

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

**ESTUDIO FARMACOGENÉTICO SOBRE TACROLIMUS EN EL TRASPLANTE CARDÍACO Y SU ASOCIACIÓN CON EL RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS.**

**ESTUDO FARMACOXENÉTICO SOBRE TACROLIMUS NO TRASPLANTE CARDÍACO E A SÚA ASOCIACIÓN CON O REXEITO MEDIADO POR ANTICORPOS.**

**PHARMACOGENETIC ANALYSIS OF TACROLIMUS IN HEART TRANSPLANT PATIENTS AND THEIR ASSOCIATION WITH ANTIBODY-MEDIATED REJECTION.**

Tutor: Dra. Lucía Núñez Fernández

Autor: Carolina Rubiero Núñez

Febrero, 2019





La Dra. Lucía Núñez Fernández en calidad de tutora de este trabajo, autoriza la presentación ante el Tribunal Evaluador del presente Trabajo Fin de Máster realizado por Carolina Rubiero Núñez.

Y para que conste, firma este documento.

Dra. Lucía Núñez Fernández

## **LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.**

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

CEIC: Comité ético de investigación de Galicia

cDNA: ADN codificante.

chr: Cromosoma

CHUAC: Complejo Universitario Hospitalario de A Coruña.

*dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database.*

*ExAc: Exome Aggregation Consortium.*

*ExPASy: Expert Protein Analysis System.*

GT.: Genotipo

*HGMD: Human Gene Mutation Database.*

HLA: Antígeno leucocitario humano.

HM: Homocigótico

HZ: Heterocigótico

ID: Identificación

IC: Insuficiencia cardiaca.

*IGV: Integrative Genomics Viewer.*

IMPDH: Inosina monofosfato deshidrogenasa.

INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

MAF: Frecuencia del alelo minoritario.

MMF: Micofenolato mofetilo.

NA: *Not aviable, no disponible.*

NGS: *Next-Generation Sequencing.*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

*PhD-SNP: Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms.*

*PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping v2.*

RAF: Frecuencia del alelo de referencia.

RMA: Rechazo mediado por anticuerpos.

*SIFT: Sorting Intolerant from Tolerant.*

*SNAP2: The 2nd Sprint National Anaesthesia Project.*

*SPDBV: Swiss-PdbViewer.*

TC: Trasplante cardiaco.

## ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	
Resumen:.....	
1. INTRODUCCIÓN:.....	1
1.1 Insuficiencia cardíaca y Trasplante Cardíaco.....	1
1.2 Tratamiento Inmunosupresor en el Trasplante Cardíaco.....	3
1.2.1 Tacrolimus.....	5
1.2.1.1 Propiedades Farmacodinámicas.....	6
1.2.1.2. Propiedades Farmacocinéticas:.....	6
1.2.1.3 Reacciones Adversas.....	8
1.2.2. Farmacogenética del Tacrolimus.....	8
1.2.3. Genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus.....	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	11
2.1. Hipótesis.....	11
2.2. Objetivos.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
3.1. Población de estudio.....	12
3.2. Secuenciación masiva.....	12
3.3. Análisis Bioinformático de los datos obtenidos en la NGS.....	12
3.3.2 Análisis de asociación entre las variantes y la respuesta.....	14
3.3.3 Análisis de las mutaciones encontradas.....	14
3.4. Recogida de datos.....	14
3.4.1. Predicciones Bioinformáticas.....	15
4. RESULTADOS.....	15
4.1 Características de los pacientes incluidos en el estudio.....	15
4.2. Profundidad de los genes analizados.....	16
4.3. Variantes encontradas.....	17
4.3.1. Variantes en el gen <i>ALB</i> .....	17
4.3.2. Variantes en el gen <i>ABCBI</i> .....	18
4.3.3. Variantes en el gen <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> .....	19
4.3.4. Variantes en el gen <i>POR</i> .....	21
4.3.5. Variantes en el gen <i>PPARA</i> .....	22
4.3.6. Variantes en el gen <i>NR1I2</i> .....	22
4.3.7. Variantes en el gen <i>FOXP3</i> .....	22

4.3.8. Variantes en el gen <i>CTLA4</i> .....	24
5. DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS:.....	32

## **Resumen:**

El trasplante cardíaco (TC) es un tratamiento eficaz cuando no existen alternativas en los casos de insuficiencia cardíaca avanzada y es una técnica capaz de salvar al 80% de los pacientes con alta probabilidad de fallecimiento al año. El tratamiento inmunosupresor ha determinado una mejoría en el pronóstico de los pacientes con TC y ha reducido la incidencia de rechazo del injerto. No obstante los episodios de rechazo, en el que cabe destacar el rechazo mediado por anticuerpos (RMA), constituyen una de las principales complicaciones tras el TC. Diferentes estudios apoyan la existencia de variantes genéticas asociadas a un fracaso en la inmunosupresión que puede estar relacionado con la aparición del RMA.

El objetivo de este trabajo es identificar variantes en 9 genes relacionados con la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus, y estudiar su asociación con el RMA. Para ello, se analizaron datos genéticos de 26 pacientes tratados con tacrolimus, de los cuales 15 presentaron RMA y 11 no presentaron RMA (Control).

Tras el análisis se identificaron 25 polimorfismos en los genes seleccionados. Sin embargo, ninguno de estos polimorfismos presentaba asociación significativa con el RMA. También, se han encontrado dos mutaciones en pacientes Control, por un lado, p.Gln117Ter en el gen *CYP3A5* que podría no expresarse por sistemas de reparación del ADN y por otro lado, p.Ser425Tyr en el gen *FOXP3*, que se considera benigna según las predicciones bioinformáticas utilizadas. Aunque en nuestro trabajo no hayamos encontrado asociación entre variantes de genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus y el RMA, no podemos descartar un posible efecto de estos genes en la farmacogenética del tacrolimus debido al limitado número de pacientes a estudio. Por ello, aumentar la cohorte con estudios multicéntricos sería una alternativa para determinar si existe asociación significativa con los genes a estudio.



# 1. INTRODUCCIÓN:

## 1.1 Insuficiencia cardíaca y Trasplante Cardíaco.

La insuficiencia cardíaca (IC) es la incapacidad del corazón para bombear sangre suficiente para las necesidades del organismo (Hall *et al*, 2006). La congestión venosa, la sobrecarga hemodinámica, los sistemas neurohormonales, la inflamación, el estrés oxidativo y su repercusión sobre el remodelado cardíaco y vascular se consideran hoy en día las principales causas de IC aguda, ya que son anomalías que hacen que el corazón sea una bomba hipoeficaz (Sánchez-Marteles *et al*, 2016).

En España, la IC es la primera causa de hospitalización en mayores de 65 años y constituye aproximadamente el 5% de todas las hospitalizaciones. Es importante resaltar que se trata de una afección que aumenta con la edad y que es un trastorno progresivo y letal. De hecho, la IC es la tercera causa de muerte cardiovascular en España, por detrás de la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular (Sánchez-Marteles *et al*, 2016).

Cuando todas las líneas terapéuticas han fracasado para los pacientes con IC avanzada, queda como opción final el trasplante cardíaco (TC) (Ubilla *et al*, 2006). Con el TC, se aumenta significativamente la supervivencia y la calidad de vida del paciente que, con medicación adecuada y hábitos de vida saludables, podría hacer una vida normal. Por lo tanto, el TC es una alternativa consolidada y de uso rutinario en los centros de referencia españoles. En la Figura 1 puede verse el número anual de trasplantes (1984-2017) total y por grupos de edad, en 19 centros de referencia, según la Registro Español de Trasplante Cardíaco (González-Vílchez *et al*, 2017).

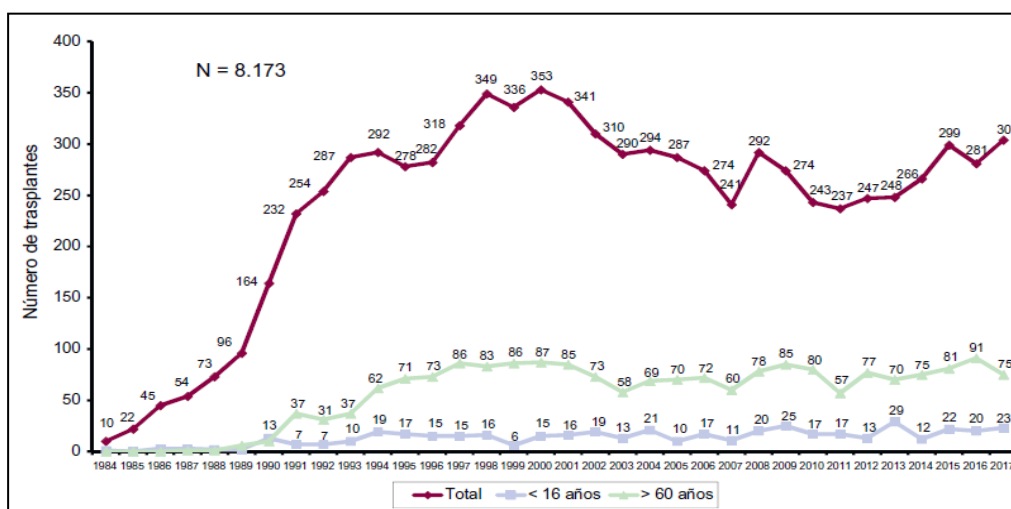
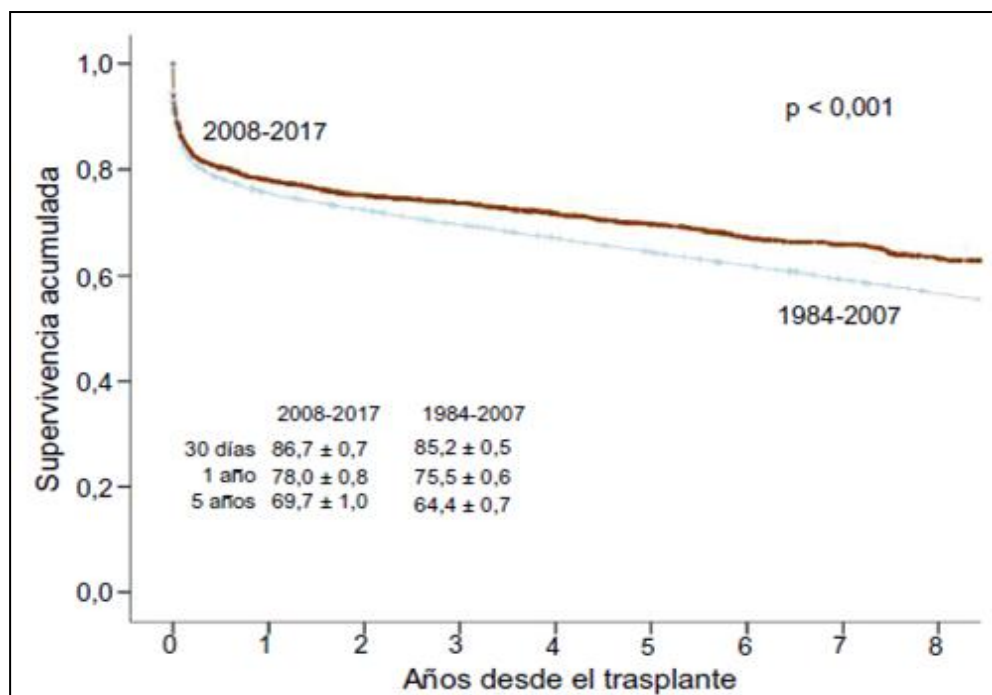


Figura 1: Número de trasplantes cardíacos realizados entre 1984 y 2017 (González-Vílchez *et al*, 2017).

