



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN
INJERTOS RENALES CON TOXICIDAD POR INHIBIDORES DE CALCINEURINA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

MARIO EDUARDO ALAMILLA SÁNCHEZ

Tutor:

**Dr. Guillermo Meléndez Mier
Hospital General de México**

Comité Tutor

**Gloria Queipo García
Hospital General de México**

**Miguel Ángel Fonseca Sánchez
Hospital General de México**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I.	TÍTULO.....	3
II.	IDENTIFICACIÓN DE INVESTIGADORES.....	4
III.	MARCO TEÓRICO.....	5
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
V.	JUSTIFICACIÓN.....	27
VI.	HIPÓTESIS	27
VII.	OBJETIVOS.....	27
VIII.	METODOLOGÍA.....	28
	• DISEÑO DEL ESTUDIO.....	28
	• UNIVERSO.....	28
	• CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN.....	28
	• VARIABLES.....	29
	• PROCEDIMIENTO.....	29
	• ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
	• ASPECTOS ÉTICOS.....	31
IX.	RESULTADOS.....	32
X.	DISCUSIÓN.....	38
XI.	CONCLUSIONES.....	40
XII.	ANEXOS.....	41
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

TÍTULO

**EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN
INJERTOS RENALES CON TOXICIDAD POR INHIBIDORES DE CALCINEURINA**

IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Mario Eduardo Alamilla Sánchez

Alumno de Maestría en Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Sede: Hospital General de México.

Teléfono: 5541334931.

Correo electrónico: silenoz1@hotmail.com]

Guillermo Meléndez Mier

Jefe de registro y seguimiento de proyectos, Hospital General de México.

Dr. Balmis 148, Colonia Doctores

Investigador en ciencias médicas B.

SNI: nivel I.

Teléfono: 5513532474.

Correo electrónico: melendez651@gmail.com

Gloria Queipo García

Jefa del Departamento de Genética, Hospital General de México.

Dr. Balmis 148, Colonia Doctores

SNI: nivel I.

Teléfono:

Correo electrónico: queipo99@yahoo.com

Miguel Ángel Fonseca Sánchez

Investigador en Ciencias Médicas C, del Departamento de Genética.

Hospital General de México.

Dr. Balmis 148, Colonia Doctores.

Correo electrónico: mfonseca_79@hotmail.com

MARCO TEÓRICO

1. Panorama general de la enfermedad renal crónica en el mundo.

1.1. Definición.

La enfermedad renal crónica (ERC) se identifica por la anormalidad funcional, o estructural, renal por un periodo de más de 3 meses, definida comúnmente como una tasa estimada de filtrado glomerular (TFGe) menor de 60 ml/min/1.73 m², o albuminuria persistente(1) (tabla 1).

Marcador de daño renal (1 o más):	Ejemplos:
<ul style="list-style-type: none">- Albuminuria.- Anormalidades del sedimento urinario.- Anormalidades en los electrolitos y estado ácido-base.- Anormalidades estructurales en la histología.- Anormalidades estructurales en imagen.- Antecedente de trasplante renal.	<ul style="list-style-type: none">- Síndrome nefrótico, diabetes.- Cilindros eritrocitarios, glomerulonefritis.- Acidosis tubular renal.- Nefropatía membranosa, lupus eritematoso sistémico.- Enfermedad poliquística renal.- Donador vivo o fallecido.
Reducción de la tasa de filtrado glomerular.	< 60 ml/min/1.73 m ² .

Tabla 1. Criterios de ERC (anormalidades persistentes por 3 meses o más)(2).

1.2. Epidemiología.

La ERC se desarrolló en el 9% de los sujetos incluidos en el estudio de Framingham a 18 años de seguimiento(3). Por su parte, en el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities study) se detectaron entre 4.4 y 8.8 casos por cada 1000 sujetos de estudio durante un seguimiento de 14 años(4). En términos generales, del 10 al 15% de la población general tendrá algún grado de ERC(5), y se incrementa conforme aumenta la edad de la población, la prevalencia de diabetes mellitus, hipertensión arterial, y obesidad.

En Estados Unidos de América, hubo un incremento en la prevalencia de la ERC del 12% al 14% entre los periodos de 1988-1994, y 1999-2004, respectivamente; la

prevalencia de ERC estadio 3-5 se incrementó del 6.2% al 6.5% durante los periodos 1999-2004, y 2007-2014, respectivamente(6); mientras en Inglaterra la prevalencia se redujo del 5.7% al 5.2% durante los periodos 2003 y 2009-2010(7).

Las principales causas de ERC son: diabetes mellitus (44.9%: tipo 1, 3.9%; tipo 2, 41%), hipertensión arterial sistémica (27.2%), glomerulonefritis (8.2%), nefritis intersticial crónica/obstrucción de vía urinaria (3.6%), y enfermedad quística hereditaria o adquirida (3.1%)(8).

La ERC representa una de las primeras diez causas de muerte(9). La tasa de mortalidad es de 110 casos por cada 1000 pacientes-año.

2. Trasplante renal.

2.1. Panorama mundial del trasplante renal.

El mejor tratamiento para la misma es el trasplante renal, pudiendo incrementar la sobrevida y calidad de vida del paciente.

De la década de los 70s a la décadas de los 80s, la sobrevida global del injerto de los pacientes de trasplante renal mejoró al menos 8% al año, 5 y 10 años post-trasplante; para finales de los años 90s el porcentaje de injertos funcionales a 10 años post-trasplante se incrementó al 85%(10). De forma interesante, a pesar de la reducción de las tasas de rechazo agudo, el porcentaje de sobrevida del injerto no ha cambiado a 10 años.

El porcentaje de sobrevida del paciente a 5 años en pacientes con injertos de donación cadavérica es de 86% (Estados Unidos), 90% (Australia y Nueva Zelanda), y 87% (Europa); mientras que la sobrevida del paciente con injerto de donador vivo es de 93% (Estados Unidos), 95% (Australia y Nueva Zelanda), y 94% (Europa)(11). En Japón, en un estudio de seguimiento de pacientes con trasplante renal del periodo comprendido de 1988 al 2012, la sobrevida del paciente a 20 años de seguimiento es del 95% con donación cadavérica o donador vivo; mientras la sobrevida del injerto a 1, 5, 10, y 15 años en trasplante renal de donación cadavérica es del 89%, 80%, 77%, y 34%, respectivamente. Dichas tasas de sobrevida mejoraron drásticamente desde el 2002 (92% para trasplantes de donadores vivos, y 81% para trasplantes de donaciones cadavéricas a 10 años de seguimiento)(12).

A pesar de que el trasplante mejora drásticamente la calidad de vida del paciente con enfermedad renal crónica terminal, los pacientes tienen una esperanza de vida menor a la población general, atribuido principalmente al incremento del riesgo cardiovascular, infecciones, y neoplasias.

2.2. Respuesta inmunológica al injerto.

La respuesta inmunológica dirigida contra el injerto involucra esencialmente a los linfocitos. Éstas células se encuentran previamente estimuladas por antígenos virales que presentan reactividad cruzada con los antígenos HLA. Tanto en el injerto, como en los tejidos circundantes, las células dendríticas del donador y el receptor se movilizan hacia los órganos linfoides secundarios para la co-estimulación a los linfocitos T(13).

La respuesta inmune alogénica se ha atribuido al reconocimiento de antígenos del donador, presentados de las moléculas HLA a las células T o células presentadoras de antígeno. El daño inicial al injerto (como la isquemia) puede iniciar una respuesta inmune inicial, contribuyendo a la disfunción aguda y crónica del injerto.

De forma indirecta, los Linfocitos T reconocen aloantígenos procesados y presentados como péptidos por las células presentadoras de antígeno del receptor(14). La premisa básica para el reconocimiento indirecto del aloantígenos, como mecanismo involucrado en el rechazo del injerto, es la liberación de moléculas de HLA del injerto donado. Éstas moléculas son captadas por las células presentadoras de antígeno del receptor y presentadas a los Linfocitos T CD4⁺. Las células dendríticas tienen capacidad de procesar moléculas intactas de HLA provenientes de restos celulares del donador, y con ello estimular a Linfocitos T CD8⁺ por presentación cruzada(15, 16).

La tolerancia inmunológica se manifiesta clínicamente como el mantenimiento de la función del injerto de forma estable, sin evidencia de inmunosupresión. La intolerancia puede ser de 2 tipos: la tolerancia verdadera o espontánea, que es la ausencia de cualquier respuesta inmune perjudicial, en ausencia de inmunocompromiso; y la tolerancia operacional o inducida, que es la ausencia de respuesta inmune perjudicial frente a los antígenos del injerto, sin que afecta la

capacidad del receptor para actuar contra diversos antígenos que provengan del exterior(15, 17).

La tolerancia inmunológica también es producto del contexto del individuo: la mayoría de las personas inmunocompetentes son capaces de emprender una respuesta aloimmune bajo condiciones precipitantes; se puede desarrollar autoinmunidad de forma independiente a su genotipo(17).

La mayoría de los casos de tolerancia han ocurrido en pacientes sin apego al tratamiento que descontinúan los fármacos; bajo estas condiciones la mayoría de los pacientes experimentan rechazo del injerto, aunque un bajo porcentaje puede desarrollar tolerancia verdadera.

Los mecanismos que participan en la génesis de la tolerancia incluyen: deleción central de células T alorreactivas, deleción o anergia periférica de células T alorreactivas, ignorancia periférica por las células T alorreactivas, supresión activa de células T alorreactivas(18).

El primer mecanismo es la depleción de Linfocitos T alorreactivos durante la maduración en el Timo, sólo el 1-2% de los timocitos alcanzaran la madurez antes de ser liberados del Timo; el segundo mecanismo es la eliminación de Linfocitos T maduros alorreactivos en la periférica, lo cual activa Linfocitos T reguladores o bien se induce inactivación de tales células por moléculas inhibitorias. Si los Linfocitos T son incapaces de proliferar o producir interleucinas como IL-2 e IL-4, en respuesta a antígenos, se denominan anérgicos a dichos antígenos(19). Las células T reguladoras pueden provocar anergia o deleción clonal de Linfocitos T al secretar citocinas inhibitorias o bien induciendo apoptosis en la periferia(20-22).

El endotelio vascular del injerto es el sitio en el que las células inmunocompetentes del receptor inicialmente entran en contacto con aquellas del donador. Esto provoca activación del endotelio, con la expresión de moléculas de superficie, y secreción de citocinas, que regulan la respuesta inflamatoria(23).

El endotelio vascular del injerto, tiene un rol central en la regulación de la extravasación de Linfocitos T efectores al parénquima del riñón trasplantado. Por otra parte, las células endoteliales participan directamente en la activación de los

Linfocitos T alorreactivos al presentar antígenos y fomentando las señales de coestimulación(23, 24).

No solo las moléculas de HLA pueden inducir la respuesta contra el injerto, otros anticuerpos dirigidos a los antígenos MICA, MICB, endotelio, o receptor 1 de la angiotensina II, han demostrado tener un rol importante en el desarrollo de rechazo del injerto renal(25-29).

El sistema del complemento, la estimulación de los receptores tipo-Toll (TLR), células NK, y Linfocitos B también se encuentran involucrados en episodios de rechazo del injerto(15).

2.3. Tratamiento inmunosupresor.

El tratamiento se basa en la premisa de reducir la respuesta inmune dirigida contra injerto, evitando el rechazo y la pérdida del órgano.

En general, tiene dos fases:

1. Tratamiento de inducción.
2. Tratamiento de mantenimiento.

Cada fase se encuentra cubierta por una gama de medicamentos que cubren las vías de señalización básicas para la activación y propagación del estímulo inmunológico(13).

Los fármacos utilizados en la fase de inducción incluyen:

- Globulina anti-timocito.
- Basiliximab.
- Alemtuzumab.

Los fármacos utilizados en la fase de mantenimiento incluyen:

- Inhibidores de la calcineurina (tacrolimus y ciclosporina A).
- Inhibidores del mTOR (sirolimus y everolimus)
- Antimetabolitos (Micofenolato de mofetilo y azatioprina).
- Proteínas de fusión (belatacept).
- Esteroides (prednisona).

2.4. Inhibidores de calcineurina.

Aunque la ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (TAC) difieren en su estructura molecular y características de unión intracelular, sus propiedades inmunosupresoras resultan de la inhibición de la interacción calcio-calmodulina-calcineurina. CsA se une a ciclofilina mientras que TAC se une a FKBP12 (anteriormente FK506), evitando así la desfosforilación y translocación del factor nuclear de células T activadas (NFAT), un paso relevante en la síntesis de interleucina 2, una citoquina conocida por promover la proliferación de células T. Debido a que la calcineurina está involucrada en el proceso de fusión de vesículas a la membrana de los mastocitos, los inhibidores de calcineurina reducen la degranulación de estas células e inhiben la expresión de las quimiocinas en su superficie.

