2010;42:353-6.
56. Shaw LM, Korecka M, van Breeman R, Nowak I, Brayman KL. Analysis, pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *Clin Biochem* 1998;31:323-8.
57. *Adherence to long term therapies: evidence for action*. Geneva: World Health Organization; 2003.
58. Dilla T, Valladares A, Lizán L, Sacristán JA. Adherencia y persistencia terapéutica:

- causas, consecuencias y estrategias de mejora. Elsevier Doyma, Aten Primaria. 2009;41(6):342–348
59. Kofler S, Deutsch MA, Bigdeli AK, et al. Proton pump inhibitor co-medication reduces mycophenolate acid drug exposure in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:605-11.
 60. Van Gelder T, Klupp J, Barten MJ, Christians U, Morris RE. Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2001;23:119-28.
 61. Vietri M, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Mycophenolic acid glucuronidation and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human liver and kidney. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56:659-64.
 62. Vietri M, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Inhibition of mycophenolic acid glucuronidation by niflumic acid in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;58:93-7.
 63. Conde P, Coyo MA, Tosquella R. Cumplimiento del tratamiento en el trasplante renal pediátrico. *Rev Soc Esp Enferm Nefrol* 2010; 13 (3): 173/179.
 64. Nierenberg A, Feinstein A. How to Evaluate a Diagnostic Marker Test. Lessons from the rise and Fall of Dexamethasone Suppression Test. Toward Optimal Laboratory Use. (*JAMA* 1988;259:1699-1702)
 65. Schoeppler KE, Aquilante CL, Kiser TH, Fish DN, Zamora MR. The impact of genetic polymorphisms, diltiazem, and demographic variables on everolimus trough concentrations in lung transplant recipients. *Clin Transplant*. 2014 Mar 13.
 66. Almoguera B, Shaked A, Keating BJ. Transplantation genetics: current status and prospects. *Am J Transplant*. 2014 Apr 14.
 67. Cusinato DA, Lacchini R, Romao EA, Moysés-Neto M, Coelho EB. Relationship of CYP3a5 Genotype and Abcb1 Diplotype to Tacrolimus disposition in Brazilian Kidney Transplant Patients. *Br J Clin Pharmacol*, 2014 Feb 17.
 68. Sackett DL, Haynes RB. Evidence base of Clinical Diagnosis. Education and debate. *BMJ VOLUME* 324 2 MARCH 2002.
 69. Mohammadpour N., Elyasi Spideh., Vahdati N., A Review on Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressant Drugs. *Irinian Journal of Basic Medical Sciences*. March 2011.
 70. Ferraris JR, Argibay PF, Costa L et al. Influence of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus maintenance doses and serum levels after renal transplantation: Age dependancy and pharmacological interaction with steroids. *Pediatric Transplantation*. 2011
 71. Shilbayed S. The Impact of Genetic Polymorphisms on Time Required to attain the target tacrolimus levels and subsequent pharmacodynamic Outcomes in Pediatric Kidney Transplant Patients. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2014
 72. Lunde I, Bramer S, Midtvedt K et al. The influence of CYP3A PPARA and POR genetic variants on the Pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2014
 73. Zhang JJ, Zhang H, Liang X et al. Effecto of the P450 oxidoreductase *28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese Helthy volunteers. *European Journal Clinical Pharmacology*. 2013.
 74. Lalan S, Abdel-Rahman S, Gaedick A et al. Effect of CYP·A% genotype, steroids and azoles on tacrolimus in pediatric renal transplant population. *Pediatric Nephrology*. 2014
 75. Medeiros-Domingo M, Romero-Navarro B, Valverde-Rosas S, et al. Renal transplantation in children. *Rev Invest Clin* 2005;57:230e236.

76. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, Gonzalez-Espinoza L, et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation* 2005;80:47e51.
77. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T, Kato T. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78: 1182-1187 [PMID: 15502717]
78. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW, MacPhee IA. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006; 82: 705-708 [PMID: 16969296].
79. Niioka T, Kagaya H, Saito M, Inoue T, Numakura K, Habuchi T, Satoh S, Miura M. Capability of utilizing CYP3A5 polymorphisms to predict therapeutic dosage of tacrolimus at early stage post-renal transplantation. *Int J Mol Sci.* 2015 Jan 14;16(1):1840-54. doi: 10.3390/ijms16011840. PMID: 25594874
80. Zhao W, Fakhoury M, Baudouin V, Storme T, Maisin A, Deschênes G, Jacqz Aigrain E. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of once daily prolonged-release formulation of tacrolimus in pediatric and adolescent kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013 Feb;69(2):189-95. doi: 10.1007/s00228-012-1330-6. Epub 2012 Jun 17. PMID: 22706623
81. Shilbayeh S, Zmeili R, Almardini RI. The impact of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus dosage requirements and trough concentrations in pediatric renal transplant recipients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2013 Nov;24(6):1125-36. doi: 10.4103/1319-2442.121268. PMID: 24231473
82. de Wildt SN, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Brojeni PY, van der Heiden IP, Parshuram C, Nulman I, Koren G. The interactions of age, genetics, and disease severity on tacrolimus dosing requirements after pediatric kidney and liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011 Dec;67(12):1231-41. doi: 10.1007/s00228-011-1083-7. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21698374
83. Pallet N¹, Jannot AS, El Bahri M, Etienne I, Buchler M, de Ligny BH, Choukroun G, Colosio C, Thierry A, Vigneau C, Moulin B, Le Meur Y, Heng AE, Subra JF, Legendre C, Beaune P, Alberti C, Lorient MA, Thervet E. Kidney transplant recipients carrying the CYP3A4*22 allelic variant have reduced tacrolimus clearance and often reach supratherapeutic tacrolimus concentrations. *Am J Transplant.* 2015 Mar;15(3):800-5. doi: 10.1111/ajt.13059. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25588704.
84. Peng ZG, Tian J. Higher Serum Trough Levels of Tacrolimus Increase 5-Year Allograft Survival in Antibody Positive Renal Transplant Patients. *Clinical Transplantation.* 2014:209-14. PMID: 26281147
85. Torio A, Auyanet I, Montes-Ares O, et al. Effect of CYP3A51/3 polymorphism on blood pressure in renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings.* 2012 Nov;44(9):2596-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.09.047.
86. Taketomo C. K., Hodding J. H., Kraus D. M., Manual de prescripción pediátrica y neonatal. Lexicomp 2013. Inter sistemas.