Actualmente, como se muestra en la Figura 2, los pacientes de TC tienen una supervivencia muy elevada, siendo la mediana de supervivencia de 10,9 años y sólo un 2-3% de los pacientes no supera el año post-TC (González-Vílchez *et al*, 2017).



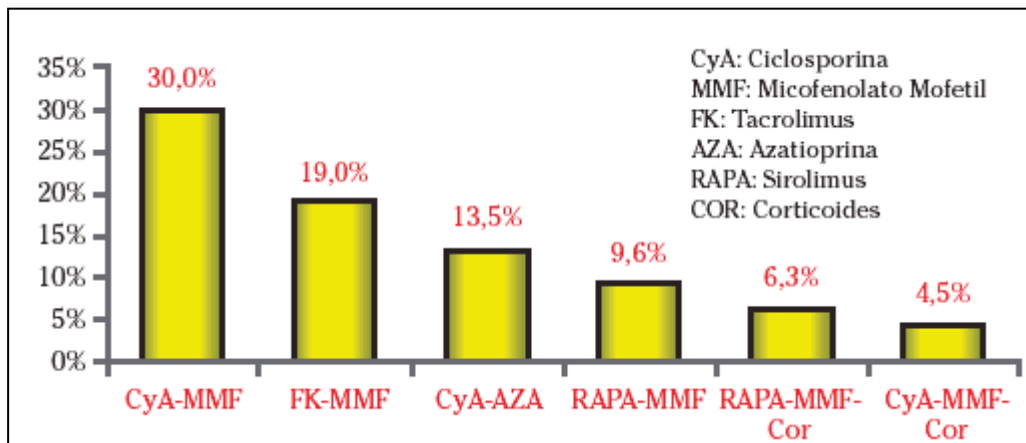
**Figura 2:** Comparación de las curvas de supervivencia general post-trasplante cardíaco entre 1984-2007 y 2008-2017 (González-Vílchez *et al*, 2017).

Aunque el TC es la única alternativa eficaz en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada, puede presentar graves complicaciones entre las que destaca el rechazo del injerto. Existen dos tipos de rechazo: el rechazo celular y el rechazo humoral o mediado por anticuerpos (RMA). El rechazo celular se trata de una respuesta inmunológica mediada por células T contra el injerto y caracterizada por la infiltración miocárdica por células inflamatorias, edema y muerte celular. El RMA es una forma de rechazo dependiente de células B, que producen anticuerpos citotóxicos dirigidos contra el endotelio vascular del injerto y daño mediado por activación del complemento (Almenar *et al*, 2016).

La incidencia y gravedad del rechazo se ha visto reducida con los tratamientos de inmunosupresión. Pero, a pesar de estas mejoras, los episodios de rechazo siguen siendo una de las principales complicaciones para la vida de los receptores con TC y se requiere nuevos enfoques para su mejora (Lieberman *et al*, 2008).

## 1.2 Tratamiento Inmunosupresor en el Trasplante Cardíaco.

Las terapias de inmunosupresión con fármacos como la ciclosporina, el tacrolimus o la azatioprina, han mejorado el pronóstico de los pacientes con TC (Lieberman *et al*, 2008). La Figura 3 representa los diferentes regímenes inmunosupresores seguidos en la actualidad (Ubilla *et al*, 2006).



**Figura 3:** Tratamientos actuales con diferente inmunodepresores en la terapia de mantenimiento de los pacientes con TC (Ubilla *et al*, 2006).

La terapia inmunosupresora utilizada en los trasplantes de órganos consta de tres fases principales:

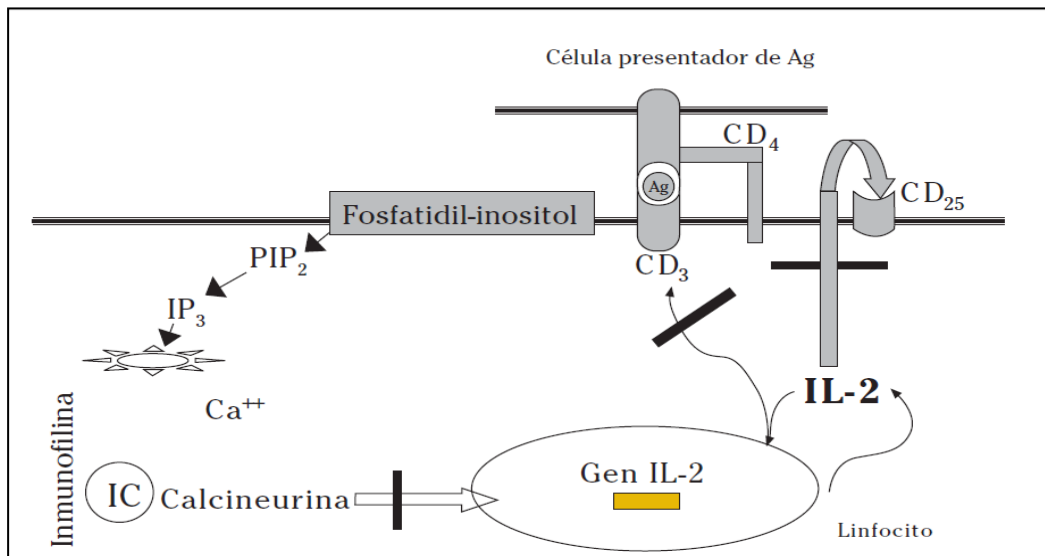
### A) Fase de inducción:

La fase de inducción, de administración intravenosa, se utiliza en el momento del trasplante para prevenir un posible rechazo inicial. Debido a que se administran dosis elevadas y tienen gran efecto tóxico, suelen ser terapias de corta duración. Se inicia con los mismos fármacos que se utilizarán en la siguiente fase, la de mantenimiento y se irá reduciendo su dosis progresivamente hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. Tradicionalmente se han empleado anticuerpos antilinfocitarios como la timoglobulina. Sin embargo, actualmente las terapias de inducción más establecidas se basan en anticuerpos monoclonales inhibidores de la IL-2, como basiliximab, ya que parecen reducir los episodios de rechazo sin aumentar mucho la incidencia de infecciones (Ubilla *et al*, 2006).

### B) Fase de mantenimiento:

La fase de mantenimiento se inicia poco después del trasplante cardíaco y lo más habitual en la práctica clínica es la triple terapia con anticalcineurínicos, antiproliferativos y corticoesteroides (Almenar *et al*, 2016).

Los anticalcineurínicos como la ciclosporina A (CsA) o el tacrolimus son los llamados inmunosupresores de segunda generación. Como se puede observar en la Figura 4, los anticalcineurínicos se unen a la inmunofilina, causando la inhibición de la calcineurina y disminuyendo así la trasmisión de señales de los linfocitos T y la transcripción de interleucina-2 (IL-2). Tienen como inconveniente principal su elevada nefrotoxicidad (Lieberman *et al*, 2008).



**Figura 4:** Mecanismo de acción de los anticalcineurínicos. IL-2: interleuquina 2; IC: inhibidores de la calcineurina; PIP: Fosfatidil inositol; IP3: inositol trifosfato; CD3: molécula de superficie del linfocito; CD4: molécula de superficie del linfocito; CD25: subunidad del receptor de la IL-2; Ag: antígeno (Sadaba, 2006).

El mecanismo de acción de los antiproliferativos consiste en la unión de los mismos a la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) inhibiendo así la síntesis *de novo* de purinas, esenciales para la proliferación de linfocitos T y B y la producción de anticuerpos. El antiproliferativo más empleado en la fase de mantenimiento es el mofenolato de mofetilo (MMF) (Lieberman *et al*, 2008).

Los corticoesteroides o corticoides son fármacos que interaccionan con receptores citoplasmáticos intracelulares específicos, formando un complejo receptor-corticoide. Este complejo penetra en el núcleo y produce una serie de reacciones en cascada que interfieren en las señales interleucocitarias mediadas por las lincinas. Inhiben la interacción macrófago-linfocito y la posterior liberación de IL-2. Esto tiene como resultado que no se activen los linfocitos T en respuesta a antígenos y que se suprima la síntesis de citoquinas por los linfocitos T activados. Presentan multitud de reacciones adversas, destacando problemas metabólicos como la hiperglucemia y la dislipemia, la hipertensión arterial y la osteoporosis (Sanofi, 2017).

### C) Tratamiento Antirechazo

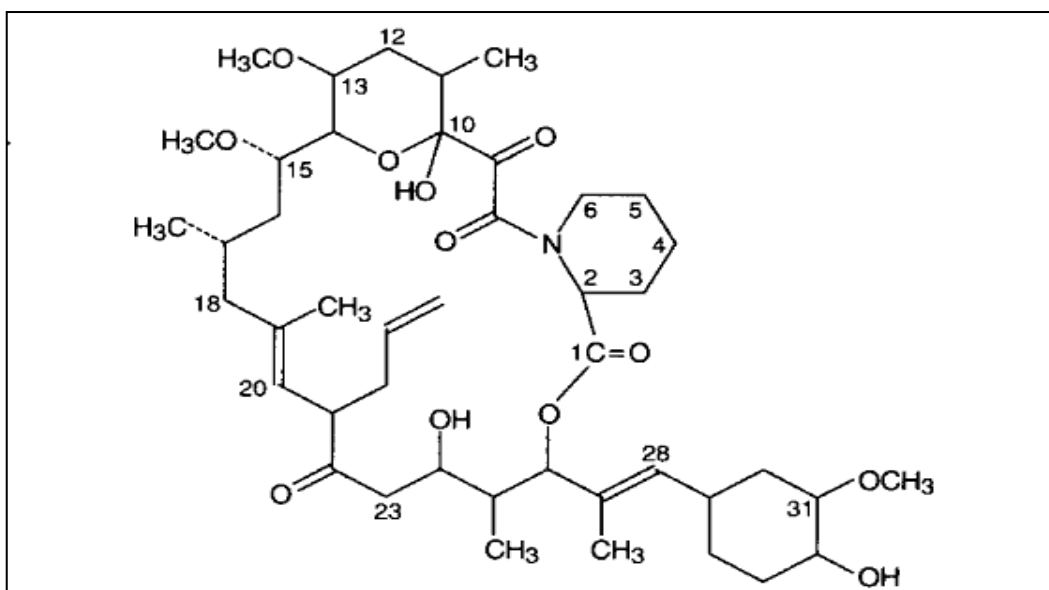
Los distintos tipos de rechazo requieren diferentes tratamientos específicos. En el caso de rechazo celular agudo, la administración de dosis elevadas de corticoides con anticuerpos monoclonales o policlonales es un tratamiento efectivo en más del 80% de los casos (Alonso-Pulpón *et al*, 1999).