El metabolismo ocurre a través de CYP3A4 y CYP3A5 en el hígado, y en el nivel intestinal por CYP3A4 y P-glicoproteína (P-gp). Tienen biodisponibilidad oral variable (10 a 60%), por lo que existe una extensa lista de interacciones farmacológicas. Los fármacos que aumentan la biodisponibilidad de los CNI incluyen antagonistas del calcio no dihidropiridínicos, antifúngicos azoles y macrólidos; por otro lado, los medicamentos que pueden reducir su biodisponibilidad incluyen rifampicina, isoniazida, fenitoína, carbamazepina y trimetoprim / sulfametoxazol.

Los polimorfismos del citocromo P450 producen variaciones individuales que requieren un ajuste de la dosis debido a su asociación con los cambios en los niveles séricos del fármaco y un mayor riesgo de nefrotoxicidad.

2.4.1. Estructura química y antecedentes.

Tanto TAC como CsA difieren en su estructura química: la CsA es un endecapéptido cíclico con un solo aminoácido en su estructura, mientras que TAC es una lactona macrocíclica. Sin embargo, ambas actúan de forma similar.

La CsA se derivó originalmente del hongo filamentoso *Tolypocladium inflatum*. En 1971, se observó que la CsA poseía una importante potencia inmunosupresora sin propiedades citotóxicas significativas(30). En 1976, sus propiedades biológicas como supresor de la actividad de los linfocitos T llevó a su uso en el trasplante renal y de médula ósea(31, 32). La FDA lo aprobó en 1983 para el tratamiento y/o prevención del rechazo del injerto.

El TAC es un antibiótico macrólido producido por la fermentación del hongo del suelo *Streptomyces tsukubaensis*(33), descubierto en 1984, el fármaco codificado inicialmente como FK506, recibió su nombre del acrónimo **Tsukuba macrolide immunosuppressive**(34). En 1987 se reportaron los primeros experimentos en animales(35, 36). La FDA lo aprobó en 1994 para la prevención del rechazo del injerto hepático y para el tratamiento de la dermatitis atópica.

2.4.2. Farmacocinética.

Tanto CsA como TAC son altamente lipofílicos, poseen pobre solubilidad, aunque la formulación actual en microemulsión de CsA (Neoral) presenta mejor solubilidad que la presentación de base aceite (Sandimmune). TAC tiene dos presentaciones: de administración dos veces al día (Prograf), y de administración una vez al día (Advagraf)(37).

La biodisponibilidad es baja y altamente variable tanto para CsA (promedio 25%, rango 5-60%)(38), como para TAC (promedio 25%, rango 4-89%)(39, 40), debido a la pobre solubilidad y al extenso metabolismo de primer paso, proceso regulado principalmente por las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5 del citocromo P450, así como por la bomba de eflujo glucoproteína 1 (P-gp) y el ABCB1 (codificada por el gen de resistencia a multidroga-1 o MDR1)(41-43). El CYP3A y P-gp se expresan tanto en la mucosa intestinal como en el hígado y, por tanto, afectan la biodisponibilidad y aclaramiento sistémico(37, 44). La expresión y actividad de CYP3A5 es relevante en aquellos pacientes con al menos un alelo *CYP3A5*1*, comparado con pacientes homocigotos *CYP3A5*3*. Aquellos pacientes con el alelo *CYP3A5*1* tienen un aclaramiento 30% mayor de TAC, lo que resulta en un incremento del requerimiento de la dosis en 50%(45).

El alelo *CYP3A5*1* está presente en el 45-73% de los Afroamericanos, del 5-15% de los Caucásicos, 15-35% de los Asiáticos, y el 25% de los Mexicanos(37). La presencia de dicho alelo no afecta de forma relevante las concentraciones de CsA(46).

Al ingresar a los enterocitos, ambos fármacos son metabolizados por las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5. Se ha demostrado que la enzima predominante en el metabolismo de TAC es CYP3A5, mientras CYP3A4 metaboliza principalmente a

CsA(47-49), aunque se han detectado incremento en las concentraciones del área bajo la curva de dos metabolitos de la CsA (AM19 y AM1c9) en pacientes con al menos un alelo *CYP3A5*1* (expresores de CYP3A5), probablemente asociado a metabolismo intrarenal por dicha isoenzima(50).

Al ingresar a la circulación sistémica, ambos fármacos se fijan extensamente a los eritrocitos

Prácticamente la totalidad de la dosis administrada de CsA o TAC es convertida en metabolitos que son excretados por las heces, menos del 1% del fármaco termina sin cambios en las heces u orina. El metabolismo y excreción renal es de menos del 5% del compuesto(51).

2.4.3 Mecanismo de acción.

Aunque el TAC afecta múltiples mecanismos de la fisiología celular, parece que su principal función es la de alterar la expresión de ciertos genes en las células diana.

En particular, la expresión del gen de la interleucina 2 (IL-2) en los linfocitos CD4+.

La calcineurina fue identificada por vez primera por Wang y Desai(52), como un molécula que inhibe a la nucleótido fosfodiesterasa cíclica dependiente de calmodulina, que actúa como fosfatasa. Klee et al, le acuñó el termino “calcineurina” en base a sus propiedades fijadoras de calcio y a la localización en tejido neuronal(53). La calcineurina purificada es un heterodímero que consiste en una subunidad catalítica, calcineurina A, y una subunidad reguladora, calcineurina B(54). La calcineurina se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos de los mamíferos. Su funciones son múltiples, e incluyen: apoptosis, regulación de genes, neuritogénesis, regulación de canales iónicos, estimulación de ATPasa Na/K en túbulos renales, señalización de glucocorticoides/mineralocorticoides, activación de linfocitos T, entre otras(54).

Los inhibidores de calcineurina ejercen sus efectos celulares mediante la fijación a ciertas proteínas llamadas inmunofilinas(55, 56). La ciclofilina se fija con CsA, y las proteínas de fijación FK (FKBP) se fijan a TAC. La ciclofilina A es la ciclofilina más abundante en los linfocitos T, y la inmunofilina predominante de fijación a TAC es la FKBP12. La fijación de CsA o TAC a su respectiva inmunofilina incrementa la afinidad de la inmunofilina a la calcineurina. El complejo CsA/TAC-inmunofilina-calcineurina

resulta en la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina. Por su parte, la calcineurina se encarga de desfosforilar al factor nuclear de células T activadas (NFAT) el cual se transloca al núcleo y, en asociación con otros factores de transcripción como el AP-1, inician una cascada de eventos involucrados en la activación del linfocito T(57). Dentro de los miembros de la familia NFAT se encuentran: NFAT1, NFAT2, y NFAT4, los cuales participan en la activación transcripcional de la IL-2, IL-4, y CD40L(58).

CsA y TAC interfieren con la acción de calcineurina sobre otros sustratos además de NFAT, tales como I κ B, N/K ATPasa, y la oxido nítrico sintasa. Dichos mecanismos pueden explicar algunos efectos adversos asociados a su uso(34).

En los linfocitos, actores principales en la mediación de la aloinmunización en el injerto renal, la calcineurina y el NFAT participan en la apoptosis linfocitaria, en parte mediado por la inducción de la vía FAS-FAS ligando(59). Se ha demostrado la formación de un complejo Bcl-2 y calcineurina, la cual es incapaz de promover la translocación nuclear del NFAT, inhibiendo de esa forma su actividad pro-apoptótica(60). Por otra parte, la proteína BAD, miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2, es sustrato de la calcineurina. La desfosforilación de BAD por la calcineurina incrementa la heterodimerización de BAD fomentando la apoptosis(61).

El mecanismo regulador más importante de la calcineurina es el cambio de la concentración intracelular de calcio. En condiciones de calcio intracelular reducido, la calcineurina es incapaz de fijarse a calmodulina. Al darse la interacción entre la calcineurina y el calcio se genera un cambio conformacional que promueve la función fosfatasa(54).

La actividad de los inhibidores de calcineurina está estrechamente relacionada con la inhibición de la desfosforilación y translocación nuclear del NFAT(34). La inhibición del complejo de calcineurina con sus receptores ciclofilina y FKBP, respectivamente, impide de la actividad fosfatasa de la calcineurina evitando la translocación del NFAT al núcleo, reduciendo la producción de IL-2, la citocina estimuladora de proliferación de linfocitos T más importante(51, 62).

2.4.4. Farmacogenética.

Debido a su extenso metabolismo por la familia de los citocromos P450 3A, tanto en la mucosa intestinal como en el hígado, es de esperar que la alteración de la expresión enzimática origine cambios importantes en las concentraciones del fármaco en la sangre del paciente. Así mismo, la intensa variabilidad en la absorción de los inhibidores de calcineurina hace que en ocasiones sea complicado alcanzar concentraciones terapéuticas para evitar eventos adversos asociados a la infradosificación o sobredosificación. Por ello, existen múltiples interacciones farmacológicas que provocan cambios en el metabolismo de los inhibidores de calcineurina. Los fármacos que aumentan la biodisponibilidad de los CNI incluyen antagonistas del calcio no dihidropiridínicos, antifúngicos azoles y macrólidos; por otro lado, los medicamentos que pueden reducir su biodisponibilidad incluyen rifampicina, isoniazida, fenitoína, carbamazepina y trimetoprim / sulfametoxazol(63, 64).

Como se mencionó con anterioridad, la CsA se metaboliza principalmente con el CYP3A4 y en mucho menor medida por CYP3A5, mientras que TAC se metaboliza principalmente con el CYP3A5(37).

Se han detectado 22 variantes alélicas para *CYP3A4* y 11 variantes para *CYP3A5*. Sin embargo, solo unas pocas son relevantes desde el punto de vista farmacogenético, debido a que la mayoría de los alelos son muy raros o porque su implicación clínica no ha sido determinada. Las únicas excepciones han sido *CYP3A4*1B* y *CYP3A4*22*(65). Para *CYP3A5*, el alelo *CYP3A5*3* está ampliamente caracterizado como potencial causa de cambios en el metabolismo de la CsA.

Los individuos homocigotos para el alelo *CYP3A4*1*1* tienen menor aclaramiento de CsA a una dosis oral cuando se compara con individuos heterocigotos(66).

La variación en la expresión de bomba de eflujo (ABCB1 o P-gp) ha sido asociada a un incremento del riesgo de nefrotoxicidad y pérdida del injerto(67). El genotipo 3435TT en el donador se encuentra sobre-expresada en pacientes con nefrotoxicidad inducida por CsA(68). La acumulación de CsA en el injerto renal es mucho más elevada en los injertos portadores del alelo 3435T comparado con aquellos con el alelo 3435CC, y por tanto presentan más signos de nefrotoxicidad(69).

El principal determinante de la variabilidad interindividual en la dosis de TAC es la actividad del CYP3A5. El cambio de un nucleótido, conocido como CYP3A5*3, es el más importante. El ARNm resultante tendrá una secuencia anómala, por lo que es inestable y será eliminado, por lo que no llega a sintetizarse la proteína(70). Los portadores homocigotos del alelo CYP3A5*3 (no expresores) carecen de la proteína, frente a los portadores de al menos una copia del alelo normal CYP3A5*1 (expresores)(45). Se podrían clasificar a los pacientes como metabolizadores lentos: homocigotos *CYP3A5*3*3*; metabolizadores intermedios: heterocigotos *CYP3A5*1*3*; metabolizadores rápidos: homocigotos *CYP3A5*1*1*(71, 72). Los metabolizadores lentos requerirán dosis mucho más bajas que aquellos con metabolismo acelerado por las variantes del CYP3A5. Particularmente importante por el incremento del riesgo de rechazo en el último grupo de pacientes(73).

En México el 6.2% son portadores homocigotos de *CYP3A5*1*1* (expresores homocigotos), el 41.6% son heterocigotos *CYP3A5*1*3* (expresores heterocigotos), el 52.2% son *CYP3A5*3*3* (no expresores), lo que puede indicar que en esta población se requieren menores dosis de TAC para lograr concentraciones terapéuticas(74).

Debido a que la enzima CYP3A5 y ABCB1 están involucradas también en el metabolismo de los mineralocorticoides, los genes que regulen su expresión pueden estar involucrados en el mecanismo de hipertensión inducida por inhibidores de calcineurina(75). Otros genes que pueden estar implicados en la génesis de la hipertensión inducidos por dichos fármacos incluyen *WNK4* y *SPAK*.