Por otro lado, el rechazo humoral es un cuadro clínico que viene acompañado de compromiso hemodinámico y disfunción del injerto. El tratamiento en estos casos consiste en elevadas dosis de corticoides, plasmaféresis, ciclofosfamida y MMF (Sanofi, 2017).

#### 1.2.1 Tacrolimus

Tal y como hemos visto, el tacrolimus es uno de los principales principios activos empleados como inmunosupresor en el tratamiento de mantenimiento tras el TC (Alonso-Pulpón *et al*, 1999) y es el fármaco elegido para el estudio farmacogenético de este trabajo de fin de master (TFM).

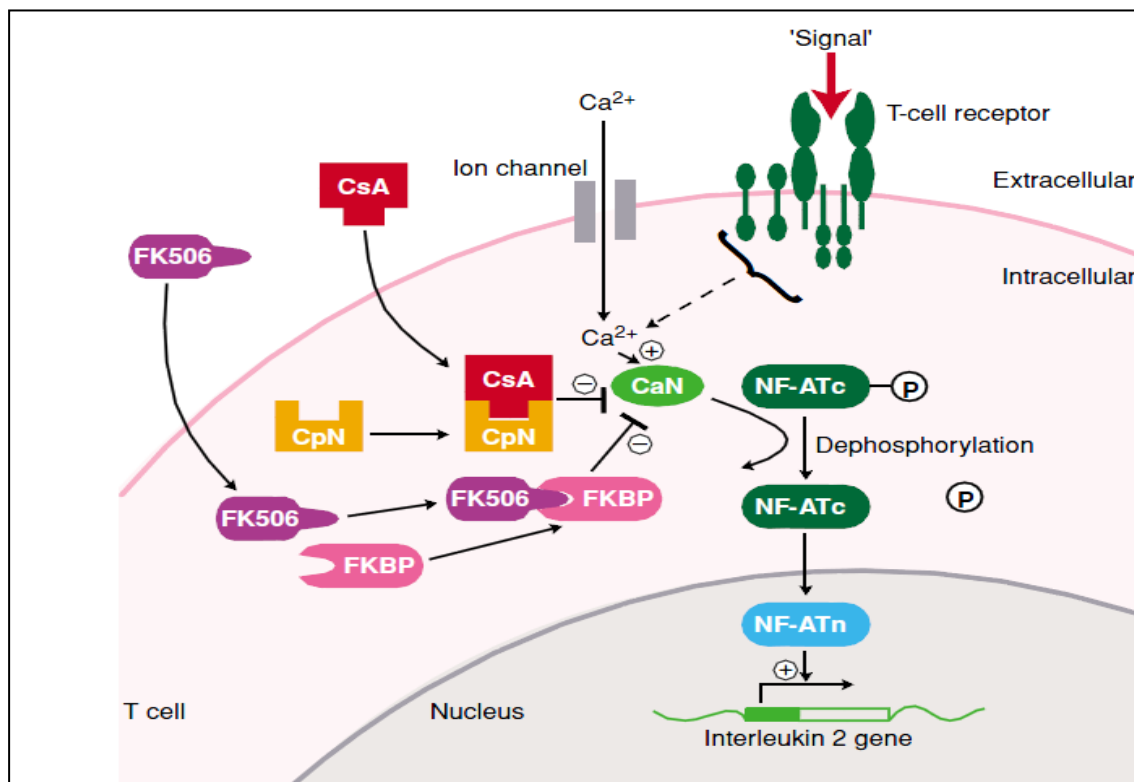
El tacrolimus, nombrado en la fase de investigación preautorización como FK506, es una lactona macroclicica de 23 átomos de carbono (Figura 5),  $C_{44}H_{69}NO_{12}$ , que fue aislada a partir de la fermentación de *Streptomyces tukubaensis*. Es una molécula muy lipófila con un peso molecular de 804 g/mol (Tanaka *et al*, 1987).



**Figura 5:** Estructura del tacrolimus. (Tanaka *et al*, 1987)

### 1.2.1.1 Propiedades Farmacodinámicas.

El mecanismo de acción del tacrolimus, tal y como se indica en la Figura 6, se inicia con la unión del mismo a la proteína citosólica FKBP12. El complejo FKBP12-tacrolimus inhibe de forma específica y competitiva a la fosfatasa calcineurina. La inhibición de la calcineurina inhibe a su vez la defosforilación del factor nuclear de activación de los linfocitos T, NFAT, con lo que se disminuye la transcripción de genes importantes para la activación de linfocitos como la IL-2 (Tanaka *et al*, 1987).



**Figura 6:** Mecanismo de acción del tacrolimus. FK506: tacrolimus; FKBP: proteína citosólica FKBP12; CaN: fosfatasa calcineurina; NF-ATc: factor de activación nuclear de los linfocitos T (Stepkowski, 2000).

El tacrolimus, por tanto, es un potente agente inmunosupresor que inhibe la formación de linfocitos T citotóxicos, que son los principales responsables del rechazo del celular. El tacrolimus inhibe también la activación de los linfocitos T y la proliferación de los linfocitos B dependiente de las células T auxiliares, así como la formación de linfocinas como las IL-2, IL-3 y  $\gamma$ -interferón, importantes en el RMA (Venkataramanan *et al*, 1995).

### 1.2.1.2. Propiedades Farmacocinéticas:

A continuación, se comentan las principales características farmacocinéticas del tacrolimus:

### A) Absorción

El tacrolimus es un fármaco con capacidad de absorberse a lo largo de todo el tracto gastrointestinal. Tiene una baja biodisponibilidad, aproximadamente de un 25%, pero puede variar desde el 5% al 93% (Staatz *et al*, 2004).

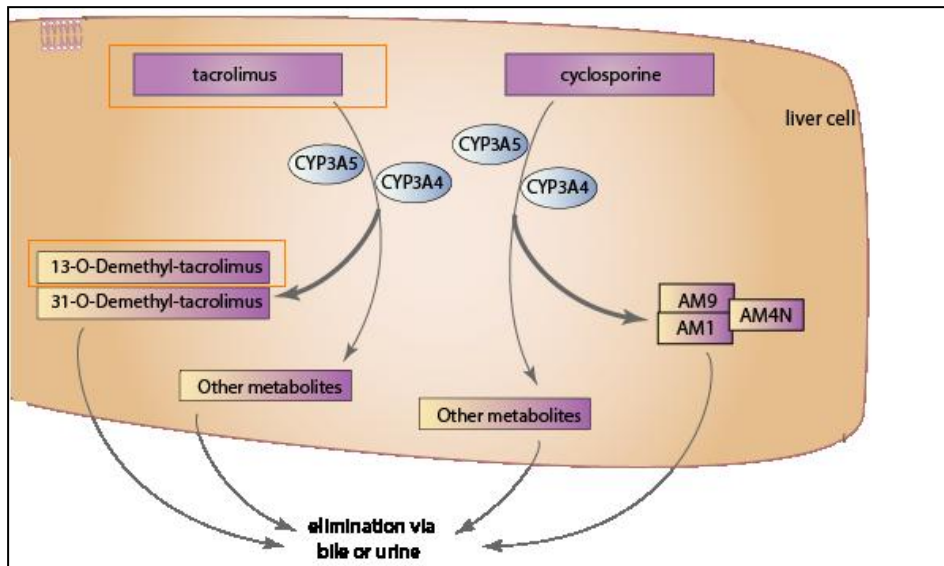
La baja biodisponibilidad del compuesto es debida a que, por una parte, presenta metabolismo presistémico, específicamente efecto del primer paso hepático mediante la acción del citocromo P3A4 (CYP3A4), codificada por el gen *CYP3A4*. Por otra parte, el transporte activo de la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1, codificada por el gen *ABCBI*, que expulsa al tacrolimus desde el interior del enterocito hacia la luz intestinal es otra causa de su baja biodisponibilidad (Staatz *et al*, 2011).

### B) Distribución

En la circulación sistémica, el tacrolimus tiene una elevada unión a proteínas del plasma (>98%), en particular a la albúmina sérica codificada por el gen *ALB*, que se traduce en una baja distribución (Stada, 2011).

### C) Metabolismo

El tacrolimus se metaboliza mayoritariamente en el hígado, principalmente a través del citocromo CYP450, por acción de las isoformas CYP3A5 y CYP3A4, enzimas codificadas por los genes *CYP3A5* y *CYP3A4*, respectivamente. Además, el tacrolimus presenta una importante metabolización presistémica en la pared intestinal por la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1. Se han identificado quince metabolitos del tacrolimus, siendo el 13-O-demetil-tacrolimus el principal producto en los microsomas hepáticos y en la sangre. Aunque este metabolito presenta actividad farmacológica, es 10 veces menos activo que el tacrolimus (Venkataramanan *et al*, 1995). En la Figura 7 se presenta un esquema donde se puede ver de manera detallada las enzimas y los metabolitos implicados en el metabolismo del tacrolimus (Barbarino *et al*, 2013).



**Figura 7:** Metabolismo del tacrolimus, enzimas implicadas y sus metabolitos (Barbarino *et al*, 2013).

#### D) Excreción

La semivida de eliminación del tacrolimus es larga y variable, siendo el tiempo de vida media en individuos sanos de aproximadamente 43 horas. Más del 95% del tacrolimus se elimina a través de las vías biliares y presenta bajo aclaramiento, siendo 2,25 L/h la tasa de aclaramiento normal en sangre. En el caso de pacientes adultos con TC, se ha observado un aclaramiento total de 3,9 L/h. Esto es debido a que los pacientes trasplantados presentan bajos valores de hematocrito y proteínas, produciéndose un aumento de la fracción libre del tacrolimus y por lo tanto un aumento de su aclaramiento (Stada, 2011).

#### 1.2.1.3 Reacciones Adversas.

El perfil de reacciones adversas asociado con el uso de medicamentos inmunosupresores es con frecuencia difícil de establecer debido a la presencia de enfermedades subyacentes y al uso conjunto de otros medicamentos. Sin embargo, las reacciones adversas más frecuentes asociadas a tacrolimus son temblores, insuficiencia renal, hiperglucemia, diabetes mellitus, hiperpotasemia, infecciones, hipertensión e insomnio. Además, los pacientes tratados con tacrolimus, debido al efecto inmunosupresor, tienen frecuentemente un elevado riesgo de sufrir infecciones virales, bacterianas, fúngicas y/o protozoarias (Stada, 2011).

#### 1.2.2. Farmacogenética del Tacrolimus.

La farmacogenética es una rama de la ciencia orientada al estudio genético de las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos, tanto a nivel de farmacocinética,



farmacodinámica o a la aparición de reacciones adversas. Su principal objetivo es el desarrollo de la medicina individualizada, para poder optimizar la eficacia de los fármacos, limitar su toxicidad, reducir los costes y por lo tanto mejorar la calidad del tratamiento (Pérez Alonso, 2017).

La mayoría de los inmunosupresores utilizados en trasplantes de órganos, como el tacrolimus, se caracterizan por un índice terapéutico estrecho, por lo que la infradosificación se asocia con aumento de riesgo de episodios de rechazo, y en cambio la sobredosis puede exacerbar la toxicidad relacionada con el fármaco. La farmacogenética, junto a la farmacodinámica y farmacocinética, podría individualizar la dosificación de agentes inmunosupresores para optimizar sus acciones terapéuticas mientras se reducen al mínimo los efectos adversos. De hecho, una fuente de variabilidad interindividual en la respuesta al tacrolimus puede ser la presencia de variantes genéticas que modifiquen el mecanismo de acción y la función metabólica en el paciente (Cattaneo *et al*, 2018).

### **1.2.3. Genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus.**

Para realizar estudios de farmacogenética, una posible estrategia es analizar las variantes en genes con un importante papel tanto en la farmacocinética como en la farmacodinámica del tacrolimus. Por un lado, se deberían estudiar los genes implicados en la diana farmacológica como *FOXP3* y también genes implicados en la farmacocinética como *ALB*, *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR*, *NR1I2*, *CTLA4*, y *PPARA*, para poder establecer relaciones entre las variantes genéticas y la respuesta al fármaco.

Por un lado, tenemos 8 genes implicados en la farmacocinética del tacrolimus:

- 1- El gen *ALB*, que codifica la proteína albúmina, es importante para la farmacocinética del tacrolimus, ya que éste al absorberse se une mayoritariamente a la albúmina plasmática (Sanofi, 2017).
- 2- El gen *ABCB1*, codifica la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 que metaboliza presistémicamente al tacrolimus, por lo que puede afectar a su farmacocinética (de Luna *et al* 2011 Hesselink *et al* 2014).
- 3- Los genes *CYP3A4* y *CYP3A5*, que codifican los CYP3A4 y CYP3A5 respectivamente, son genes que resultan interesantes para el estudio, ya que estos citocromos son los metabolizadores principales del tacrolimus (Hesselink *et al* 2014).

- 4- El gen *CTLA4*, que codifica a la proteína 4 de linfocitos T citotóxicos, actúa como un inhibidor de la señal de los linfocitos T. En estudios como el de Zhang *et al* se indica que el polimorfismo rs4553808 en el gen *CTLA4* influye en la farmacocinética del tacrolimus y se asocia a fluctuaciones de dosis entre pacientes, aunque no se sabe exactamente la relación (Zhang *et al*, 2018).

Hay 3 genes implicados en la regulación de la función del citocromo como son:

- 5- El gen *POR*, codifica a la proteína nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) CYP oxidoreductasa (POR), que es una proteína que funciona como un donante de electrones para las enzimas CYP3A, y por lo tanto resulta esencial para la oxidación de fármacos mediada por CYP3A (Lunde *et al*, 2014). Se han identificado más de 100 polimorfismo de un solo nucleótido o *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) en el gen *POR* y estos polimorfismos pueden influir en la interacción del fármaco POR-CYP y causar alteraciones en la actividad de CYP (Huang *et al*, 2008) (Lunde *et al*, 2014).
- 6- El gen *PPARA*, codifica una proteína receptora nuclear alfa activada por el proliferador de peroxisomas (Lunde *et al*, 2014). Esta proteína se ha reconocido como potencial contribuyente a la variabilidad en la expresión y actividad del CYP3A (Wang *et al*, 2011).
- 7- El gen *NR1I2*, que codifica la proteína receptora nuclear subfamilia 1, grupo I, miembro 2, es responsable de la regulación de las enzimas metabolizadoras de fármacos CYP3A y de los transportadores ABCB1, ambos importantes para la farmacocinética del tacrolimus (Barbarino *et al*, 2013).

Por otro lado tenemos un gen implicado en la farmacodinámica del tacrolimus:

- 8- El gen *FOXP3*, que codifica la proteína FOXP3 involucrada en la respuesta del sistema inmune ejerciendo una regulación sobre los linfocitos T reguladores. Se sabe que tacrolimus modifica los niveles de expresión con el receptor de linfocitos T como FOXP3, siendo entonces interesante su estudio a nivel farmacodinámico (Kogina *et al*, 2009).

Por todo esto, sería interesante estudiar los genes que interfieren en el mecanismo de acción y metabolismo del tacrolimus, con el fin de poder determinar si existen variantes

presentes en los mismos que puedan influir en la respuesta de un individuo al tratamiento administrado.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis.**

Variantes en los genes que participan en la farmacodinámica, *FOXP3* y en la farmacocinética, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *NR1I2*, *ALB*, *POR*, *CTLA4* y *PPARA*, del tacrolimus, pueden influir en la respuesta individual al tratamiento inmunosupresor con tacrolimus en pacientes con trasplante cardíaco y aparición de rechazo mediado por anticuerpos.

### **2.2. Objetivos.**

Los objetivos de este Trabajo de Final de Máster son:

1. Identificar variantes raras o mutaciones en 9 genes implicados en la farmacodinámica, *FOXP3* y en la farmacocinética, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *NR1I2*, *ALB*, *POR*, *CTLA4* y *PPARA* del tacrolimus, en 26 pacientes con TC, de los cuales 15 presentaron RMA.
2. Identificar variantes comunes en 9 genes implicados en la farmacodinámica, *FOXP3* y en la farmacocinética, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *NR1I2*, *ALB*, *POR*, *CTLA4* y *PPARA* del tacrolimus, en 26 pacientes con TC, de los cuales 15 presentaron RMA.
3. Realizar un estudio de asociación entre la presencia de variantes comunes en los genes analizados y el RMA.
4. Realizar análisis *in silico* de las variantes raras encontradas con el fin de establecer hipótesis sobre el efecto de las mismas.
5. Revisar la literatura existente sobre las variantes identificadas para contextualizar su efecto.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Población de estudio.**

En el presente estudio se han analizado los datos genéticos de las muestras de 26 pacientes, pertenecientes a la “Colección de muestras para la investigación de insuficiencia cardíaca avanzada y trasplante cardíaco” del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), registrada en el Instituto de Salud Carlos III como C\_0000419, 2012/348. El estudio fue aprobado por el Comité ético de investigación de Galicia, Referencia: 2014/012 y se realizó en conformidad con la guía ética de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado para la utilización de muestras biológicas en el estudio.

#### **3.2. Secuenciación masiva.**

La secuenciación masiva, *Next Generation Sequencing* (NGS) es una técnica con capacidad de generar millones de lecturas del genoma a elevada velocidad y con resultados óptimos (Goodwin *et al*, 2016). Para el estudio, el grupo de investigación de Cardiología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) realizó la secuenciación masiva con la tecnología *Illumina* (Illumina, 2017) de un exoma clínico que contiene 4813 genes en los 26 pacientes.

#### **3.3. Análisis Bioinformático de los datos obtenidos en la NGS.**

En el caso de este TFM, de los 4813 genes secuenciados, se seleccionaron 9 genes que participan en la farmacodinámica, *FOXP3* y en la farmacocinética, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *NR1I2*, *ALB*, *POR*, *CTLA4* y *PPARA* del tacrolimus.

Los 9 genes presentan diversas isoformas, en el estudio se seleccionaron las isoformas mayoritarias o las que presentan el mayor número de exones. No obstante, de los genes *ABCB1* y *CYP3A5* se han examinado isoformas adicionales para revisar exones que la seleccionada no presentaba. La Tabla 1 muestra las características de los genes estudiados, su posición genómica, la nomenclatura del transcrito de la base de datos Ensembl, la isoforma seleccionada y la hebra en la que se encuentran.

**Tabla 1:** Genes incluidos en el estudio.

Gen	Posición	Tránsito	Isoforma	Hebra
<i>ALB</i>	chr 4:4-74,279,060-74,280,284	ENST000002958897.8	NM_000477	Positiva
<i>ABCB1</i> *	chr 7:87,131,179-87,644,639	ENST00000265724.7	NM_000927	Negativa
<i>CTLA4</i>	chr 2: 203,867,786-203,873,965	ENST0000302823.8	NM_005214	Negativa
<i>FOXP3</i>	chr X: 49,104,897-49,123,288	ENST00000376207.8	NM_0140090	Negativa
<i>NR1I2</i>	chr 3: 119,782,710,119,818,485	ENST00000337940.4	NM_022002	Negativa
<i>CYP3A4</i>	chr 7:99,352,583-99,383,811	ENST00000336411.6	NM_017460	Negativa
<i>CYP3A5</i> *	chr 7:99,243,812-99,279,649	ENST00000222982.8	NM_001291830	Negativa
<i>POR</i>	chr 7: 75,915,079-75,986,855	ENST00000461988.5	NM_000941	Positiva
<i>PPARA</i>	ch 22: 46,150,596-46,243,756	ENST00000262735	NM_005036	Negativa

\* Genes en los que se han mirado otras isoformas con exones que la isoforma principal no presentaba :  
*ABCB1*: NM\_001348945, revisión adicional de exones 30, 31 y 32, *CYP3A5*: NM\_000777, exón 1 y NM\_001190484, revisión de los 5 exones.

### 3.3.1. Visualización de las secuencias.

La visualización de las secuencias se realiza a través del programa *Integrative Genomics Viewer (IGV)*. *IGV* es una herramienta que nos permite comprobar la profundidad de lectura de las secuencias del genoma del paciente analizado y visualizar las variantes encontradas en la NGS. La profundidad de lectura o *coverage* indica el número de veces que una base es secuenciada (Robinson *et al*, 2011).

Para que una variante detectada por NGS se pueda considerar como válida debe cumplir los siguientes criterios:

- La variante debe tener asignada una calidad igual o superior a 250. Este es el criterio principal a tener en cuenta.
- El número de profundidad de lectura o *coverage* de la posición de la variante debe ser igual o superior a un valor de 15 lecturas.
- La variante debe aparecer al menos en el 40% de las lecturas realizadas en dicha posición, si esta se encuentra en heterocigosis.
- Cuando la identificación de una base no cumple los criterios descritos, la posición en esa muestra se registra con “NA”, *not available*, no disponible.

Además, se considera una variante encontrada como rara aquella que además cumpla los siguientes criterios:

- La mutación no debe haber sido descrita anteriormente en bases de datos como *Pubmed*, *Exome Aggregation Consortium (ExAc)* (Karczewski *et al*, 2016) o *dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database)* (Sherry *et al*, 2001).
- La mutación debe tener una frecuencia menor al 1%.

### **3.3.2 Análisis de asociación entre las variantes y la respuesta.**

Las variantes identificadas y descritas en la bibliografía se analizan con el programa *SNPStats*, el cual realiza un análisis de asociación basándose en una regresión lineal o logística según la variable de respuesta, RMA o control. El análisis de SNPs se determina utilizando diferentes modelos de herencia (Solé *et al*, 2006).