Respecto a la P-gp, particularmente en trasplante renal, se ha descrito una relación entre el genotipo C3435T del donador y riesgo de nefrotoxicidad(76).

3. Toxicidad por inhibidores de calcineurina.

La nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina (iCN) se hizo aparente desde sus comienzos en el trasplante renal, a principios de los años 80s. En un estudio multicéntrico Canadiense, se detectó que la creatinina sérica a 1 y 3 años fue significativamente mayor en los pacientes tratados con CsA comparado con aquellos con régimen a base de Azatioprina(77, 78).

Calne y cols reportaron eventos de anuria en pacientes con uso de CsA a muy altas dosis (15 – 25 mg/kg) como monoterapia(79).

A la fecha la combinación de TAC + Micofenolato de mofetilo + prednisona es el régimen inmunosupresor más potente para la supresión del rechazo clínico y subclínico(80).

Sin embargo, el uso de iCN se ha asociado con cambios hemodinámicos y estructurales en el injerto que se pueden manifestar con deterioro de la función renal.

3.1. Toxicidad aguda por inhibidores de calcineurina.

Los inhibidores de calcineurina son la piedra angular actual de la mayoría de los regímenes de inmunosupresión en el trasplante renal, sin embargo la elevada variabilidad farmacocinética y farmacodinámica complica su uso. Como resultado, el monitoreo terapéutico del fármaco es indispensable para el ajuste de la dosis del fármaco, manteniendo sus concentraciones en sangre dentro del rango terapéutico. La escasa exposición de los iCN eleva el riesgo de rechazo, mientras que la sobreexposición incrementa el riesgo de eventos adversos: nefrotoxicidad, neurotoxicidad, infecciones, neoplasias, hipertensión arterial, diabetes, trastornos gastrointestinales(37).

Debido a que la inhibición de la vía de calcineurina-NFAT no es específica de las células inmunitarias, es evidente que los iCN provocan efectos tóxicos además de sus propiedades inmunosupresoras. La nefrotoxicidad se asocia a alteraciones hemodinámicas intrarrenales, esencialmente la reducción de la tasa de filtrado glomerular (GFR)(81, 82). La vasoconstricción se debe a un incremento del tono simpático(83), retención de agua y sal(84), activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona(85, 86), reducción de moléculas vasodilatadoras (ej.: prostaglandinas y óxido nítrico)(87-89) [27-29], e incremento en la producción de endotelina-1(90-92).

3.2. Toxicidad crónica por inhibidores de calcineurina.

Entre otras causas, la pérdida de la sobrevida a largo plazo del injerto se ha atribuido en gran medida a la nefrotoxicidad crónica por iCN. Nankivell et al, evaluaron a 120 pacientes que recibieron trasplante páncreas-riñón en población con diabetes tipo 1;

se obtuvieron más de 950 biopsias durante un periodo de 10 años y se categorizaron según los hallazgos y el tiempo establecido: Las lesiones vasculares caracterizada por hialinosis arteriolar con estrechez de la luz, la glomeruloesclerosis y el daño túbulo-intersticial se asociaron al uso crónico de iCN, y se atribuyó la nefrotoxicidad a dicho fármaco, presentándose las anormalidades histológicas en más del 95% de los pacientes a 10 años de seguimiento, aún si los hallazgos histológicos tempranos no presentaban anormalidades relevantes(93). Estos resultados tuvieron un impacto profundo en la concepción de los iCN como agentes causales de nefrotoxicidad a largo plazo. Tan solo en el mismo estudio, la presunta nefrotoxicidad asociada a iCN se presentó en el 50% de los pacientes a sólo 2 años de seguimiento histológico.

A pesar de los resultados reportados, no existen ensayos clínicos aleatorizados que demuestren fehacientemente la asociación de causalidad entre los hallazgos histológicos a largo plazo y el uso de iCN. La mayoría son estudios observacionales que conllevan los potenciales sesgos(94).

El-Zoghby et al, de la Clínica Mayo, evaluaron a 1,317 pacientes con trasplante renal. Se dio seguimiento en un periodo promedio de 4 ± 2.7 años; el 25% de los injertos se perdieron, 11% de ellos por disfunción del injerto. De los casos clasificados con fibrosis y atrofia tubular (30%), sólo el 0.7% se atribuyó directamente a la toxicidad por iCN, siendo las causas inmunológicas las principales contribuyentes de la pérdida del injerto a largo plazo(95).

Recientemente, Lohéac et al, evaluaron una cohorte de 4,783 pacientes de 4 centros en Francia, con un seguimiento promedio de 4.5 años. De las 9,959 biopsias de injerto, ya sea por protocolo o por disfunción, se identificaron 732 pérdidas de injertos, identificándose la causa en el 95% de los casos. Las principales causas de pérdida fueron el rechazo mediado por anticuerpos (31.6%), trombosis (25.5%), y enfermedades médicas intercurrentes (14.6%); sólo el 1.09% de los casos se asociaron directamente a toxicidad por iCN(96).

Gosset et al, encontraron una proporción de casos de pérdida del injerto asociado a la presencia histológica de fibrosis intersticial en 32% de 2,260 biopsias; categorizándose la fibrosis grado 2 o mayor como severa. Los anticuerpos anti-HLA donador-específicos fueron los responsables de la mayor proporción de casos de

fibrosis severa (11%; OR: 1.53, IC 95% 1.16 – 2.01), mientras que fue atribuible a los iCN en el 8% de los casos, de tal forma corroborando la información que la generación de anticuerpos son la principal causa de pérdida del injerto renal, aunque en este estudio hubo mayor proporción de casos de fibrosis atribuibles a los iCN(97). Independientemente de la controversia generada, se han establecido algunos datos histopatológicos sugerentes de toxicidad por inhibidores de calcineurina: Hialinosis nodular, especialmente de la adventicia, que se extiende a la túnica media de las arteriolas y arterias; fibrosis intersticial en banda; microangiopatía trombótica; y l vacuolización isométrica tubular(98).

Los fármacos involucrados con el riesgo de nefrotoxicidad inducida por iCN, incluyen: aminoglucósidos, melfalan, anfotericina B, ketoconazol, trimetoprim, fluoroquinolonas, aciclovir, cidofovir, foscarnet, cimetidina, ranitidina, colchicina, analgésicos no esteroideos, medio de contraste, fibratos.

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la toxicidad crónica por iCN no se relacionan necesariamente con el efecto hemodinámico bien conocido, sino con la regulación a la alza de factores de crecimiento, especialmente del factor de crecimiento transformador-beta (TFG- β)(99). El TFG- β induce la transición del epitelio de células mesenquimatosas a células similares a fibroblastos, lo que induce el desarrollo de fibrosis del intersticio renal(100, 101). Los cambios fenotípicos se asocian a la producción celular del factor de crecimiento de tejido conectivo, la molécula HSP47, y laminina(102).

La activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona también promueve la fibrosis intersticial y la nefrotoxicidad crónica por iCN. El bloqueo del eje con Olmesartan, antagonista del receptor tipo 1 de la angiotensina II, previene el desarrollo del daño renal y los cambios estructurales en un modelo experimental(103).

Eventualmente, el daño crónico de los iCN induce glomeruloesclerosis global como resultado de la hialinosis arteriolar severa, y la isquemia glomerular secundaria. Así mismo, el daño tubular severo puede conducir a la presencia de glomérulos “atubulares”(104) (Figura 1).

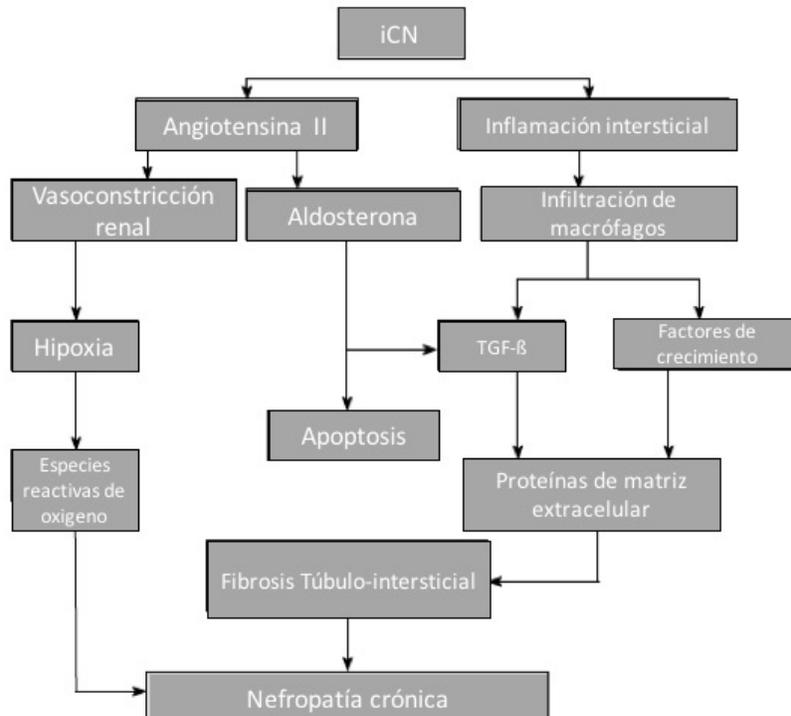


Figura 1. Eventos asociados a la génesis de la nefropatía crónica por el uso continuo de inhibidores de calcineurina.

4. Biomarcadores moleculares de toxicidad.

Se han analizado algunos biomarcadores relacionados con toxicidad aguda por iCN, 3 de ellos son: ciclofilina B, ARNt sintetasa, basigina (CD127)(105).

- Ciclofilina B: Es una molécula de 24 kDa, que normalmente desfosforila a NFAT permitiendo su translocación nuclear y transcripción de citocinas.
- ARNt sintetasa: Enzima relevante en la síntesis protéica.
- Basigina (CD127): Proteína transmembrana e inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular, capaz de fijar a ciclofilina A y ciclofilina B localizadas en el espacio extracelular.

Sin embargo, éstas moléculas han sido descritas en patologías oncológicas, y no son específicas

Los mecanismos moleculares han sido complejos en la lesión renal aguda y su intrincada relación con otros fenómenos celulares hacen difícil su interpretación. Si bien se conoce que la lesión del epitelio tubular por los cambios hemodinámicos previamente descritos y asociados a los inhibidores de calcineurina provocan cambios celulares asociados a hipoxia es esperable que los fenómenos adaptativos

o secundarios que resultan del daño persistente pueda incluir destacados procesos conocidos, entre éstos se incluyen la autofagia y apoptosis, mecanismos de los que se mencionará en breve resumen.

5. Apoptosis.

5.1. Definición.

El termino apoptosis fue acuñado por Kerr, Wyllie, y Currie en 1972 para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular(106). Los estudios clásicos se han realizado en *C. elegans*, en un modelo establecido por Sydney Brenner(107). Sin apoptosis, se estima, que se acumularían 2 toneladas de médula ósea y nódulos linfáticos, y 16 km de intestino, a la edad de 80 años(108).

5.2. Apoptosis vs necrosis.

El proceso alternativo de muerte celular es la necrosis, la cual se considera un proceso tóxico donde la célula es una víctima pasiva y sigue un modo de muerte independiente de energía. La oncosis es el término utilizado para describir el proceso que lleva a la necrosis con cariólisis y edema celular, mientras que la apoptosis lleva a muerte celular con encogimiento celular, picnosis y cariorrhexis(109).

Sin embargo, actualmente se reconoce que la apoptosis puede progresar a necrosis secundaria sin los cuerpos apoptóticos no son debidamente fagocitados(110). De hecho, se reconoce que la necrosis secundaria puede ser una forma de muerte celular programada que es desencadenada por los mismos estímulos apoptóticos(111).

5.3. Fases moleculares.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada. En contraste al edema celular y de sus organelos que definen a la necrosis, la principal característica morfológica de la apoptosis es el encogimiento de la célula y su núcleo(108).

Se caracteriza esencialmente por los siguientes pasos(112):

- 1- Inducción.
- 2- Activación de proteínas pro-apoptóticas.
- 3- Cascada de cisteína-proteasas (caspasas).

- 4- Degradación/reorganización de organelos intracelulares.
- 5- Fragmentación celular y generación de cuerpos apoptóticos.
- 6- Fagocitosis.

Cuando la apoptosis inicia, hay una transición de la permeabilidad de la membrana, caracterizada por la pérdida del potencial transmembrana de la membrana interna de la mitocondria. El siguiente estadio se caracteriza por la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. Cuando la célula se reduce a fragmentos envueltos de membrana son fagocitados por los macrófagos, células parenquimatosas, o células neoplásicas, degradado dentro de fagolisosomas(113). Esencialmente no se genera reacción inflamatoria debido a: las células apoptóticas no liberan sus componentes celulares al intersticio circundante; son rápidamente fagocitadas por las células adyacentes previniendo la necrosis secundaria; las células fagocíticas no producen citocinas inflamatorias(109).