Una vez obtenidos los resultados, en aquellos casos donde se encontró una asociación significativa entre un SNP y la variante (un  $p\text{-valor} \leq 0.05$ ), se repitió el análisis empleando el programa estadístico R. En los casos en los que se mantuvo la asociación, se realizó un test de significación en R empleando el test exacto de Fisher (The R Core Team, 2018).

### **3.3.3 Análisis de las mutaciones encontradas.**

Las mutaciones encontradas se localizarán en los dominios de las proteínas tras su representación a través del programa *Prosite* (Hoffman *et al*, 1999), disponible en *Expert Protein Analysis System (ExPASy)*. En el caso de que las proteínas en las que se identifiquen mutaciones tengan resuelta la estructura cristalográfica, se visualizarán mediante el programa *Swiss-PdbViewer (SPDBV)*, donde podemos localizar la mutación y ver el cambio estructural ocasionado por el cambio de aminoácido en dicha posición (Guex *et al*, 1997).

### **3.4. Recogida de datos.**

Entre las diferentes bases de datos con información detallada sobre las variantes y mutaciones, fueron utilizadas ExAc (Lek *et al*, 2016) y Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) (Sherry *et al*, 2001).

En cuanto a las mutaciones, las bases de datos principales han sido Pubmed (Karen *et al*, 2007) y Human Gene Mutation Database (HGMD) (Stenson *et al*, 2003), basando la búsqueda en la posición del aminoácido afectado.

### 3.4.1. Predicciones Bioinformáticas.

Para las predecir el posible impacto de las mutaciones encontradas en la proteína se han utilizado cinco herramientas bioinformáticas de análisis *in silico*:

- *The 2nd Sprint National Anaesthesia Project (SNAP2)* (Bromberg *et al*, 2007).
- *Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT)* (Sim *et al*, 2012).
- *Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2)* (Adzhubei *et al*, 2010).
- *Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhD-SNP)* (Capriotti *et al*, 2006).
- *Mutation Taster* (Schwarz *et al*, 2014).

## 4. RESULTADOS.

### 4.1 Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Se han seleccionado un total de 26 pacientes del CHUAC a los que se les ha realizado un TC y el tacrolimus forma parte de su terapia inmunosupresora. Los pacientes se dividieron en función de la aparición (RMA) o ausencia de RMA (Control). (Tabla 2).

**Tabla 2:** Características de los pacientes RMA y control.

	<b>RMA</b>	<b>Control</b>
<b>Características</b>	Pacientes que toman Tacrolimus y presentan RMA	Pacientes que toman tacrolimus y no presentan RMA
<b>Número de pacientes</b>	15	11

Los principales datos demográficos como edad y sexo de los pacientes se resumen en la Tabla 3 y cabe destacar que existe un mayor número de pacientes hombres en ambos grupos a estudio.

**Tabla 3:** Características demográficas de los pacientes. (n: número de pacientes de cada grupo).

	<b>RMA (n=15)</b>	<b>CONTROL (n=11)</b>
Media edad	56,3 años	47 años
Hombres	80% (12)	90,9% (10)
Mujeres	20% (3)	10,1% (1)

En cuanto al tratamiento, en la Tabla 4 se reflejan los pacientes que reciben terapias con otros inmunosupresores, siendo el tratamiento con el tacrolimus criterio de inclusión en el estudio.

**Tabla 4:** Porcentaje (%) de pacientes que toman diferentes inmunosupresores en el tratamiento de TC.

	<b>RMA (n=15)</b>	<b>Control (n=11)</b>
Tacrolimus	100% (15)	100% (11)
Esteroides	100% (15)	100% (11)
MMF	80% (12)	100% (11)
Basiliximab	80% (12)	100% (11)
Rituximab	6,66% (1)	0% (0)
Ciclosporina A	13,33 (2)	27,27% (3)
Timoglobulina	6,66% (1)	0% (0)
Plasmaféresis	60% (9)	0% (0)

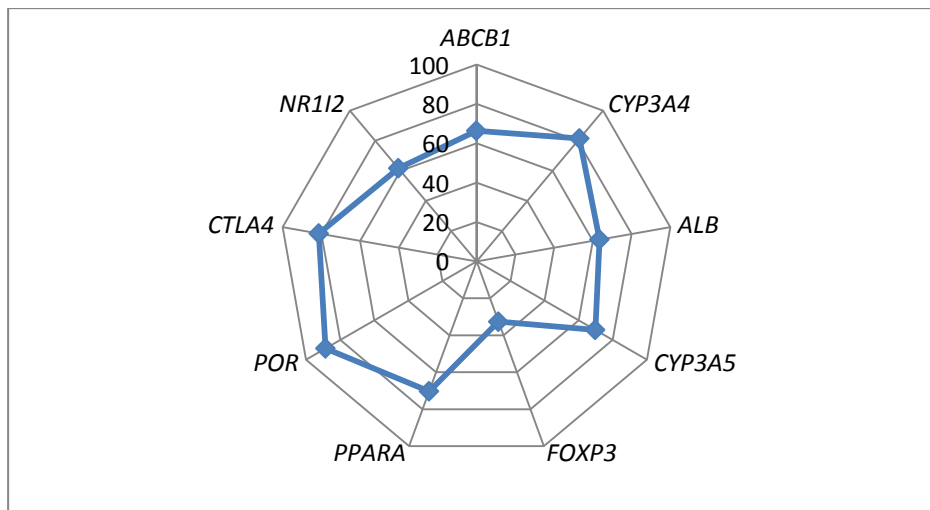
n: Número de pacientes de cada grupo.

#### **4.2. Profundidad de los genes analizados.**

El primer análisis de los datos obtenidos tras la NGS fue la profundidad de lectura o *coverage* de los genes estudiados. Es importante determinar la profundidad de los genes analizados, ya que se evalúa si presentan una calidad suficiente para su posterior análisis.

La media de la profundidad de los genes (Figura 8) es de  $68,42 \pm 5,40$ . Estos valores se consideran lo suficientemente elevados para poder realizar un estudio fiable de las variables, ya que son 4 veces más elevados que el mínimo de calidad establecido que tal y como se definió en métodos era de 15.





**Figura 8:** Profundidad de los genes analizados en el estudio.

### 4.3. Variantes encontradas.

Tras realizar un análisis de todas las regiones codificantes y  $\pm 10$  pb de las zonas intrónicas adyacentes para los 9 genes relacionados con la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus, se detectaron 25 polimorfismos y 2 variantes raras en los genes seleccionados. Para cada variante encontrada se calculó la frecuencia del alelo minoritario (MAF).

A continuación, se realizó un análisis de asociación entre los SNPs detectados y el RMA mediante el programa bioinformático SNPStats, que permite hacer una asociación de los polimorfismos con la respuesta, en este caso RMA. La asociación con la enfermedad se realiza en función de la variable de respuesta, utilizando modelos de regresión lineal (Solé *et al* 2006). Una vez obtenidos los datos de asociación, se procedió a la realización de un test estadístico independiente con el programa R y un segundo análisis en R mediante el test exacto de Fisher.

#### 4.3.1. Variantes en el gen *ALB*.

En el gen *ALB* que codifica la albúmina sérica a la que se une al tacrolimus, se han encontrado 3 polimorfismos, rs35683929, rs61375018 y rs962004, descritos en la Tabla 5. Por otro lado, no se han identificado variantes raras en el gen *ALB*.

**Tabla 5:** SNPs encontrados en el gen *ALB*.

<i>ALB</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs35683929	T	T/C	C	0.0023 (C)	1HZ	0.0192 (C)	Sinónima	c.1230T>C(p.=)
rs61375018	T	T/C	C	0.0046 (C)	1HZ	0.0192 (C)	Intrónica	
rs962004	T	T/C	C	0.4986 (C)	7HM/12HZ	0.5 (C)	Sinónima	c.1668C>T(p.=)

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

Tras el análisis con *SNPStats*, ni las dos variantes sinónimas ni la variante intrónica del gen *ALB* mostraron asociación significativa con la aparición de RMA.

#### 4.3.2. Variantes en el gen *ABCB1*.

En el gen *ABCB1* que codifica la glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 presentaba 7 polimorfismos: rs1045642, rs2214102, rs2032582, rs1128503, rs2235022, rs9282564 y rs2229109 descritos en la Tabla 6.

**Tabla 6:** SNPs encontrados en el gen *ALB*.

<i>ABCB1</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs1045642	A	G/G	G	0.3970 (A)	5HM/12HZ	0,6538	sinónima	c.3435T>C(p.=)
rs2214102	T	T/C	C	0.0403 (T)	20HM/5HZ	0,9615	5'UTR	
rs2032582	A	A/C	C	0.3407 (A)	8HM/8HZ	0,6154	<i>missense</i>	p.Ser893Ala
rs1128503	A	A/G	G	0.4222 (A)	8HM/11HZ	0,6154	sinónima	c.1236T>C(p.=)
rs2235022	T	T/C	C	0.0023 (C)	1HZ	0,0385	sinónima	c.729A>G(p.=)
rs9282564	T	T/C	C	0.0060 (C)	4HZ	0,1538	<i>missense</i>	p.Ile261Val
rs2229109	C	C/T	T	0.0169 (T)	2HZ	0,0769	<i>missense</i>	p.Ser336Asn

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

Tal y como se muestra en la tabla 6, del total de las 7 variantes encontradas:

- 3 son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos: rs1045642, rs1128503 y rs2235022

- 3 corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido en la pauta de lectura: rs28377576, rs3733617 y rs36210417

- 1 de las variantes está presente en la región 5'-UTR: rs2214102

Tras el análisis con *SNPStats*, ninguna variante del gen *ABCB1* mostró asociación significativa con la aparición de RMA.

Por otro lado, no se han identificado variantes raras en el gen *ABCB1*.

#### 4.3.3. Variantes en el gen *CYP3A4* y *CYP3A5*.

Los genes *CYP3A4* y *CYP3A5*, codifican las enzimas CYP3A4 y CYP3A5 que son las principales metabolizadoras del tacrolimus.

En *CYP3A4* se ha encontrado un polimorfismo, rs4986908, que se corresponde a una variante *missense*. La frecuencia es muy baja, ya que sólo está presente en 1 paciente de los 26. Por otra parte, no se ha encontrado ninguna variante rara. (Tabla 7)

**Tabla 7:** SNPs encontrados en el gen *CYP3A4*.

<i>CYP3A4</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs4986908	C	C/G	G	0,00193(G)	1HZ	0.0192 (G)	<i>missense</i>	p.Asp174His

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

En el gen *CYP3A5* se han encontrado 5 polimorfismos: rs28383468, rs6977165, rs28365083, rs28383469 y rs141469784 descritos en la Tabla 8.