5.3.1. Caspasas.

Las caspasas son proteasas que incitan y propagan eventos de señalización que culminan en la muerte celular. Su nombre se deriva del nombre: proteasas aspartato-específicas dependientes de cisteína (en inglés: **Cysteine-dependent aspartate-specific proteases**). Las caspasas se pueden dividir en apoptóticas (apoptosis) e inflamatorias (piroptosis)(114). En los vertebrados las caspasas apoptóticas se subdividen en iniciadoras (caspasas: -8, -9, y -10), y efectoras (caspasas: -3, -6, y -7)(115).

Con la excepción de la caspasa-1, abundante en monocitos y macrófagos, y la caspasa-14, exclusiva de los queratinocitos, las caspasas se encuentran ampliamente expresadas(116). Las caspasas se encuentran de forma exclusiva en el citosol y el núcleo(114). Se encuentran en forma de zimógenos (enzimas propensas a activación) que consiste en un dominio N-terminal seguido de un dominio catalítico(117). Dependiendo de la estructura del pro-dominio, que puede ser tipo CARD (dominio de reclutamiento de caspasa) o DED (dominio efector de muerte), diferentes complejos adaptadores pueden interactuar con varios miembros de la familia de caspasas(118).

Las caspasas iniciadoras son responsables de la activación exponencial de las

caspasas efectoras durante la apoptosis. El complejo de señalización involucra organelos intracelulares (especialmente las mitocondrias), y/o receptores extracelulares que facilitan el encadenamiento de adaptadores multiméricos (apoptosoma, inflamosoma, piddosoma) que promueven la activación de las caspasas(119). Al contrario, las caspasas son inactivadas mediante modificadores post-traduccionales, principalmente por fosforilación y ubiquitinación, o mediante interacciones con proteínas moduladoras(120). La regulación estrecha es crucial para evitar la activación inadvertida de la muerte celular.

6. Autofagia.

6.1. Definición.

Del griego “auto” o propio y “fagos” o comer, es la autodigestión de moléculas que se encuentran en el citosol. Se describe como el proceso responsable del recambio de componentes intracelulares a través de su degradación lisosomal, constituyendo un mecanismo crucial en el control de calidad de la célula, proveyendo, además, de una fuente alternativa de energía como un mecanismo adaptativo al estrés metabólico como el ayuno(121).

Es uno de los mecanismos celulares más evolucionados y conservados, ocurre a niveles basales en virtualmente cualquier célula. Descrito inicialmente por DeTter y de Duve en 1967, basado en las observaciones de la degradación mitocondrial y otras estructuras intracelulares dentro de los lisosomas del hígado de rata perfundido con glucagón(122). Sin embargo, su función está implicada en la transición del desarrollo celular o reparación de daño citoplásmico como ocurre durante el estrés oxidativo, infecciones, o acumulación de agregados proteicos(123). El mecanismo está regulado por los genes relacionados con autofagia (Atg). Actualmente hay más de 30 Atg identificados en la levadura, muchos de los cuales se conservan en las plantas, gusanos, insectos y mamíferos, enfatizando la importancia del proceso de autofagia en respuesta al estrés metabólico como el ayuno en múltiples organismos(121, 124).

6.2. Fases moleculares.

El proceso incluye las siguientes fases(125-128):

- Iniciación (formación del fagoforo).

- Elongación y formación del autofagosoma.
- Maduración del autofagosoma.
- Fusión autofagosoma-endosoma tardío (amfisoma).
- Fusión amfisoma-lisosoma (autolisosoma).
- Degradación proteica.

Las moléculas degradadas del lisosoma, como los aminoácidos, pueden ser exportadas para su reutilización. Múltiples factores son indispensables para la regulación del proceso (Tabla 2).

Inducción	Supresión
Ayuno.	Abundancia de nutrientes (aminoácidos).
Deprivación de factores de crecimiento.	PI3K clase I/Akt/TOR.
Depleción energética (AMPK).	Citocinas.
Estrés oxidativo.	Stat3.
P53.	BCL2.
Estimulación de CD46, CD40.	Activadores mTOR (Citomegalovirus, virus de Epstein-Barr).
Toxinas bacterianas.	Inhibidores de Beclina-1 (Virus del herpes simple).

Tabla 2. Factores de inducción y supresión de la autofagia.

7. Apoptosis en el desarrollo de la toxicidad por inhibidores de calcineurina.

Los mecanismos de daño inducidos por los iCN involucran vías de apoptosis. Se han evaluado las siguientes vías: Fas/Fas ligando; mitocondrial; del retículo endoplásmico; de la angiotensina II; de la hipertonicidad. Todas tienen en común la activación de las pro-caspasas: -8, -9, -12, -3, y -6(129).

El fenómeno apoptótico se ha evidenciado claramente en las células epiteliales tubulares y del intersticio de injertos renales en pacientes tratados con ciclosporina A(130, 131). Se ha descrito que la vía apoptótica inicialmente involucrada es la mitocondrial(132). La generación de especies reactivas de oxígeno, la reducción de

la expresión de Bcl-2 e IAP, el incremento de la expresión de Bax, y la translocación de Bax a la mitocondria contribuyen a la inducción de la apoptosis(132, 133).

La proteína Bax provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria, el cual activa las caspasas que, en un proceso de retroalimentación positiva, lesionan a la mitocondria y producen la pérdida del potencial transmembrana de dicho organelo.

Recientemente se ha descrito que la apoptosis inducida por tacrolimus se caracteriza por la fragmentación nuclear y activación de caspasa-3, así como al incremento del estrés del retículo endoplásmico que favorece la liberación de calcio citosólico con activación subsecuente de las caspasas -3 y -12(134).

Otros efectos sobre las vías involucradas en el proceso apoptótico se han descrito con los iCN (figura 2): regulación a la alza la vía del Fas/Fas ligando, regulación a la baja de Bcl-2/Bcl-XL, incremento de la expresión de las caspasas -1 y -3, aumento del estrés oxidativo; liberación de proteínas de estrés del retículo endoplásmico; alteración el fenómeno de concentración urinaria reduciendo la expresión de genes inducibles por hipertonicidad; y estimulan la producción de angiotensina II (129).



Figura 2. Efectos moleculares sobre las vías de activación del proceso de apoptosis. *iCN: Inhibidor de calcineurina. [basado en Xiao Z, et al(129)].

8. Autofagia en el desarrollo de la toxicidad por inhibidores de calcineurina.

La autofagia inducida por iCN es dependiente del estrés del retículo endoplásmico (RE), el cual se ha involucrado en la vía específica de señalización llamada “*respuesta a proteínas no plegadas*”, un mecanismo protector que reduce la carga de proteínas e incrementa el plegamiento de las mismas, contribuyendo a la protección celular(135). Sin embargo, cuando el RE se encuentra bajo señales de estrés celular, se promueve la apoptosis. Se ha demostrado, que la CsA induce estrés del RE en las células tubulares renales, lo cual también activa el proceso de autofagia como protección contra la muerte celular(136, 137). Sin embargo, una excesiva respuesta a la autofagia promueve la muerte celular por apoptosis, por lo que a autofagia, en este contexto, atenúa o promueve la nefrotoxicidad por iCN(138). Se ha demostrado que, en un modelo murino experimental, las células renales expresan LC3II; y debido a que ésta proteína es fácilmente detectada, puede servir como biomarcador en la sospecha de nefrotoxicidad inducida por CsA(137). Sin embargo, también se ha descrito que la CsA puede reducir la autofagia y apoptosis; cuando un modelo murino sufrió una lesión por isquemia-reperfusión, el tejido experimentó un incremento de la permeabilidad mitocondrial mediada por ciclofilina D, y puesto que dicha proteína es inhibida por CsA se puede observar un efecto contrario(139). También se ha demostrado que la proteína TMBIM6, un inhibidor de la proteína BAX involucrada en la apoptosis, protege a las células renales del efecto tóxico de la CsA al incrementar el proceso de autofagia incrementando la actividad lisosomal(140). En la figura 3 se resumen los mecanismos y efectos asociados a la nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina.

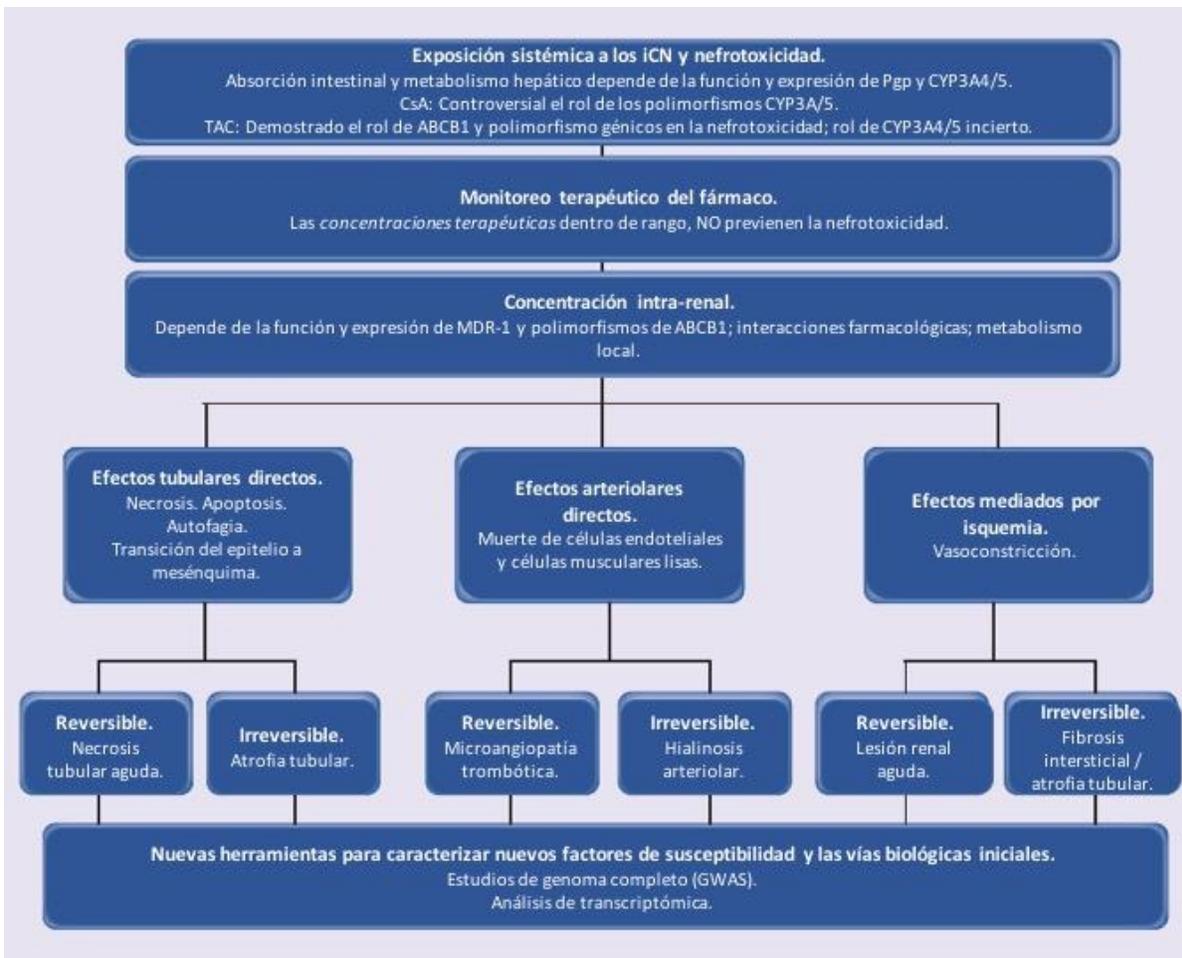


Figura 3. Mecanismos identificados en la nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina y sus efectos descritos. *iCN: Inhibidores de calcineurina. ABCB1: Miembro 1 de la sub-familia del casete fijador de ATP. MDR-1: gen de la proteína de resistencia a multi-droga tipo 1 [basado en Pallet N, et al (81)].

Planteamiento del problema.

Conocer los mecanismos moleculares asociados a la lesión celular en la toxicidad por inhibidores de calcineurina, como los fenómenos de apoptosis y autofagia son indispensable para desarrollar estrategias de diagnóstico y tratamiento oportunos, con el fin de mejorar la sobrevida del injerto y calidad de vida del paciente.