**Tabla 8:** SNPs encontrados en el gen *CYP3A5*.

<i>CYP3A5</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs28383468	G	G/A	A	0.0060 (A)	1HZ	0.00192 (A)	<i>missense</i>	p.His30Tyr
rs6977165	T	T/C	C	0.0659 (C)	1HZ	0.00192 (C)	<i>Stop</i>	p.Ter141TrpextTer12
rs28365083	G	G/T	T	0.0014 (T)	1HZ	0.00192 (T)	<i>missense</i>	p.Thr398Asn
rs28383469	C	T/CT	T	0.0014 (T)	1HZ	0.00192 (T)	<i>Frameshit</i>	p.Leu32ThrfsTer3
rs141469784	A	A/G	G	0.0001 (G)	1HZ	0.00192 (G)	<i>missense</i>	p.Met449Thr

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

Los 5 polimorfismos se pueden clasificar:

- 3 variantes *missense* (rs28383468, rs28365083 y rs141469784)

- 1 variante de stop (rs6977165)

- 1 variante *frameshift*, es decir, se produce un desplazamiento del marco de lectura (rs28383469)

En el gen *CYP3A5*, se ha encontrado la variante rara p.Gln117Ter. Esta mutación, en heterocigosis, se encontró en un paciente perteneciente al grupo Control. Como se explica en la Tabla 9, se trata de una mutación por cambio de base, en la que se intercambia una guanina (G) por una adenina (A), viéndose afectada la secuencia codificante. La proteína resultante se ve acortada en un 10%, unos 24 aminoácidos menos que la proteína original.

**Tabla 9:** Descripción de las características de la mutación en el gen *CYP3A5*.

Gen	Mutación	Efecto	HGVS-Cdna	Codón	Exón
<i>CYP3A5</i>	p.Gln117Ter	<i>Nonsense</i>	c117 G>A	cGt/cAt	5

cDNA: ADN codificante

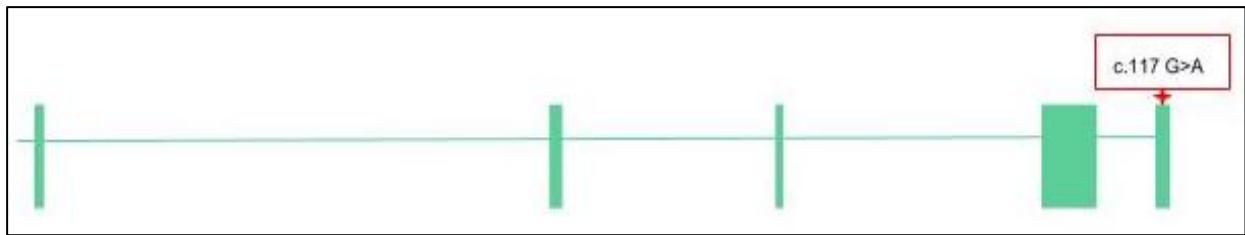
Esta mutación se analizó empleando diferentes herramientas bioinformáticas: *SIFT*, *PolyPhen-2*, *PhD-SNP*, *SNAP2* y *Mutation Taster*. En las predicciones bioinformáticas, tal y como se muestran en la Tabla 10, 4 de los 5 programas reflejan los datos con un NA (No aplicable). Según *Mutation Taster*, la mutación podría ocasionar enfermedad.

**Tabla 10:** Tabla con las predicciones *in silico* del gen *CYP3A5*.

Programa <i>in silico</i>	Predicción
SIFT	NA
PolyPhen-2	NA
PhD-SNP	NA
SNAP2	NA
Mutation Taster	Enfermedad (0.886)

NA: No aplicable

En la Figura 9, podemos ver una representación del gen y dónde se localiza la mutación, señalada con una cruz roja.



**Figura 9:** Representación esquemática del gen *CYP3A5*.

#### 4.3.4. Variantes en el gen *POR*.

En el gen *POR* que codifica a la proteína nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) CYP oxidorreductasa (*POR*) se han encontrado 4 polimorfismos, rs2228104, rs1135612, rs1057868 y rs105870, descritas en la Tabla 11. De las 4 variantes, 3 son sinónimas (rs2228104, rs1135612 y rs1057870) y una es una variante *missense* (rs1057868). En el análisis realizado con el software *SNPStats*, se encontró asociación entre la presencia de 2 SNPs en el gen *POR* (rs1057870 y rs1135612) y el RMA con al menos uno de los modelos de herencia empleados por el software. Una vez obtenidos los datos de asociación, se procedió a la realización del dos test estadísticos independientes con el programa R para estos 2 SNPs rs1057870 y rs1135612. El primero de estos test se realizó con el paquete “SNPassoc”, donde se obtuvieron resultados significativos en la asociación que confirmaron los resultados de *SNPStats*. El segundo análisis se realizó en R mediante el test exacto de Fisher, dando como resultado la pérdida de significación de las dos variantes (p-valor=0,13 y p-valor=0,65 respectivamente). El Anexo 1 reúne los resultados de los análisis estadísticos de asociación.

**Tabla 11:** Características variantes gen *POR*.

<i>POR</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs2228104	C	T/T	T	0.1685 (T)	1HM	0.0192 (T)	sinónima	c.1455T>C
rs1135612	A	A/G	G	0.2853 (G)	4HM/4HZ	0.3077 (G)	sinónima	c.387A>G(p.=)
rs1057868	C	C/T	T	0.2875 (T)	1HM/7HZ	0.3077 (T)	<i>missense</i>	p.Ala503Val
rs1057870	G	G/A	A	0.1841 (A)	3HM/15HZ	0.3461 (A)	sinónima	c.1716G>A(p.=)

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

#### 4.3.5. Variantes en el gen *PPARA*.

En el gen *PPARA* que codifica una proteína receptora nuclear responsable de la variabilidad en la expresión y actividad del CYP3A se ha encontrado un polimorfismo, rs1800206, descrito en la Tabla 12. Es una variante *missense*, presente en 4 pacientes de los 26. Por otro lado, no se ha encontrado ninguna variante rara en el gen *PPARA*.

**Tabla 12:** SNPs encontrados en el gen *PPARA*.

PPARA								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs1800206	C	C/G	G	0.0252 (G)	4HZ	0.0769 (G)	<i>missense</i>	p.Leu162Val

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

#### 4.3.6. Variantes en el gen *NRII2*.

En el gen *NRII2*, que codifica una proteína receptora nuclear, se han encontrado dos polimorfismos, rs12721607 y rs12721613 como se indica en la Tabla 13. Las dos son variantes *missense* y sólo aparecen en 1 paciente, por lo que su frecuencia es muy baja. Por otro lado, no se ha encontrado ninguna variante rara en este gen.

**Tabla 13:** SNPs encontrados en el gen *NRII2*.

NRII2								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs12721607	G	G/A	A	0.0060 (A)	1HZ	0.0192 (A)	<i>missense</i>	p.Gly75Arg
rs12721613	C	C/T	T	0.0371 (T)	1HZ	0.0192 (T)	<i>missense</i>	p.Pro66Ser

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

#### 4.3.7. Variantes en el gen *FOXP3*.

Se ha encontrado un polimorfismo en el gen *FOXP3*, que codifica la proteína FOXP3, el rs2232367, como se indica en la Tabla 14. Es una variante de tipo sinónima, en homocigosis. Sólo se encuentra en un paciente de los 26, por lo que su frecuencia es muy baja.

**Tabla 14:** SNPs encontrados en el gen *FOXP3*.

<i>FOXP3</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs2232367	G	G/A	A	0.0217 (A)	1HM	0.0192 (A)	sinónima	c.543C>T(p.=)

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis.

Por otro lado se ha encontrado una variante rara en el gen *FOXP3*, p.Ser425Tyr. Se trata de una mutación en un paciente Control, y, como se describe en la Tabla 15, se trata de una mutación con cambio de sentido o *missense*, por cambio de base, en la que una guanina (G) se intercambia por una timina (T), haciendo que la secuencia codificante se vea alterada, ya que el aminoácido codificado es una Tirosina (Y) en vez de una Serina (S).

**Tabla 15:** Características de la mutación en el gen *FOXP3*.

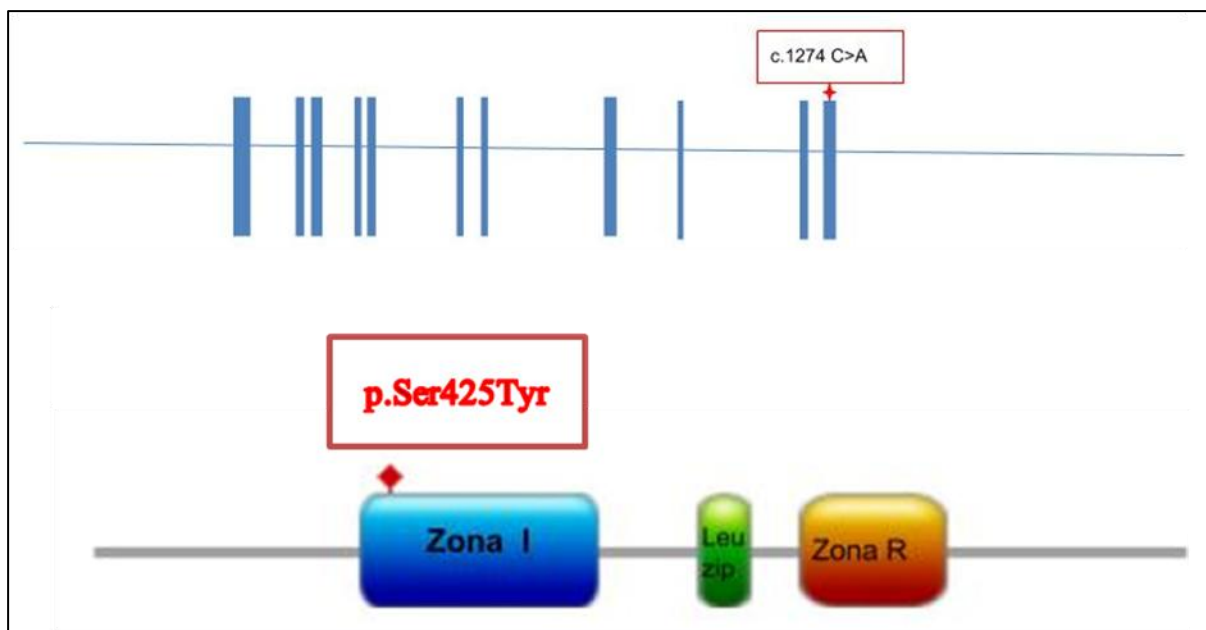
Gen	Mutación	Efecto	HGVS-cDNA	Codón	Exón
<i>FOXP3</i>	p.Ser425Tyr	<i>Missense</i>	c.1274C>A	tCc/tAc	12

La mutación se analizó empleando las diferentes herramientas citadas previamente, según se indica en la Tabla 16, y los resultados muestran mayoritariamente que no tendría efectos funcionales en la proteína *FOXP3*.

**Tabla 16:** Predicciones *in silico* del gen *FOXP3*.

Programa <i>in silico</i>	Predicción
SIFT	Tolerada (0.12)
PolyPhen-2	Posible daño (0.562)
PhDSNP	Tolerada
SNAP2	Tolerada
Mutation Taster	Posible daño (0.555)

Seguidamente, se hizo una representación del gen y de sus exones y se identificaron los dominios de la proteína mediante el programa informático *Prosit* (Figura 10). Con estos datos se realizó una representación de la proteína y la posición dónde se produciría la mutación, identificada con una cruz roja.



**Figura 10:** Representación esquemática del gen *FOXP3* en azul. 3 dominios de la proteína FOXP3. Zona I: Zona de interacción o promotora; Leu zip: Cremallera de leucina; Zona R: Zona de Regulación. En rojo se señala la mutación p.Ser425Tyr.

#### 4.3.8. Variantes en el gen *CTLA4*.

En el gen *CTLA4*, que codifica para la proteína 4 de linfocitos T citotóxicos se ha encontrado un polimorfismo rs231775, descrito en la Tabla 17.

**Tabla 17:** SNPs encontrados en el gen *CTLA4*.

<i>CTLA4</i>								
dbSNP	Ref.	GT	Alelo	MAF (Pubmed)	FV/Control	MAF observado	Efecto	HGVS_prot
rs231775	A	A/G	G	0.4519 (G)	3HM/10HZ	0.3076 (G)	Variante <i>missense</i>	c.49A>G

Chr: cromosoma. Ref: alelo de referencia. GT: genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: Heterocigosis

La variante encontrada es de tipo *missense*. Se encuentra en 3 pacientes en homocigosis y en 10 en heterocigosis. Por otro lado, no se han encontrado variantes raras en el gen.

## 5. DISCUSIÓN

En este TFM se han analizado variantes en los genes que participan en la farmacodinámica, *FOXP3* y en la farmacocinética, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *NR1I2*, *ALB*, *POR*, *CTLA4* y *PPARA* del tacrolimus y que podrían influir en la respuesta individual al mismo en pacientes con trasplante cardíaco y aparición de RMA. Estos pacientes se



dividieron en dos grupos, 11 pacientes que toman tacrolimus y no presentan RMA (Control) y 15 pacientes que toman tacrolimus y sí presentan RMA (RMA). Una vez realizados los análisis bioinformáticos, se han encontrado 25 polimorfismos en los genes seleccionados, pero ninguno de estos SNPs presentaba asociación significativa con el RMA. Por otro lado, se han encontrado dos mutaciones en pacientes Control. La primera de ellas, la mutación p.Gln117Ter en el gen *CYP3A5* y la segunda, p.Ser425Tyr en el gen *FOXP3*.

Aunque en nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre los SNPs analizados con el RMA, haciendo una revisión se han encontrado diferentes estudios que sí han descrito la importancia de variantes en distintos genes en el tratamiento con el tacrolimus. Por un lado, presenta especial interés el análisis realizado por Terrazino *et al*, en el que se describe que el rs1045642 (C.3435C>T) en el gen *ABCB1* está asociado con variaciones en la farmacocinética del tacrolimus (Terrazino *et al*, 2012). Estas variaciones en la farmacocinética son debidas a que el SNP reduce la expresión y función de la p-glicoproteína ácida  $\alpha$ , y por lo tanto la biodisponibilidad del tacrolimus se vería afectada. Esta variante rs1045642 del gen *ABCB1*, se identificó en 19 de los 26 pacientes de nuestro estudio con una frecuencia observada de 0,3653, sin embargo, no se han podido establecer asociaciones significativas con el RMA. Por otro lado, análisis como el de Gervansini *et al* establecen asociaciones entre SNPs del gen *ABCB1* y la toxicidad del tacrolimus, como son rs2032582 y rs1128503. En el estudio de Gervansini *et al* se pudo ver que pacientes homocigóticos para estos SNPs tienen mayor riesgo a toxicidad por tacrolimus (Gervansini *et al*, 2012). En este TFM no se ha estudiado la relación entre tacrolimus y toxicidad, sin embargo sí se ha analizado el rs2032582 y rs1128503 para poder establecer asociaciones significativas con el RMA. El rs2032582 está presente en 18 pacientes, 4 de ellos en homocigosis y con una frecuencia de 0,3461. En cuanto al rs1128503, está presente en 17 pacientes, 4 de ellos en homocigosis con una frecuencia de 0,3269. Ambos SNPs no mostraron asociación significativa con la aparición de RMA, por lo que podría ser interesante ampliar el estudio de estas variantes examinando las concentraciones plasmáticas y las reacciones adversas de cada paciente.

Por otra parte, es importante resaltar que variantes en genes implicados en el metabolismo a través del citocromo P450 se han asociado a la farmacogenética del tacrolimus. Estudios como el de Barbarino *et al* y Tavira *et al* describen variantes en los genes *CYP3A4* y

*CYP3A5* que están relacionadas con la farmacocinética del tacrolimus en pacientes trasplantados de riñón. En particular, cabe destacar el SNP rs776746 en el gen *CYP3A5* y rs2740574 en el gen *CYP3A4*, ya que pueden producir hasta el 45% de la variabilidad interindividual en la biodisponibilidad del tacrolimus, tanto en los pacientes donantes como en los receptores (Tavira *et al*, 2011 Barbarino *et al*, 2013). Sin embargo, las variantes rs776746 y rs2740574 no se identificaron en ninguno de los pacientes de nuestro estudio.

Por último, hemos encontrado una variante en el gen *POR* rs1057870 que está presente en 18 pacientes, con una frecuencia de 0,3461. En el análisis realizado con el software *SNPStats*, se encontró asociación entre el SNP y el RMA con al menos uno de los modelos de herencia empleados por el software. Una vez obtenidos los datos de asociación, se procedió a la realización de dos test estadísticos independientes con el programa R para el rs1057870. El primero de estos test se realizó con el paquete “SNPassoc”, donde se obtuvieron resultados significativos en la asociación que confirmaron los resultados de *SNPStats*. El segundo análisis se realizó en R mediante el test exacto de Fisher, dando como resultado la pérdida de significación de la variante (p-valor=0,13). A la vista de estos resultados, sería interesante ampliar la cohorte a estudio, para ver si se podría establecer una asociación significativa con el RMA. Cabe destacar que el rs1057870 identificado en nuestro análisis se ha analizado en otros estudios, como los de Zhang *et al*, donde se relaciona con la biodisponibilidad de la warfarina, fármaco que tiene un metabolismo similar al tacrolimus. En un análisis de 122 mujeres, 82 de ellas presentaban el rs1057870. Con estos datos se pudo establecer una asociación significativa del SNP con la biodisponibilidad de la warfarina (Zhang *et al*, 2011).

En este estudio hemos descrito por primera vez la p.Gln117Ter en el gen *CYP3A5*, identificada en un paciente Control. El gen *CYP3A5*, que se encuentra en el cromosoma 7 y posee 5 exones, codifica la enzima CYP3A5, que metaboliza la mayoría de los fármacos en hígado e intestino, incluido el fármaco a estudio, el tacrolimus. Al tratarse de un gen muy polimórfico, se cree que contribuye de manera importante en las diferencias interindividuales de respuesta a los fármacos. En el estudio de Quaranta *et al* realizado en 114 pacientes, se ha visto una mutación en el exón 7, c.14690G>A, con una frecuencia menor del 1%. En esta mutación hay un cambio de una Adenina por una Guanina que produce un codón de terminación que acorta la proteína final y reduce su actividad funcional (Quaranta *et al*, 2006). En nuestro caso, la mutación se encuentra en el exón 5,

por lo que la proteína final se ve acortada en un 10%. Sin embargo se sabe que este tipo de mutaciones con codones de terminación prematura podrían ser reparadas por los mecanismos de corrección celular (Hug *et al*, 2016), pero sería necesario realizar estudios funcionales para comprobarlo.

Por último, resulta de vital importancia describir las variaciones en genes relacionados con la farmacodinámica del tacrolimus, como es el caso del gen *FOXP3*. Se han realizado estudios como el de Park *et al* en el que se describe que el genotipo AA del rs3761548 afecta a la zona promotora del gen, alterándose la transcripción y pudiendo así afectar a la funcionalidad de las proteínas involucradas en la respuesta del sistema inmune. Este polimorfismo se asocia con rechazo en pacientes con trasplante renal (Park *et al*, 2017). En este TFM se ha identificado una mutación en el gen *FOXP3*, p.Ser425Tyr, en un paciente Control. Es una mutación con cambio de sentido, sin embargo, las predicciones *in silico* reflejan que dicha mutación podría no tener un efecto sobre la estructura proteica. Sin embargo sería necesario llevar a cabo estudios funcionales para corroborar esta hipótesis.

Por lo tanto, aunque en nuestro trabajo no hayamos encontrado asociación entre variantes de genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus y el RMA, no podemos descartar un posible efecto de estos genes en la farmacogenética del tacrolimus debido al limitado número de pacientes a estudio. Por ello, aumentar la cohorte con estudios multicéntricos sería una alternativa para determinar si existe asociación significativa con los genes a estudio. Además, sería de especial interés revisar las reacciones adversas y los perfiles farmacocinéticos de nuestros pacientes tratados con tacrolimus para poder valorar su asociación con las variantes identificadas.

## 6. CONCLUSIONES.

Tras la realización de este Trabajo Fin de Máster podemos concluir que:

1. Se identificaron 25 variantes: 3 en el gen *ALB*, 7 en *ABCB1*, 1 en *CYP3A4*, 5 en *CYP3A5*, 1 en *FOXP3*, 2 en *NR1I2* y 4 en *POR*, 1 en *PPARA* y 1 en *NR1I2* tras el análisis de las secuencias de 9 genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica en 26 pacientes con TC tratados con tacrolimus.

2. A pesar de que no se ha encontrado asociación significativa entre las variantes detectadas y el RMA, sería interesante ampliar la cohorte de estudio con el fin de corroborar estos resultados.
3. Las predicciones *in silico* realizadas para la mutación p.Gln117Ter en el gen *CYP3A5*, en un paciente Control, predicen que esta podría tener un efecto sobre la proteína. Tal como se ha descrito en la literatura, dicha mutación podría ser corregida por la maquinaria de reparación del ADN impidiendo que la misma llegara a expresarse. No obstante, sería necesario realizar estudios funcionales para comprobar esta hipótesis.
4. Las predicciones *in silico* para la mutación p.Ser425Tyr en el gen *FOXP3*, localizada en un paciente Control, reflejan que dicha mutación podría no tener un efecto sobre la estructura proteica. Sin embargo sería necesario llevar a cabo estudios funcionales para corroborar esta hipótesis.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248.

Alonso-Pulpón, L., Almenar, L., Crespo, M. G., Silva, L., Segovia, J., Manito, N., & Vallés, F. (1999). Guías de actuación clínica de la Sociedad Española de Cardiología. Trasplante cardíaco y de corazón-pulmones. *Revista Española de Cardiología*, 52(10), 821-839.