Justificación.

La enfermedad renal crónica es una enfermedad crónico-degenerativa con impacto en la calidad de vida del paciente, y el trasplante renal es la mejor opción terapéutica. Las complicaciones asociadas a el uso de inmunosupresores puede deteriorar la función renal, lo que implica una reducción en la sobrevida del injerto e incremento del riesgo de complicaciones cardiovasculares.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la expresión de los genes asociados a apoptosis y autofagia en pacientes trasplantados renales y datos histopatológicos de toxicidad por inhibidores de calcineurina?

Hipótesis.

En los pacientes trasplantados renales y con rechazo activo, se observa un cambio relativo de 2 veces los niveles de expresión de los genes asociados a apoptosis y autofagia, respecto al grupo control.

Objetivos.

General.

- Determinar la modulación de la expresión de genes de apoptosis y autofagia en el tejido trasplantado con toxicidad por inhibidores de calcineurina.

Específicos.

- Determinar la modulación a la alza de los genes asociados a apoptosis en pacientes con toxicidad por inhibidores de calcineurina.

- Determinar la modulación a la baja de los genes asociados a autofagia en pacientes con toxicidad por inhibidores de calcineurina.

Metodología.

Tipo y diseño del estudio.

Se realizará un estudio exploratorio, observacional, comparativo, descriptivo y transversal en pacientes trasplantados renales.

Población y tamaño de muestra.

Pacientes trasplantados renales del Hospital General de México.

Criterios de inclusión.

Grupo con toxicidad por inhibidores por calcineurina.

- Datos clínicos completos.
- Sin contraindicación para biopsia renal.
- Hallazgos histopatológicos compatibles con toxicidad por inhibidores de calcineurina.

Grupo control.

- Datos clínicos completos.
- Sin contraindicación para biopsia renal.
- Biopsia de protocolo a 1 año.

Criterios de exclusión.

Grupo con toxicidad por inhibidores de calcineurina.

- Contraindicación para realizar la biopsia renal.
- Biopsia no diagnóstica.
- Datos histopatológicos compatibles con otra alteración que explique la disfunción del injerto.

Grupo control.

- Contraindicación para realizar la biopsia renal.
- Biopsia no diagnóstica.

- Deterioro de la función
- Hallazgos histopatológicos compatibles con toxicidad por inhibidores de calcineurina.

Criterios de eliminación.

- Material insuficiente de tejido que no pueda ser analizado

Variables.

Variable	Conceptual	Operacional	Categoría	Escala de medición	Unidad de medición
Trasplante Renal	Tratamiento de nefropatía terminal.	Procedimiento quirúrgico.	Cualitativa	-	-
Sexo	Individuos según características sexuales.	Genero sexual.	Cualitativa	Dicotómica	Femenino / Masculino
Edad	Número de años en vida de un individuo.	Tiempo en vida de un ser vivo.	Cuantitativa	Continua	Años
Toxicidad por inhibidores de calcineurina	Datos histopatológicos compatibles con efecto toxico farmacológico	Complicación del manejo inmunosupresor.	Cualitativa	Dicotómica	Si / No
Creatinina	Producto del metabolismo proteico muscular, útil para valorar función renal.	Elemento de química sanguínea.	Cuantitativa	Continua	mg/dL
Creatinina basal	Valor más bajo en los últimos 3 meses de evaluación	Elemento de química sanguínea.	Cuantitativa	Continua	mg/dL
Creatinina pre-biopsia	Concentración de creatinina obtenida antes de realizar la biopsia del injerto renal	Elemento de química sanguínea.	Cuantitativa	Continua	mg/dL
Genes	Unidad de información que codifica una o más proteínas.	Componente del ADN.	Cuantitativa	Continua	Folds

Procedimiento.

Los tejidos se obtuvieron por biopsia guiada por ultrasonido, no se observaron complicaciones en ninguno de los sujetos incluidos en el estudio. El protocolo de estudio estaba de acuerdo con los estándares éticos de las Declaraciones de Helsinki y Estambul. El estudio fue aprobado por el número de ética local DI / 13/304/4/405. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos antes de ingresar al estudio.

Aislamiento del ARN total.

Se aisló el ARN total de las biopsias renales utilizando el Mini Kit de tejido fibroso RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El proceso se realizó usando un homogeneizador de tejidos (Polytron), con 1-3 pulsos de 10 segundos a velocidad máxima y roturas de 20 segundos. El ARN extraído total se determinó midiendo la DO (densidad óptica) a 260 nm usando un espectrofotómetro Nano-Drop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Se evaluó la integridad del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando la cámara vertical Enduro (Labnet, Nueva Jersey, EE. UU.) y el iluminador azul SLB-01, (Maestrogen, Nevada, EE. UU.). Las muestras de ARN total se trataron adicionalmente con DNA-free™ DNasa (Qiagen Inc) para eliminar la posible contaminación de ADN. El ADNc (ADN complementario) se preparó usando un kit de primera hebra de matriz de PCR RT2 (Qiagen Inc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción del ARNm (ARN mensajero) (200 ng en total) se realizó utilizando el kit RT2 First Strand (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Maxygenell (Axygen), programando un ciclo de tres temperaturas a 16 ° C durante 2 minutos; 42 ° C durante 1 min; 50 ° C durante 1 segundo; Seguido por un paso de 85 ° C durante 5 minutos y un paso final a 4 ° C. Al final de la reacción, la mezcla se diluyó con 112,5 ul de tampón TE.

RT-PCR en tiempo real basado en matriz.

La expresión de ARNm de biopsias de tejido renal se analizó utilizando la plataforma RT2 Profiler PCR Array (Qiagen). Diseñamos una disposición personalizada considerando 96 genes implicados en procesos moleculares asociados con daño renal, que contienen los elementos más representativos de apoptosis, TNF, citoquinas y quimiocinas. El conjunto también incluía controles para la contaminación del ADN genómico humano, transcripción inversa, control positivo de PCR. La PCR en tiempo real se realizó usando un programa de ciclado de dos pasos en un Viiatm 7 (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct para cada detector de gen de matriz de expresión se obtuvieron con el programa QuantStudio 7 (Applied Biosystems) siguiendo los siguientes parámetros:

línea de corte manual definida en una CT de 0,2 y una línea base automática. El cambio de veces entre los grupos se obtuvo mediante $2\Delta\Delta CT$ utilizando los genes constitutivos de GAPDH como normalizadores. Un cambio de $2.5 \pm$ veces se consideró significativo.

Análisis estadístico.

Las transcripciones se obtuvieron en pliegues de los casos respecto de los controles; los datos continuos se presentan como una mediana y rango intercuartílico (IQR) con un intervalo de confianza del 95% para los análisis U Mann-Whitney. Se consideró la significancia estadística cuando el valor de p fue ≤ 0.05 . El análisis se realizó con el software SPSS 22 (IBM, Armonk, NY).

Aspectos Éticos.

De acuerdo con los Artículos 16, 17 y 23 del CAPÍTULO I, TÍTULO SEGUNDO: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, del REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. El presente proyecto no implica riesgos para la salud del paciente.

Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes en el estudio, pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud, Las Pautas Éticas Internacionales Para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la OMS, así como la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS

Se estudiaron 21 pacientes, 13 mujeres, y 8 hombres. Con una media de edad de: 32.4 ± 9.6 años, 10 pacientes con toxicidad por iCN, 11 sin datos histológicos sugerentes de toxicidad por iCN. Se encontró una diferencia significativa sólo en las concentraciones séricas obtenidas previo a la toma de biopsia (tabla 1).

Característica	Total (n= 21)	Con toxicidad por iCN (n= 10)	Sin toxicidad por iCN (n= 11)	Valor p
Edad (años \pm DE)	32.4 ± 9.6	31.7 ± 9.1	33.1 ± 10.4	0.73
Cr basal (mg/dL \pm DE)	1.16 ± 0.33	1.33 ± 0.38	1.01 ± 0.21	0.32
Cr pre-biopsia (mg/dL \pm DE)	1.38 ± 0.54	1.66 ± 0.68	1.13 ± 0.18	0.04
Dosis TAC (\pm DE)	5.4 ± 1.9	6.1 ± 2.2	4.8 ± 1.5	0.15
Niveles séricos TAC (\pm DE)	10.0 ± 3.6	11.0 ± 4.7	9.1 ± 2.0	0.38

Tabla 1. Características generales de los pacientes con y sin toxicidad por inhibidores de calcineurina.

De los 21 pacientes evaluados, 1 paciente desarrollo nefropatía terminal por lupus eritematoso sistémico; 2 pacientes por diabetes tipo 2; 1 paciente por nefropatía por IgA; 2 pacientes por glomeruloesclerosis focal y segmentaria; 1 paciente por preeclampsia; 1 paciente por microangiopatía trombótica; y 13 por glomerulonefritis crónica no determinada (tabla 2).

No.	Edad	Causa ERC*	Cr** basal (mg/dL)	Cr Pre-biopsia (mg/dL)	Patología			Dosis TAC‡ (mg/d)	Nivel TAC (ng/mL)
					Arteriopatía ¥	Calcificación Tubular	Vacuolización isométrica tubular		
1	22	LN	1.5	2.5	Si	Si	Si	6	16
2	51	DM	1.6	2.6	Si	Si	Si	8	21
3	27	GNC	1.5	1.9	Si	Si	Si	9	12.8
4	29	GNC	1.1	1.2	Si	Si	Si	6	5
5	26	GNC	2.2	2.6	Si	Si	Si	8	12
6	29	MAT	1.1	1.1	Si	Si	Si	6	8
7	26	GNC	1.0	1.2	Si	Si	Si	2	6
8	45	GEFyS	0.9	0.9	Si	Si	Si	8	11
9	30	GNC	1.3	1.5	Si	Si	Si	4	9
10	32	GNC	1.1	1.1	Si	Si	Si	4	10
11	27	GNC	0.8	1.0	No	No	No	4	5.5
12	22	GNC	1.0	1.3	No	No	No	7	6.2
13	50	GEFyS	1.1	1.2	No	No	No	4	8
14	32	GNC	1.1	1.1	No	No	No	4	10
15	49	DM	0.6	0.8	No	No	No	3	9.5
16	37	GNC	1.2	1.3	No	No	No	8	9
17	25	PC	0.9	1.0	No	No	No	4	10
18	45	GNC	0.9	1.0	No	No	No	4	12
19	29	N IgA	1.3	1.3	No	No	No	5	12
20	23	GNC	1.3	1.4	No	No	No	4	9
21	26	GNC	1.0	1.1	No	No	No	6	9

Tabla 2: Características generales de los pacientes incluidos en el estudio.

*ERC: Enfermedad renal crónica. LN: Nefritis lúpica. DM: Diabetes Mellitus; GNC: Glomerulonefritis crónica; PE: Preeclampsia. GEFyS: Glomerulosclerosis focal y segmentaria. N IgA: Nefropatía por IgA.

**Cr: Creatinina sérica.

¥: Arteriopatía nodular o circunferencial.

‡: Tacrolimus.

Diez pacientes presentaron datos de toxicidad por inhibidores de calcineurina, siendo la concentración de creatinina pre-biopsia la única variable con diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0.04$) (tabla 1). En el resto de los casos, los datos histológicos compatibles con toxicidad por iCN fue un hallazgo incidental en el año de seguimiento de la biopsia durante el análisis histopatológico (tabla 1). El

hallazgo histopatológico común en los casos fue la arteriopatía hialina nodular, las microcalcificaciones tubulares, y la vacuolización isométrica (figura 1A, B). Nuestros datos clínicos son similares a la literatura en la que la toxicidad podría presentarse con o sin datos clínicos y bioquímicos y, en ocasiones, se observa durante las biopsias de control, resaltando el hecho de que la mayoría de las veces es un diagnóstico de exclusión.

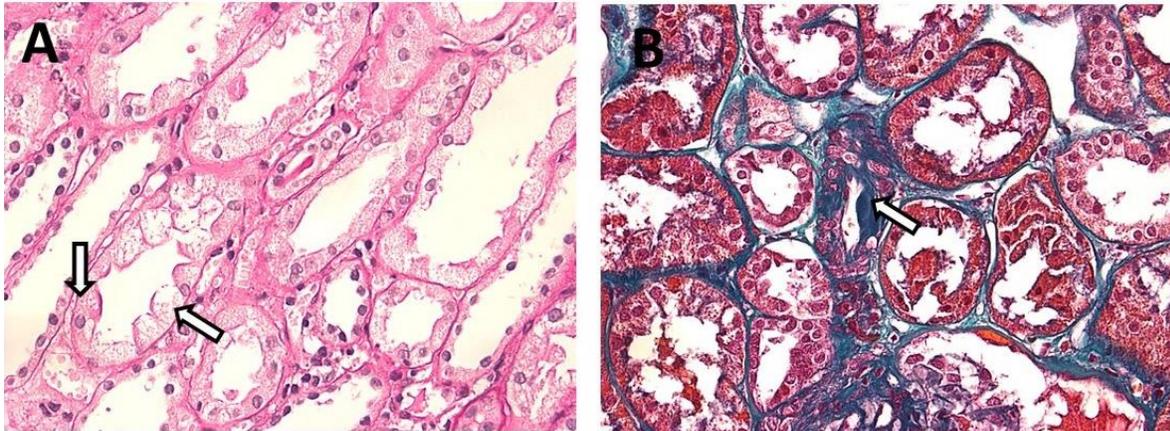


Figura 1: Análisis histopatológicos en la toxicidad por inhibidores de calcineurina. A) Microfotografía (40X) teñida con Ácido Periódico-Schiff (PAS), que muestra vacuolización del epitelio tubular proximal (flecha). B) Tinción de tricrómico de Masson (40X), que muestra vacuolización isométrica del epitelio tubular proximal, microcalcificaciones intratubulares e intersticiales (flecha).

Con el fin de explorar algunos datos moleculares en estos casos, se analizaron estudios de expresión de genes que podrían estar implicados en lesiones relacionadas con aloinjertos renales y datos de toxicidad por inhibidores de calcineurina, tales como genes de vías apoptóticas.

Se realizó RT-PCR en biopsias renales de 10 pacientes con datos sugerentes de toxicidad por inhibidores de calcineurina y de 11 pacientes sin datos de toxicidad.

Cuando se analizaron los genes asociados con las vías de apoptosis, se detectó que en todos los pacientes trasplantados y con datos de toxicidad por inhibidores de calcineurina se encontraron patrones de expresión de diferentes moléculas asociadas con la apoptosis en comparación con los controles donde solo se observó el perfil de expresión basal sin sobreexpresión de genes de apoptosis (figura 2).

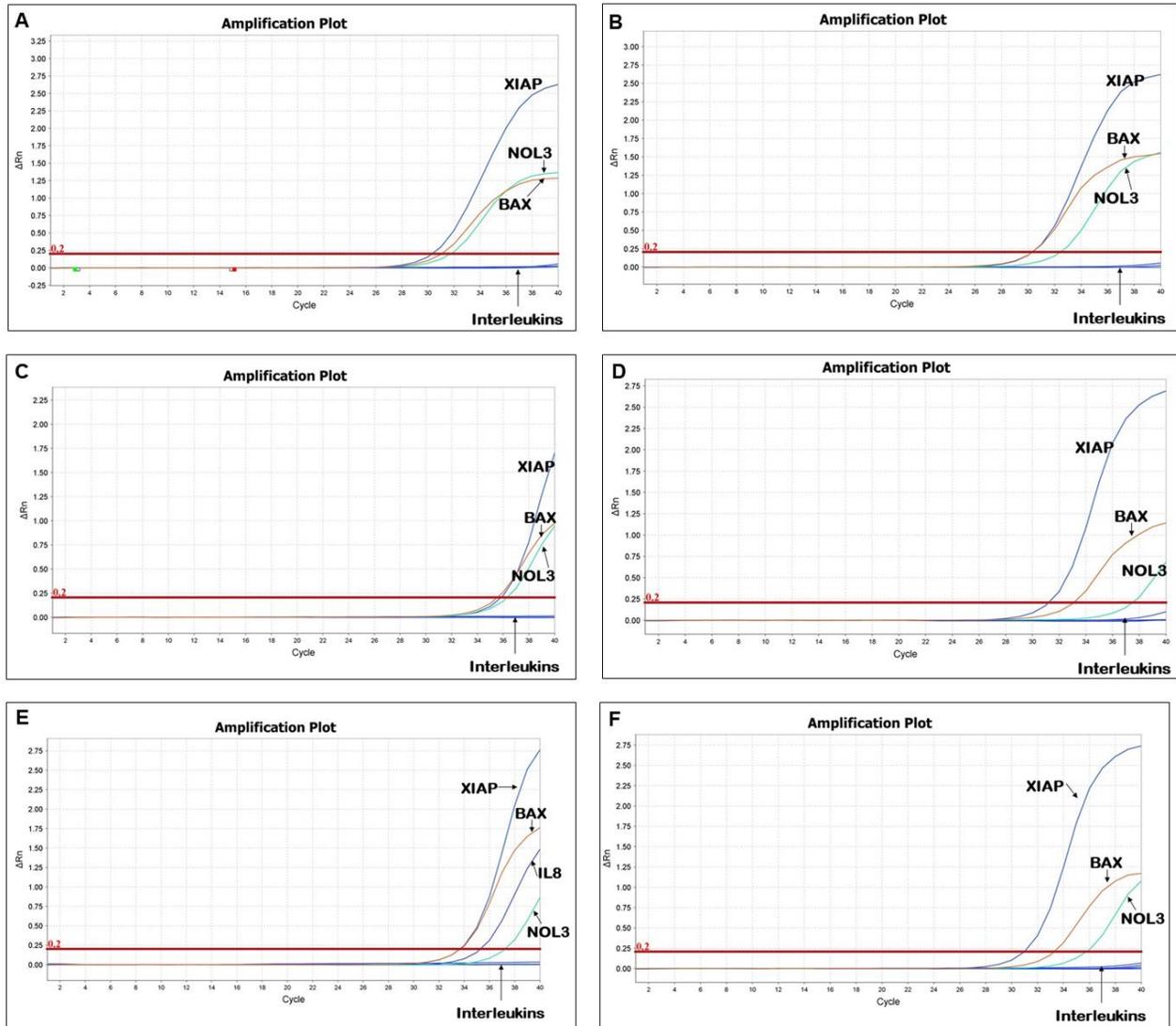


Figura 2: Gráfico de amplificación de genes. RT2 PCR Custom Profiler realizado en biopsias renales de 10 pacientes con toxicidad por inhibidores de calcineurina y 11 controles después del trasplante. Las gráficas mostraron el patrón de amplificación en los genes apoptóticos.

Estos resultados mostraron que todos los pacientes con toxicidad por inhibidores de calcineurina del presente estudio activaron los genes apoptóticos. Sin embargo, nuestro objetivo fue tratar de identificar si los genes sobreexpresados estaban relacionados con una vía apoptótica específica, modulando el daño al aloinjerto.

Se realizó el análisis transcripcional y estadístico solo en aquellos genes apoptóticos con un patrón de expresión homogéneo, y que se sobreexpresaron en los pacientes con datos de toxicidad por iCN en comparación con los controles. Los resultados mostraron que la proteína X asociada a Bcl-2 (BAX), la proteína Nucleolar 3 (NOL3)

y el inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) fueron consistentes en dichos pacientes (tabla 3 y figura 3).

	BAX	NOL3	XIAP
1	1	1	1
2	1.89400498	0.743742941	1.185761097
3	10.31163482	0.072411643	5.704600191
4	8.034460607	0.118451264	14.64286324
5	6.946090328	0.077608877	10.49860529
6	3.401570928	0.04945861	2.872139411
7	0.009395601	0.015759499	0.03799954
8	0.007578884	0.01271227	0.005381133
9	1.381467069	0.011456939	0.004370838
10	1.86115882	0.024901311	2.253434909
11	1.025410213	0.003313027	1.476443121
12	15.42486028	15.65916101	7.845516971
13	147.7052506	11.50209451	315.9228877
14	167.9450778	23.4912005	108.2532441
15	46.7867152	13.36327719	139.2502642
16	1464.508825	4.090750346	667.2695124
17	1558.779526	3.512176856	1032.642939
18	441.4790514	1.719948651	422.3003926
19	3556.398248	4.831146138	0.342013642
20	3.19585327	0.733244116	0.279733662
21	0.735196178	0.017245521	2.253434909

Tabla 3: Valores de expresión relativa mediante $2\Delta\Delta CT$ de los genes BAX, NOL3 y XIAP, en los pacientes con datos de toxicidad por iCN y pacientes con injertos sin daño significativo.



Figura 3: Expresión relativa de moléculas de la vía intrínseca de la apoptosis. Se comparó el patrón relativo de expresión génica medido por qRT-PCR de los genes BAX, NOL3 y XIAP en biopsias renales con aloinjerto sin daño (control) y riñón con toxicidad por inhibidores de la calcineurina (CNIT). La expresión relativa se normalizó con la expresión del gen B2M. Los diagramas de caja representan la dispersión de los valores de $2\Delta\Delta CT$; la prueba U de Mann-Whitney mostró una $P < 0.001$ en todos los grupos.

La prueba U de Mann-Whitney reveló en el grupo control un rango promedio de 1.5, mientras que los pacientes tuvieron tres veces más con respecto al control (4.5), este valor fue similar y consistente para los tres genes evaluados (tabla 3). El análisis estadístico fue $P < 0.001$. Sin embargo, el perfil de expresión fue biológicamente consistente en todos los pacientes. Este resultado sugiere que en el grupo de pacientes con toxicidad, el gen BAX se encuentra activado. El BAX es un regulador clave en la vía intrínseca de la apoptosis, sugiriendo un rol mitocondrial predominante, quizá debido a la vasoconstricción arteriolar y el estado hipóxico bien descrito en la toxicidad por inhibidores de calcineurina.

Así mismo se detectó una activación de moléculas antiapoptóticas involucradas en la vía intrínseca como NOL3 y XIAP.

DISCUSIÓN

Los inhibidores de calcineurina (ICN) siguen siendo los agentes inmunosupresores más eficaces y ampliamente utilizados en el trasplante de órganos. El uso prolongado de ICN puede provocar toxicidad renal, disfunción renal y, con el tiempo, disfunción del injerto. Durante las últimas tres décadas se ha postulado que el uso crónico de ICN pudiera contribuir a la pérdida tardía de la función renal del aloinjerto. La nefrotoxicidad de ICN puede ocurrir en cualquier momento después del trasplante, afectando la función de aloinjerto agudo o crónico. Los niveles altos de ICN en suero pueden ayudar a hacer el diagnóstico, aunque la nefrotoxicidad no es siempre dependiente de la dosis, teniendo una relación pobre con la toxicidad establecida(98, 141). Los mecanismos de nefrotoxicidad inducida por CsA son complejos y aún no se conocen por completo, se considera que esta alteración renal está principalmente fomentada por cambios hemodinámicos en la microvasculatura glomerular; sin embargo, se han implicado algunas vías moleculares, incluida la apoptosis. Los inhibidores de calcineurina promueven la liberación de vasoconstrictores que actúan especialmente en la arteriola aferente, provocando lesión isquémica(82, 83, 87). Se ha demostrado previamente que los cambios moleculares preceden a los cambios histológicos, así como a la función del injerto. En esta investigación analizamos la modulación transcripcional de las principales moléculas inflamatorias y de apoptosis involucradas en las vías de apoptosis intrínseca y extrínseca, tratando de realizar un abordaje exploratorio de la fisiopatología de la enfermedad e identificando objetivos probables que podrían ser útiles en el abordaje médico de la toxicidad por ICN. Los pacientes incluidos fueron 10 con datos sugerentes de toxicidad por ICN, las observaciones histológicas no difirieron de la literatura, siendo el hallazgo más consistente la hialinosis arteriolar, la vacuolización isométrica y las calcificaciones tubulares (tabla 1 y figura 1). Una preocupación para el diagnóstico de nefrotoxicidad ICN es la escasa especificidad de las lesiones histológicas. Además, no hay estudios confiables que permitan un seguimiento preciso del estado inmunosupresor. Gallon et al, realizaron un estudio de expresión génica en biopsias de pacientes trasplantados tratados con tacrolimus frente a sirolimus(142). Encontraron dos vías inmunológicas canónicas principales. El análisis de los genes modulados asociados

con las vías de apoptosis demostró un patrón de expresión variable en todos los pacientes trasplantados con toxicidad en comparación con los casos de control que solo expresan el perfil basal en cada gen. En un estudio, Maluf et al, se demostró que la vía de apoptosis participa en la toxicidad por ICN, esta observación previa indica que la lesión inicial está mediada por la apoptosis(143). Aquí los resultados mostraron que todos los pacientes incluidos en el estudio activan genes apoptóticos, apoyando los datos de Maluf. La proteína X asociada a Bcl-2 (BAX), la proteína Nucleolar 3 (NOL3) y el inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) se sobreexpresaron consistentemente en todos los pacientes. Los pliegues de cambio no estaban en distribución normal debido al proceso biológico y la heterogeneidad per se de la toxicidad en el aloinjerto. La prueba U de Mann-Whitney con el rango intercuartil se obtuvo consistentemente ($p < 0.001$) (figura 3). Esta es la primera evidencia molecular y clínica que sugiere que en pacientes con CNIT, BAX está activando la vía de apoptosis intrínseca. Esta observación explica el efecto molecular del mecanismo vascular del daño renal secundario a la vasoconstricción arteriolar e hipoxia. Bax es una proteína apoptótica codificada en el núcleo presente en eucariotas superiores que pueden perforar la membrana externa mitocondrial para mediar la muerte celular por apoptosis). Uno de los mecanismos de apoptosis mitocondrial es la hipoxia. Algunos estudios recientes sugirieron un papel importante para la regulación de la dinámica mitocondrial en la lesión celular durante la apoptosis, en la que se demostró la fragmentación mitocondrial durante el proceso apoptótico de las células tubulares, en modelos experimentales de lesión renal aguda(144). La apoptosis de las células tubulares a través de la vía mitocondrial pudieran contribuir al efecto isquémico y desarrollo de la disfunción aguda del injerto.

CONCLUSIONES

Los injertos renales con datos de toxicidad por inhibidores de calcineurina tienen un incremento en la expresión de los genes asociados a apoptosis, particularmente involucrando la vía intrínseca (mitocondrial), posiblemente por el estrés intracelular y algún grado de hipoxia producido por el efecto de los fármacos inhibidores de la calcineurina sobre las células tubulares del injerto.

ANEXOS

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Para todos los paciente a los que se realiza biopsia renal percutánea por algunas de las siguientes 2 indicaciones:

- Disfunción aguda del injerto.
- Biopsia de protocolo.

Nombre del paciente	
Edad	
Etiología de ERC	
Terapia de reemplazo renal pre-trasplante	
Tipo de trasplante	
Fecha de trasplante	
Terapia de inducción	
Tiempo de isquemia fría	
Tiempo de isquemia caliente	
Creatinina pre-trasplante	
Creatinina al egreso	
Creatinina basal	
Creatinina pre-biopsia	
Indicación de biopsia del injerto	
Número de biopsia	
Fecha de biopsia	
Microcalcificaciones tubulares (si/no)	
Arteriopatía hialina nodular (si/no)	
Vacuolización isométrica del epitelio tubular (si/no)	
Niveles séricos de iCN pre-biopsia	
Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento pre- biopsia	
Tratamiento inmunosupresor actual	

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIVACIÓN CLÍNICA.

Titulo de protocolo: “EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN INJERTOS RENALES CON TOXICIDAD POR INHIBIDORES DE CALCINEURINA”.

Riesgo de la investigación: Investigación con riesgo mínimo.

Nombre del Investigador principal: Dr. Guillermo Meléndez Mier

Teléfono: 5513532474 Firma: _____

Correo: melendez651@gmail.com

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Ma. Del Carmen Dubon Peniche

Teléfono: 27892000. Ext. 1164

Iniciales del Paciente: _____

A usted se le está invitado a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier duda que tenga. Una vez que haya comprendido en que consiste el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

El trasplante renal es la mejor alternativa para mejorar las condiciones de vida del paciente, sin embargo, no está exento de complicaciones. Una de las principales causas de deterioro de la función del riñón trasplantado es el rechazo del organismo al injerto. Se puede diagnosticar mediante exámenes de sangre, especialmente con la elevación de la creatinina, o bien al notar una reducción en la cantidad de orina que produce. No obstante, la mejor medida para establecer la causa específica que causa la lesión en el riñón trasplantado es la biopsia del injerto, ya que nos permite detectar la causa de la disfunción, e incluso, si hay datos que sugieran que hay daño aunque el paciente continúe orinando normal y la creatinina no se haya elevado.

Objetivo: demostrar la utilidad de la medición de genes en la muestra de biopsia y determinar cuales son las moléculas que pueden estar interviniendo en el proceso de rechazo del injerto, si es que está presente.

Beneficios: Una vez establecidos los potenciales genes expresados en el injerto se podrá investigar, en un futuro, si la detección de dichos genes pueden predecir el rechazo del riñón trasplantado.

Procedimiento: El tejido de la biopsia que se le realizó por disfunción del riñón trasplantado o por protocolo al año del trasplante será sometido a un proceso de congelación a -70°C, posteriormente será extraído para obtener material genético llamado RNA el cual será analizado para determinar la expresión de los genes.

Riesgos: Debido a que la muestra ya se encuentra congelada, no existe ninguna molestia en el paciente.

En caso de aceptar participar en el estudio, se obtendrá información de su expediente clínico, incluyendo edad, si el donador del riñón fue familiar relacionado o no relacionado o fallecido, el tipo de medicamentos utilizados para evitar el rechazo, los medicamentos que utiliza actualmente, y datos de laboratorio.

La información obtenida en este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética del Hospital General de México, en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio o desee retirarse del mismo, puede comunicarse las 24hs los 365 días con el Dr. Guillermo Meléndez Mier al teléfono: 5513532474.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma de 1er testigo

Lugar y Fecha

Parentesco

Nombre y firma de 2o testigo

Lugar y Fecha

Parentesco

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Dr. Guillermo Meléndez Mier
Jefe de registro y seguimiento de proyectos.
Investigador en ciencias médicas B.
Sistema Nacional de Investigadores.

ANEXO 2

AVISO DE PRIVACIDAD

“EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN INJERTOS RENALES CON TOXICIDAD POR INHIBIDORES DE CALCINEURINA”.

El presente Aviso de Privacidad tiene como objeto informarles sobre el tratamiento que se le dará a sus datos personales cuando los mismos son recabados, utilizados y almacenados.

Investigador responsable de recabar sus datos personales, de su uso y protección:

Nombre: Dr. Guillermo Meléndez Mier.

Domicilio: Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, Ciudad de México.

Teléfono: 5513532474.

Correo electrónico: melendez651@gmail.com

Su información personal será utilizada con la finalidad de establecer contacto con usted para solicitarle información sobre la evolución de su padecimiento, para lo cual requerimos obtener los siguientes datos personales: nombre de usted y teléfono particular; datos considerados como sensibles de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares.

Es importante que usted sepa que el equipo de investigación que colabora en este estudio se compromete a que todos los datos proporcionados por usted u obtenidos de su expediente, serán tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad. En el caso de este proyecto las medidas que se tomaran para ello serán: utilizar códigos, Iniciales, número de expediente y se almacenarán en archivo electrónico a cargo del investigador principal.

Los datos que usted nos proporcione no serán compartidos con otras instancias o instituciones y únicamente serán usados por el equipo de investigadores para este proyecto.

Usted tiene derecho de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse al manejo de los mismos o anular el consentimiento que nos haya otorgado para tal fin, presentando una carta escrita dirigida al investigador responsable: Dr. Guillermo Meléndez Mier ó al Presidente del Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México Dra. Ma. Del Carmen Dubon Peniche. Tel. 27892000. Ext. 1164.

DECLARACION DE CONFORMIDAD: Manifiesto estar de acuerdo con el tratamiento que se dará a mis datos personales.

Nombre y firma del sujeto de investigación o participante

Fecha: _____

REFERENCIAS

1. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* 2011;80(1):17-28.
2. Andrassy KM. Comments on 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease'. *Kidney Int.* 2013;84(3):622-3.
3. Fox CS, Larson MG, Leip EP, Culleton B, Wilson PW, Levy D. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA.* 2004;291(7):844-50.
4. Hsu CC, Kao WH, Coresh J, Pankow JS, Marsh-Manzi J, Boerwinkle E, et al. Apolipoprotein E and progression of chronic kidney disease. *JAMA.* 2005;293(23):2892-9.
5. Collister D, Ferguson T, Komenda P, Tangri N. The Patterns, Risk Factors, and Prediction of Progression in Chronic Kidney Disease: A Narrative Review. *Semin Nephrol.* 2016;36(4):273-82.
6. Wouters OJ, O'Donoghue DJ, Ritchie J, Kanavos PG, Narva AS. Early chronic kidney disease: diagnosis, management and models of care. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(8):491-502.
7. Aitken GR, Roderick PJ, Fraser S, Mindell JS, O'Donoghue D, Day J, et al. Change in prevalence of chronic kidney disease in England over time: comparison of nationally representative cross-sectional surveys from 2003 to 2010. *BMJ Open.* 2014;4(9):e005480.
8. Abboud H, Henrich WL. Clinical practice. Stage IV chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2010;362(1):56-65.
9. Baldwin MD. The primary care physician/nephrologist partnership in treating chronic kidney disease. *Prim Care.* 2014;41(4):837-56.
10. Lodhi SA, Meier-Kriesche HU. Kidney allograft survival: the long and short of it. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(1):15-7.
11. Wang JH, Skeans MA, Israni AK. Current Status of Kidney Transplant Outcomes: Dying to Survive. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016;23(5):281-6.
12. Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, Ikeda M, Imai N, Ito Y, et al. 20-year analysis of kidney transplantation: a single center in Japan. *Transplant Proc.* 2014;46(2):437-41.

13. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-29.
14. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol.* 2002;10(2-3):101-8.
15. Lu J, Zhang X. Immunological characteristics of renal transplant tolerance in humans. *Mol Immunol.* 2016;77:71-8.
16. Gutierrez-Martinez E, Planes R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, et al. Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol.* 2015;6:363.
17. Girlanda R, Kirk AD. Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2242-51.
18. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science.* 1998;280(5361):243-8.
19. Alpdogan O, van den Brink MR. Immune tolerance and transplantation. *Semin Oncol.* 2012;39(6):629-42.
20. Braza F, Durand M, Degauque N, Brouard S. Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? *Am J Transplant.* 2015;15(9):2288-300.
21. Hu M, Wang YM, Wang Y, Zhang GY, Zheng G, Yi S, et al. Regulatory T cells in kidney disease and transplantation. *Kidney Int.* 2016;90(3):502-14.
22. Liu Y, Peng B, Wu S, Xu N. Epigenetic Regulation of Regulatory T Cells in Kidney Disease and Transplantation. *Curr Gene Ther.* 2017;17(6):461-8.
23. Wang S, Zhang C, Wang J, Yang C, Xu M, Rong R, et al. Endothelial Cells in Antibody-Mediated Rejection of Kidney Transplantation: Pathogenesis Mechanisms and Therapeutic Implications. *J Immunol Res.* 2017;2017:8746303.
24. Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Front Immunol.* 2014;5:505.
25. Garg N, Samaniego MD, Clark D, Djamali A. Defining the phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: Advances in diagnosis of antibody injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2017;31(4):257-67.

26. Butler CL, Valenzuela NM, Thomas KA, Reed EF. Not All Antibodies Are Created Equal: Factors That Influence Antibody Mediated Rejection. *J Immunol Res.* 2017;2017:7903471.
27. Lim MA, Palmer M, Trofe-Clark J, Bloom RD, Jackson A, Philogene MC, et al. Histopathologic changes in anti-angiotensin II type 1 receptor antibody-positive kidney transplant recipients with acute rejection and no donor specific HLA antibodies. *Hum Immunol.* 2017;78(4):350-6.
28. Chowdhry M, Makroo RN, Singh M, Kumar M, Thakur Y, Sharma V. Role of Anti-MICA Antibodies in Graft Survival of Renal Transplant Recipients of India. *J Immunol Res.* 2018;2018:3434050.
29. Baranwal AK, Goswami S, Bhat DK, Kaur G, Agarwal SK, Mehra NK. Soluble Major Histocompatibility Complex Class I related Chain A (sMICA) levels influence graft outcome following Renal Transplantation. *Hum Immunol.* 2018;79(3):160-5.
30. Heusler K, Pletscher A. The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Med Wkly.* 2001;131(21-22):299-302.
31. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet.* 1978;2(8104-5):1323-7.
32. Powles RL, Barrett AJ, Clink H, Kay HE, Sloane J, McElwain TJ. Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. *Lancet.* 1978;2(8104-5):1327-31.
33. Gijzen VM, Madadi P, Dube MP, Hesselink DA, Koren G, de Wildt SN. Tacrolimus-induced nephrotoxicity and genetic variability: a review. *Ann Transplant.* 2012;17(2):111-21.
34. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc.* 2004;36(2 Suppl):25S-32S.
35. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1256-65.
36. Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Suzuki T, Asano T, Uematsu T, et al. Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc.* 1987;19(1 Pt 2):1284-6.

37. Vanhove T, Annaert P, Kuypers DR. Clinical determinants of calcineurin inhibitor disposition: a mechanistic review. *Drug Metab Rev.* 2016;48(1):88-112.
38. Akhlaghi F, Trull AK. Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(9):615-37.
39. Jusko WJ, Piekoszewski W, Klintmalm GB, Shaefer MS, Hebert MF, Piergies AA, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;57(3):281-90.
40. Moroni G, Ponticelli C. Synthetic pharmacotherapy for lupus nephritis. *Expert Opin Pharmacother.* 2017;18(2):175-86.
41. Richaud-Patin Y, Soto-Vega E, Jakez-Ocampo J, Llorente L. P-glycoprotein in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2004;3(3):188-92.
42. Garcia-Carrasco M, Mendoza-Pinto C, Macias Diaz S, Vera-Recabarren M, Vazquez de Lara L, Mendez Martinez S, et al. P-glycoprotein in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev.* 2015;14(7):594-600.
43. Picchianti-Diamanti A, Rosado MM, Scarsella M, Lagana B, D'Amelio R. P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4965-76.
44. Hebert MF. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;27(2-3):201-14.
45. Terrazzino S, Quaglia M, Stratta P, Canonico PL, Genazzani AA. The effect of CYP3A5 6986A>G and ABCB1 3435C>T on tacrolimus dose-adjusted trough levels and acute rejection rates in renal transplant patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(8):642-5.
46. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(3):245-54.
47. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(5):836-47.

48. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, et al. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem*. 2005;51(8):1374-81.
49. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, Huang W, et al. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(9):1889-902.
50. Zheng S, Tasnif Y, Hebert MF, Davis CL, Shitara Y, Calamia JC, et al. CYP3A5 gene variation influences cyclosporine A metabolite formation and renal cyclosporine disposition. *Transplantation*. 2013;95(6):821-7.
51. Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(10):563-85.
52. Wang JH, Desai R. A brain protein and its effect on the Ca²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;72(3):926-32.
53. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(12):6270-3.
54. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1483-521.
55. Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol Cell Biol*. 1993;13(8):4760-9.
56. Harikishore A, Yoon HS. Immunophilins: Structures, Mechanisms and Ligands. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;9(1):37-47.
57. Chakkera HA, Kudva Y, Kaplan B. Calcineurin Inhibitors: Pharmacologic Mechanisms Impacting Both Insulin Resistance and Insulin Secretion Leading to Glucose Dysregulation and Diabetes Mellitus. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;101(1):114-20.
58. Pan MG, Xiong Y, Chen F. NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. 2013;13(4):543-54.

59. Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV. Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J Biol Chem.* 1998;273(8):4416-23.
60. Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature.* 1997;386(6626):728-31.
61. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 1999;284(5412):339-43.
62. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;80(3 Pt 2):S40-5.
63. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(11):813-51.
64. van Gelder T. Drug interactions with tacrolimus. *Drug Saf.* 2002;25(10):707-12.
65. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics.* 2013;14(1):47-62.
66. Min DI, Ellingrod VL. Association of the CYP3A4*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit.* 2003;25(3):305-9.
67. Joy MS, Nিকেleit V, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF. Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. *Pharmacotherapy.* 2005;25(6):779-89.
68. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(5):1501-11.

69. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(10):693-704.
70. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;27(4):383-91.
71. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;103(6):546-52.
72. MacPhee IA, Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation*. 2008;85(2):163-5.
73. Padiyar A, Augustine JJ, Bodziak KA, Aeder M, Schulak JA, Hricik DF. Influence of African-American ethnicity on acute rejection after early steroid withdrawal in primary kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2010;42(5):1643-7.
74. Garcia-Roca P, Medeiros M, Reyes H, Rodriguez-Espino BA, Alberu J, Ortiz L, et al. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res*. 2012;43(4):283-7.
75. Moes AD, Hesselink DA, Zietse R, van Schaik RH, van Gelder T, Hoorn EJ. Calcineurin inhibitors and hypertension: a role for pharmacogenetics? *Pharmacogenomics*. 2014;15(9):1243-51.
76. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(11):2468-80.
77. Canadian Multicentre Transplant Study G. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med*. 1983;309(14):809-15.
78. Canadian Multicentre Transplant Study G. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. Analysis at three years. *N Engl J Med*. 1986;314(19):1219-25.

79. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*. 1979;2(8151):1033-6.
80. Rush D. The impact of calcineurin inhibitors on graft survival. *Transplant Rev (Orlando)*. 2013;27(3):93-5.
81. Pallet N, Legendre C. Deciphering calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a pharmacological approach. *Pharmacogenomics*. 2010;11(10):1491-501.
82. Rossi AP, Vella JP. Hypertension, living kidney donors, and transplantation: where are we today? *Adv Chronic Kidney Dis*. 2015;22(2):154-64.
83. Hoskova L, Malek I, Kopkan L, Kautzner J. Pathophysiological mechanisms of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and arterial hypertension. *Physiol Res*. 2017;66(2):167-80.
84. Schlaich MP, Grassi G. Sympathoexcitation in calcineurin inhibitor-induced hypertension: villain or innocent bystander? *J Hypertens*. 2010;28(9):1809-10.
85. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(1):F2-9.
86. Hoskova L, Malek I, Kautzner J, Honsova E, van Dokkum RP, Huskova Z, et al. Tacrolimus-induced hypertension and nephrotoxicity in Fawn-Hooded rats are attenuated by dual inhibition of renin-angiotensin system. *Hypertens Res*. 2014;37(8):724-32.
87. Hewedy WA, Mostafa DK. Nebivolol suppresses asymmetric dimethylarginine and attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity and endothelial dysfunction in rats. *Pharmacol Rep*. 2016;68(6):1319-25.
88. Patel L, Thaker A. The effects of A2B receptor modulators on vascular endothelial growth factor and nitric oxide axis in chronic cyclosporine nephropathy. *J Pharmacol Pharmacother*. 2015;6(3):147-53.
89. Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Nitsch D, Pfeilschifter J. Interleukin 1 beta-induced expression of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells is suppressed by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216(2):438-46.

90. Raina A, Horn ET, Benza RL. The pathophysiology of endothelin in complications after solid organ transplantation: a potential novel therapeutic role for endothelin receptor antagonists. *Transplantation*. 2012;94(9):885-93.
91. Cauduro RL, Costa C, Lhulier F, Garcia RG, Cabral RD, Goncalves LF, et al. Endothelin-1 plasma levels and hypertension in cyclosporine-treated renal transplant patients. *Clin Transplant*. 2005;19(4):470-4.
92. Darlametsos IE, Varonos DD. Role of prostanoids and endothelins in the prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001;64(4-5):231-9.
93. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2326-33.
94. Issa N, Kukla A, Ibrahim HN. The over-exaggerated chronic nephrotoxicity of calcineurin inhibitors. *Arab J Urol*. 2012;10(2):169-74.
95. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009;9(3):527-35.
96. Loheac C, Aubert O, Loupy A, Legendre C. [Identifying the specific causes of kidney allograft loss: A population-based study]. *Nephrol Ther*. 2018;14 Suppl 1:S39-S50.
97. Gosset C, Viglietti D, Rabant M, Verine J, Aubert O, Glotz D, et al. Circulating donor-specific anti-HLA antibodies are a major factor in premature and accelerated allograft fibrosis. *Kidney Int*. 2017;92(3):729-42.
98. Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, Alpers CE. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity*. *Am J Kidney Dis*. 2017;69(5):e21-e2.
99. Vieira JM, Jr., Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation*. 1999;68(11):1746-53.
100. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol*. 2005;167(2):395-407.

101. Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, et al. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant.* 2006;6(12):2937-46.
102. Xu-Dubois YC, Baugey E, Peltier J, Colombat M, Ouali N, Jouanneau C, et al. Epithelial phenotypic changes are associated with a tubular active fibrogenic process in human renal grafts. *Hum Pathol.* 2013;44(7):1251-61.
103. Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Iqbal M, Nadeem A, Sayed-Ahmed MM, et al. Olmesartan attenuates tacrolimus-induced biochemical and ultrastructural changes in rat kidney tissue. *Biomed Res Int.* 2014;2014:607246.
104. Nankivell BJ, Borrowers RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation.* 2004;78(3):461-8.
105. Fernando M, Peake PW, Endre ZH. Biomarkers of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in transplantation. *Biomark Med.* 2014;8(10):1247-62.
106. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
107. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974;77(1):71-94.
108. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361(16):1570-83.
109. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
110. Strzyz P. Cell death: Pulling the apoptotic trigger for necrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):72.
111. Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun.* 2017;8:14128.
112. Savitskaya MA, Onishchenko GE. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc).* 2015;80(11):1393-405.
113. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* 2016;13(3):031001.

114. Ramirez MLG, Salvesen GS. A primer on caspase mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* 2018.
115. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004;384(Pt 2):201-32.
116. Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hochepeid T, Ovaere P, Lippens S, et al. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):666-74.
117. Songane M, Khair M, Saleh M. An updated view on the functions of caspases in inflammation and immunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2018.
118. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4).
119. Baena-Lopez LA, Arthurton L, Xu DC, Galasso A. Non-apoptotic Caspase regulation of stem cell properties. *Semin Cell Dev Biol.* 2017.
120. Kamber Kaya HE, Ditzel M, Meier P, Bergmann A. An inhibitory mono-ubiquitylation of the *Drosophila* initiator caspase Dronc functions in both apoptotic and non-apoptotic pathways. *PLoS Genet.* 2017;13(2):e1006438.
121. Valdor R, Macian F. Autophagy and the regulation of the immune response. *Pharmacol Res.* 2012;66(6):475-83.
122. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 1967;33(2):437-49.
123. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):931-7.
124. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):458-67.
125. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290(5497):1717-21.
126. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004;6(4):463-77.
127. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1542-52.

128. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.
129. Xiao Z, Shan J, Li C, Luo L, Lu J, Li S, et al. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review. *Am J Nephrol.* 2013;37(1):30-40.
130. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1998;53(4):897-908.
131. Shimizu H, Takahashi M, Takeda S, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y, et al. Conversion from cyclosporine A to mycophenolate mofetil protects recipient kidney and prevents intimal hyperplasia in rat aortic allografts. *Transpl Immunol.* 2004;13(3):219-27.
132. Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis.* 2008;13(1):11-32.
133. Han SY, Chang EJ, Choi HJ, Kwak CS, Park SB, Kim HC, et al. Apoptosis by cyclosporine in mesangial cells. *Transplant Proc.* 2006;38(7):2244-6.
134. Chung YW, Chung MW, Choi SK, Choi SJ, Choi SJN, Chung SY. Tacrolimus-Induced Apoptosis is Mediated by Endoplasmic Reticulum-derived Calcium-dependent Caspases-3,-12 in Jurkat Cells. *Transplant Proc.* 2018;50(4):1172-7.
135. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 2006;66(2 Suppl 1):S102-9.
136. Pallet N, Bouvier N, Bendjallabah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant.* 2008;8(11):2283-96.
137. Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, et al. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy.* 2008;4(6):783-91.
138. Wu Q, Wang X, Nepovimova E, Wang Y, Yang H, Kuca K. Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity: Oxidative stress, autophagy, and signalings. *Food Chem Toxicol.* 2018;118:889-907.
139. Fakharnia F, Khodaghali F, Dargahi L, Ahmadiani A. Prevention of Cyclophilin D-Mediated mPTP Opening Using Cyclosporine-A Alleviates the Elevation of Necroptosis,

Autophagy and Apoptosis-Related Markers Following Global Cerebral Ischemia-Reperfusion. *J Mol Neurosci*. 2017;61(1):52-60.

140. Yadav RK, Lee GH, Lee HY, Li B, Jung HE, Rashid HO, et al. TMBIM6 (transmembrane BAX inhibitor motif containing 6) enhances autophagy and reduces renal dysfunction in a cyclosporine A-induced nephrotoxicity model. *Autophagy*. 2015;11(10):1760-74.

141. Krejci K, Tichy T, Hruba M, Horak P, Ciferska H, Horcicka V, et al. Subclinical toxicity of calcineurin inhibitors in repeated protocol biopsies: an independent risk factor for chronic kidney allograft damage. *Transpl Int*. 2010;23(4):364-73.

142. Gallon L, Traitanon O, Sustento-Reodica N, Leventhal J, Ansari MJ, Gehrau RC, et al. Cellular and molecular immune profiles in renal transplant recipients after conversion from tacrolimus to sirolimus. *Kidney Int*. 2015;87(4):828-38.

143. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, Lee JK, Cathro EP, King AL, et al. Evaluation of molecular profiles in calcineurin inhibitor toxicity post-kidney transplant: input to chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant*. 2014;14(5):1152-63.

144. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689-701.