Barbarino, J. M., Staatz, C. E., Venkataramanan, R., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2013). PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 23(10), 563.

Bromberg, Y., & Rost, B. (2007). SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic acids research*, 35(11), 3823-3835.

Capriotti, E., Calabrese, R., & Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*, 22(22), 2729-2734.

Cattaneo, D., Baldelli, S., & Perico, N. (2008). Pharmacogenetics of immunosuppressants: progress, pitfalls and promises. *American Journal of Transplantation*, 8(7), 1374-1383.

De Jonge, H., Metalidis, C., Naesens, M., Lambrechts, D., & Kuypers, D. R. (2011). The P450 oxidoreductase\* 28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics*, 12(9), 1281-1291

de Luna, C. J., Cervera, M. H., Lázaro, I. S., Bonet, L. A., Andrés, J. P., & Pellicer, S. A. (2011, July). Pharmacogenetic study of ABCB1 and CYP3A5 genes during the first year following heart transplantation regarding tacrolimus or cyclosporine levels. In *Transplantation proceedings* (Vol. 43, No. 6, pp. 2241-2243). Elsevier.

Gervasini, G., Garcia, M., Macias, R. M., Cubero, J. J., Caravaca, F., & Benitez, J. (2012). Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transplant International*, 25(4), 471-480.

González-Vílchez, F., Gómez-Bueno, M., Almenar-Bonet, L., Crespo-Leiro, M. G., del Prado, J. M. A., Delgado-Jiménez, J., & González-Costelo, J. (2017). Registro Español de Trasplante Cardíaco. XXVIII Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2016). *Revista Española de Cardiología*, 70(12), 1098-1109.

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333.

Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.

Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2006). Unidad IV: Aparato circulatorio, capítulo 22: Insuficiencia cardíaca. En: Bonet Serra, B. (Ed) *Guyton & Hall Compendio de fisiología médica*. Barcelona: Elsevier, pp 258-268.

Hesselink, D. A., Bouamar, R., Elens, L., Van Schaik, R. H., & Van Gelder, T. (2014). The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics*, 53(2), 123-139.

Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., & Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 215-219.

- Huang, N., Agrawal, V., Giacomini, K. M., & Miller, W. L. (2008). Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(5), 1733-1738.
- Hug, N., Longman, D., & Cáceres, J. F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic acids research*, *44*(4), 1483-1495.
- Illumina Inc. (2017a). Local Run Manager. Variante Germline Módulo de análisis. Guía de flujo de trabajo para MiSeqDx. N° de documento 1000000041554 v00 ESP. Consultada el 10 de septiembre de 2018, en [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software\\_documentation/local-run-manager/translations/local-run-manager-germline-variant-workflow-guide-for-miseqdx-1000000041554-00-esp.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/local-run-manager/translations/local-run-manager-germline-variant-workflow-guide-for-miseqdx-1000000041554-00-esp.pdf).
- Karczewski, K. J., Weisburd, B., Thomas, B., Solomonson, M., Ruderfer, D. M., Kavanagh, D., & Birnbaum, D. (2016). The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic acids research*, *45*(D1), D840-D845.
- Karen Patrias; Dan Wendling. Citing Medicine, 2nd edition. The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007.
- Kogina, K., Shoda, H., Yamaguchi, Y., Tsuno, N. H., Takahashi, K., Fujio, K., & Yamamoto, K. (2009). Tacrolimus differentially regulates the proliferation of conventional and regulatory CD4+ T cells. *Molecules and cells*, *28*(2), 125-130.
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., & Tukiainen, T. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, *536*(7616), 285.
- Liberman, A. C., Druker, J., Refojo, D., & Arzt, E. (2008). Molecular mechanisms of action of some immunosuppressive drugs. *Medicina*, *68*(6), 455-464.
- Lunde, I., Bremer, S., Midtvedt, K., Mohebi, B., Dahl, M., Bergan, S., & Christensen, H. (2014). The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology*, *70*(6), 685-693.
- Park, H., Lee, N., In, J. W., Roh, E. Y., Park, K. U., Shin, S., & Song, E. Y. (2017). Association of Foxp3 Polymorphism With Allograft Outcome in Kidney Transplantation. *Annals of laboratory medicine*, *37*(5), 420-425.
- Pérez Alonso M, Tolosa A. Los avances genómicos más importantes de los últimos años. Revista genética médica [Sede Web]. 2017. [Acceso el 16 agosto de 2018]. Disponible en <https://revistageneticamedica.com/blog/15-avances-genomicos/>. Valencia.
- Quaranta, S., Chevalier, D., Bourgarel-Rey, V., Allorge, D., Solas, C., Lo-Guidice, J. M., & Lhermitte, M. (2006). Identification by single-strand conformational polymorphism analysis of known and new mutations of the CYP3A5 gene in a French population. *Toxicology letters*, *164*(2), 177-184.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, *29*(1), 24.
- Sadaba, B. (2006, August). Monitorización y efectos secundarios de los inmunosupresores en el trasplante. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 29, pp. 207-218).
- Sánchez-Marteles, M., Gracia, J. R., & López, I. G. (2016). Fisiopatología de la insuficiencia cardiaca aguda: un mundo por conocer. *Revista Clínica Española*, *216*(1), 38-46.
- Sanofi-aventis. Ficha Técnica Prednisona Alonga. Barcelona. 2017. Informe Técnico del Ministerio de Sanidad.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, *11*(4), 361.

- Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1), 308-311.
- Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Web Server issue):W452-457.
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22(15), 1928-1929.
- Staatz, C. E., & Tett, S. E. (2004). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics*, 43(10), 623-653.
- Staatz, C. E., Goodman, L. K., & Tett, S. E. (2010). Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clinical pharmacokinetics*, 49(3), 141-175.
- Stada. Ficha técnica tacrolimus Stada. Barcelona. 2011. Informe Técnico del Ministerio de Sanidad.
- Stenson PD1, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 Update. *Hum Mutat.* 2003; 21(6):577-581.
- Stepkowski, S. M. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert reviews in molecular medicine*, 2(4), 1-23.
- Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., & Taga, T. (1987). Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society*, 109(16), 5031-5033.
- Tavira, B., Garcíá, E. C., Díaz-Corte, C., Ortega, F., Arias, M., Torres, A., & Alvarezca, V. (2011). Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 49(5), 825-833.
- Terrazzino, S., Quaglia, M., Stratta, P., Canonico, P. L., & Genazzani, A. A. (2012). 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. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(8), 642-645.
- The R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. Consultada el 10 de septiembre de 2018, en <https://www.r-project.org/>.
- Ubilla, M., Mastrobuoni, S., Martín Arnau, A., Cordero, A., Alegría, E., Gavira, J. J., & Rabago, G. (2006, August). Trasplante cardíaco. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 29, pp. 63-78). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V., Starzl, T. (1995). Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clinical pharmacokinetics*, 29(6), 404-430.
- Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S. A., Cooke, G. E., & Sadee, W. (2011). Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *The pharmacogenomics journal*, 11(4), 274.
- Zhang, X., Lin, G., Tan, L., & Li, J. (2018). Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: pharmacogenetic considerations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 107-114.

**ANEXOS:**

**ANEXO 1:** Resultados de los análisis de asociación de los rs1135612 y rs1057870.

<b>rs1135612</b>	<b>Modelo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Control</b>	<b>RMA</b>	<b>OR (95% IC)</b>	<b>p-valor</b>
<b>SNPstats</b>	Codominante	A/A	5 (55.6%)	11 (73.3%)	1.00	<b>0.0026</b>
		A/G	4 (44.4%)	0 (0%)	0.00	
		G/G	0 (0%)	4 (26.7%)	0.00	
	Dominante	A/A	5 (55.6%)	11 (73.3%)	1.00	<b>0.37</b>
		A/G-G/G	4 (44.4%)	4 (23.7%)	0.45 (0.08-2.60)	
	Recesivo	A/A-A/G	9 (100%)	11 (73.3%)	1.00	<b>0.04</b>
		G/G	0 (0%)	4 (26.7%)	0.45 (0.08-2.60)	
	Sobredominante	A/A-G/G	5 (55.6%)	15 (100%)	1.00	<b>0.0023</b>
		A/G	4 (44.4%)	0 (0%)	0.00	
	Log-aditivo	---	---	---	---	---
<b>R (F(x) asociación)</b>	Codominante	A/A	5 (55.6%)	11 (73.3%)	1.00	<b>0.0026</b>
		A/G	4 (44.4%)	0 (0%)	0.00	
		G/G	0 (0%)	4 (26.7%)	0.00	
	Dominante	A/A	5 (55.6%)	11 (73.3%)	1.00	<b>0.37</b>
		A/G-G/G	4 (44.4%)	4 (23.7%)	0.45	
	Recesivo	A/A-A/G	9 (100%)	11 (73.3%)	1.00	<b>0.04</b>
		G/G	0 (0%)	4 (26.7%)	0.45	
	Sobredominante	A/A-G/G	5 (55.6%)	15 (100%)	1.00	<b>0.0023</b>
		A/G	4 (44.4%)	0 (0%)	0.00	
	Log-aditivo	---	---	---	---	---
<b>Test de Fisher</b>	<b>0.1365</b>					

OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza



rs1057870	Modelo	Genotipo	Control	RMA	OR (95% IC)	p-valor
SNPstats	Codominante	G/G	2 (18.2%)	6 (40%)	1.00	<b>0.0044</b>
		G/A	9 (81.8%)	6 (40%)	0.22 (0.03-1.49)	
		G/G	0 (0%)	3 (20%)	0.00	
	Dominante	G/G	2 (18.2%)	6 (40%)	1.00	<b>0.22</b>
		G/A-A/A	9 (81.8%)	9 (60%)	0.33	
	Recesivo	G/G-G/A	11 (100%)	12 (80%)	1.00	<b>0.058</b>
		A/A	0 (0%)	3 (20%)	0.00	
	Sobredominante	G/G-A/A	2 (18.2%)	9 (40%)	1.00	<b>0.0028</b>
		G/A	9 (81.8%)	6 (60%)	0.15(0.02-0.94)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	---
R (F(x) asociación)	Codominante	G/G	2 (18.2%)	6 (40%)	1.00	<b>0.0044</b>
		G/A	9 (81.8%)	6 (40%)	0.22	
		G/G	0 (0%)	3 (20%)	0.00	
	Dominante	G/G	2 (18.2%)	6 (40%)	1.00	<b>0.22</b>
		G/A-A/A	9 (81.8%)	9 (60%)	0.33	
	Recesivo	G/G-G/A	11 (100%)	12 (80%)	1.00	<b>0.058</b>
		A/A	0 (0%)	3 (20%)	0.00	
	Sobredominante	G/G-A/A	2 (18.2%)	9 (40%)	1.00	<b>0.0028</b>
		G/A	9 (81.8%)	6 (60%)	0.15	
	Log-aditivo	---	---	---	---	---
Test de Fisher	<b>0.6576</b>					

OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza