



**Estudio farmacogenético sobre la ciclosporina en pacientes con trasplante cardíaco.**

**Pharmacogenetics analysis of cyclosporine in heart transplant patients.**

**Estudo farmacoxenético sobre a ciclosporina en pacientes con trasplante cardíaco.**

---

---

***Lucía Gómez Barral***

Tutores: Dra Lucía Núñez Fernández

Dr Manuel Hermida Prieto

Máster en Biotecnología Avanzada

Curso 2017-2019

4 de Febrero de 2019



Estudio farmacogenético sobre la ciclosporina en pacientes con trasplante cardíaco.

Pharmacogenetic study about cyclosporine in heart transplant patients.

Estudo farmacoxenético sobre a ciclosporina en pacientes con transplante cardíaco.

La Dra. Lucía Núñez Fernández y el Dr. Manuel Hermida Prieto en calidad de tutores académicos, autorizan la presentación ante el Tribunal Evaluador del presente Trabajo Fin de Máster realizado por Lucía Gómez Barral.

Dra. Lucía Núñez Fernández

Dr. Manuel Hermida Prieto

A Coruña, 4 Febrero de 2019

# Índice

---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Insuficiencia cardíaca y trasplante cardíaco.....	1
1.2 Tratamiento inmunosupresor .....	2
1.2.1 Ciclosporina A.....	5
1.3 Farmacogenética de la ciclosporina.....	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	11
2.1 Hipótesis .....	11
2.2 Objetivos.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1 Población de estudio.....	11
3.2 Análisis bioinformático de los datos obtenidos por NGS .....	12
3.2.1 Profundidad de lectura de los genes analizados .....	13
3.2.2 Visualización de las secuencias.....	14
3.2.3 Identificación de variantes .....	15
3.3 Estudio de asociación de variantes .....	15
3.3.1 Recogida de datos .....	15
3.3.2 Asociación de variantes con RMA en el TC .....	16
3.3.3 Asociación de variantes con NEFTX en el TC .....	17
3.4 Análisis de variantes.....	17
3.4.1 Búsqueda bibliográfica. ....	17
3.4.2 Predicciones bioinformáticas. ....	17
4. RESULTADOS .....	18
4.1 Profundidad de lectura de los genes analizados .....	18
4.2 Análisis del gen <i>ABCB1</i> .....	18
4.2.1 Variantes encontradas en el gen <i>ABCB1</i> .....	18
4.2.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>ABCB1</i> .....	19
4.3 Análisis del gen <i>CYP3A4</i> .....	20
4.3.1 Variantes encontradas en el gen <i>CYP3A4</i> .....	20
4.3.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>CYP3A4</i> .....	20
4.4 Análisis del gen <i>CYP3A5</i> .....	20
4.4.1 Variantes encontradas en el gen <i>CYP3A5</i> .....	20
4.4.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>CYP3A5</i> .....	21

4.5	Análisis del gen <i>NOD2</i> .....	21
4.5.1	Variantes encontradas en el gen <i>NOD2</i> .....	21
4.5.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>NOD2</i> .....	22
4.6	Análisis del gen <i>PPIA</i> .....	22
4.6.1	Variantes encontradas en el gen <i>PPIA</i> .....	22
4.6.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>PPIA</i> .....	23
4.7	Análisis del gen <i>POR</i> .....	23
4.7.1	Variantes encontradas en el gen <i>POR</i> .....	23
4.7.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>POR</i> .....	23
4.8	Análisis del gen <i>XPC</i> .....	24
4.8.1	Variantes encontradas en el gen <i>XPC</i> .....	24
4.8.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>XPC</i> .....	25
4.9	Análisis del gen <i>GAN</i> .....	25
4.9.1	Variantes encontradas en el gen <i>GAN</i> .....	25
4.9.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>GAN</i> .....	26
4.10	Análisis del gen <i>CYP2C9</i> .....	26
4.10.1	Variantes encontradas en el gen <i>CYP2C9</i> .....	26
4.10.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>CYP2C9</i> .....	26
4.11	Análisis del gen <i>MTRR</i> .....	27
4.11.1	Variantes encontradas en el gen <i>MTRR</i> .....	27
4.12	Análisis del gen <i>PAX4</i> .....	28
4.12.1	Variantes encontradas en el gen <i>PAX4</i> .....	28
4.12.2	Análisis de asociación de las variantes en el gen <i>PAX4</i> .....	28
4.13	Mutaciones encontradas en los genes estudiados .....	29
5.	DISCUSIÓN.....	30
5.1.	Variantes identificadas en los Genes seleccionados.....	30
5.2.	Mutación identificada en el gen <i>CYP3A5</i> .....	33
6.	CONCLUSIÓN.....	34
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	36

## Abreviaturas:

AZA: Azatioprina

AUC: Área bajo la curva

BAM: *Binary alignment/map format*

CaN: Calcineurina

CHUAC: Complejo Hospitalario de A Coruña

Cmax: Concentración máxima

Cmin: Concentración mínima

CpN: Ciclofilina

CsA: Ciclosporina A

dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism Database*

ESM: Error estándar de la media

EST: Esteroides

EVL: Everolimus

ExAc: *Exome Aggregation consortium*

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HM: Homocigosis

HZ: Heterocigosis

IC: Insuficiencia cardíaca

ICN: Inhibidores de la calcineurina

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

MAF: *Minor allele frequency*

MMF: Mofetil micofenolato

mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*

NA: *Not available*

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

NGS: *Next Generation Sequencing*

NMD: *Nonsense-Mediated mRNA Decay*

NYHA: *New York Heart Association*

RMA: Rechazo mediado por anticuerpos

rs: *Reference SNP*

SIFT: *Sorting Intolerant from Tolerant*

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

SRL: Sirolimus

STD: Desviación estándar

TAC: Tacrolimus

TC: Trasplante cardíaco

TFM: Trabajo de fin de máster

VCF: *Variant Call Format*.

## RESUMEN

El trasplante cardíaco (TC) continúa siendo el tratamiento de elección para pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) avanzada. Una de las principales complicaciones tras un TC es la aparición de rechazo mediado por anticuerpos (RMA), para evitarlo es imprescindible una correcta terapia inmunosupresora. La ciclosporina A (CsA) es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento inmunosupresor de los pacientes con TC. Sin embargo, presenta una gran variabilidad farmacocinética y farmacodinámica, que dificultan la adaptación de la terapia. Se ha estimado que la genética puede ser responsable de entre el 20% al 95% de esta variabilidad. En este estudio se analizarán las variantes presentes en 11 genes (*ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *PPIA*, *NOD2*, *XPC*, *MTRR*, *PAX4*, *GAN*, *POR*, *CYP2C9*) que intervienen en la farmacodinámica y la farmacocinética de la CsA, el RMA así como en el desarrollo de nefrotoxicidad. Para ello se analizarán datos de una cohorte de 29 pacientes tratados con CsA a los que se les ha practicado un TC. Se clasifican en dos grupos, uno “RMA” y otro “Control”, según presenten o no RMA. Además se realizará una segunda clasificación en otros dos grupos, “NEFTX” y “Control” según presentaran o no nefrotoxicidad. Nuestro objetivo es determinar la asociación entre la presencia en estos genes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y la aparición de RMA o nefrotoxicidad. Se identificaron 66 SNPs y una mutación en los 11 genes analizados. Sin embargo, no se encontró asociación entre estas variantes y el desarrollo de RMA o nefrotoxicidad. Ampliar la cohorte de estudio mediante un estudio multicéntrico y monitorizar la concentración plasmática del fármaco podría esclarecer las implicaciones de estas variantes en la farmacogenética de la CsA.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Insuficiencia cardíaca y trasplante cardíaco

La insuficiencia cardíaca (IC) se define como la incapacidad del corazón para suministrar a los tejidos periféricos la cantidad de sangre y oxígeno necesaria para satisfacer sus demandas metabólicas (Tanai & Frantz, 2016). Esta enfermedad se caracteriza por una serie de síntomas y signos como son la disnea, ortopnea, presión venosa yugular elevada, inflamación de tobillos, entre otros. Estos síntomas y signos están causados por una anomalía cardíaca estructural o funcional que producen una reducción del gasto cardíaco o una elevación de las presiones intracardiacas en reposo o en estrés (Ponikowski, *et al* 2016).

La gravedad de la IC se clasifica de acuerdo con la clasificación funcional de la *New York Heart Association* (NYHA) atendiendo a los síntomas clínicos y la actividad física del paciente (Tabla 1)(Tanai & Frantz, 2016).

**Tabla 1:** Clasificación de IC de acuerdo con la *New York Heart Association* (Tanai & Frantz, 2016).

<b>New York Heart Association (NYHA) Clasificación funcional</b>	
<b>Clase</b>	<b>Severidad de los síntomas y actividad física</b>
I.	No limitación de la actividad física. Actividad física ordinaria no causa dificultad respiratoria, fatiga o palpitaciones.
II.	Ligera limitación de la actividad física. Cómodo en reposo, pero la actividad física ordinaria resulta en falta de aliento, fatiga o palpitaciones excesivas.
III.	Marcada limitación de la actividad física. Cómodo en reposo, pero la actividad física menos que ordinaria resulta en falta de aliento, fatiga o palpitaciones excesivas.
IV.	Incapaz de realizar cualquier actividad física sin molestias. Los síntomas en reposo pueden estar presentes. Si se realiza alguna actividad física, aumenta el malestar.

Los pacientes con IC de clase avanzada tienden a requerir hospitalización recurrente a pesar del tratamiento, y suelen requerir intervenciones especializadas como dispositivos de asistencia ventricular o trasplante cardíaco (TC) (Alrajes & Eckman, 2014).

El TC es un tratamiento que mejora la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes con IC avanzada; concretamente en España en el año 2017 se realizaron 304 trasplantes cardíacos (ONT, 2017). Los problemas principales del trasplante son la escasez de donantes y las complicaciones asociadas al mismo (Ponikowski, *et al* 2016). Entre las

complicaciones tempranas están el fallo primario del injerto, la disfunción ventricular derecha, el rechazo agudo y las infecciones; mientras que las complicaciones tardías incluyen la vasculopatía, neoplasia y rechazo del aloinjerto.

Sobre el rechazo debemos indicar que hay dos tipos: el celular y el humoral o rechazo mediado por anticuerpos (RMA) y para su diagnóstico es preciso realizar una técnica invasiva, la biopsia endomiocárdica (Strecker, *et al*, 2013). En el rechazo celular pueden intervenir 3 tipos de mecanismos celulares: *a*) linfocitos T citotóxicos, *b*) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, y *c*) actividad citotóxica natural o NK (Martín-Dávila *et al*, 2007). El otro tipo de rechazo es el RMA y se desarrolla cuando los anticuerpos del receptor se dirigen contra los antígenos HLA del donante en el endotelio de aloinjerto, que inicia la cascada del complemento y causa lesión tisular a través de vías inflamatorias (Kim *et al*, 2018).

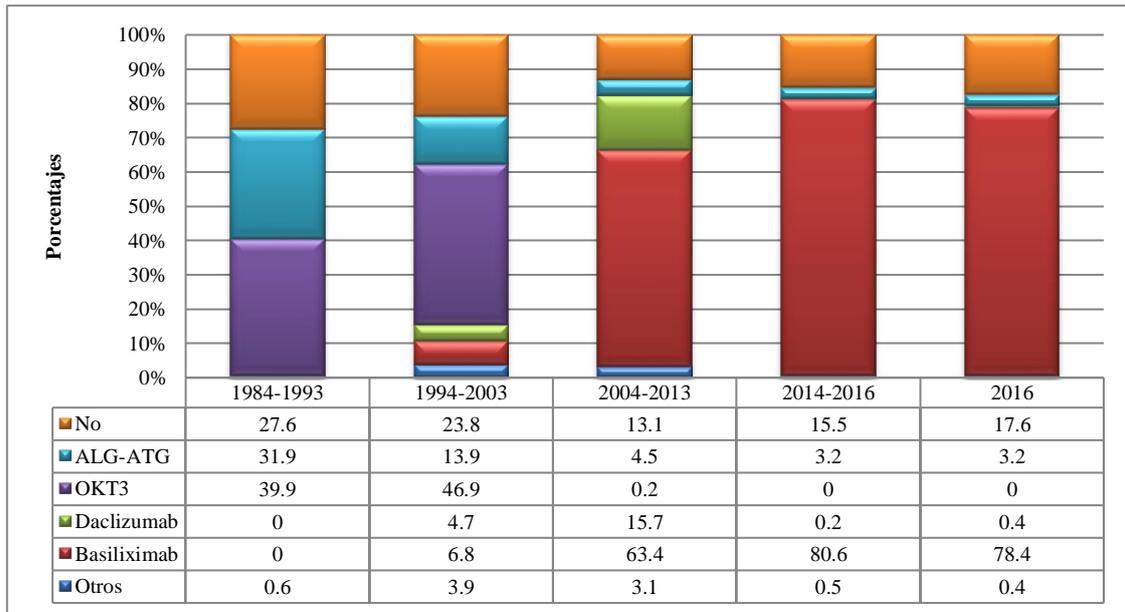
Es crucial la elección de una terapia inmunosupresora óptima para asegurar el éxito del TC, además de minimizar las complicaciones debidas a la propia terapia.

## **1.2 Tratamiento inmunosupresor**

Los inmunosupresores que se emplean hoy en día para prevenir el rechazo, actúan sobre la activación de linfocitos T y B, sobre la producción de citocinas, la expansión clonal o ambos procesos (Crespo Leiro, 2001).

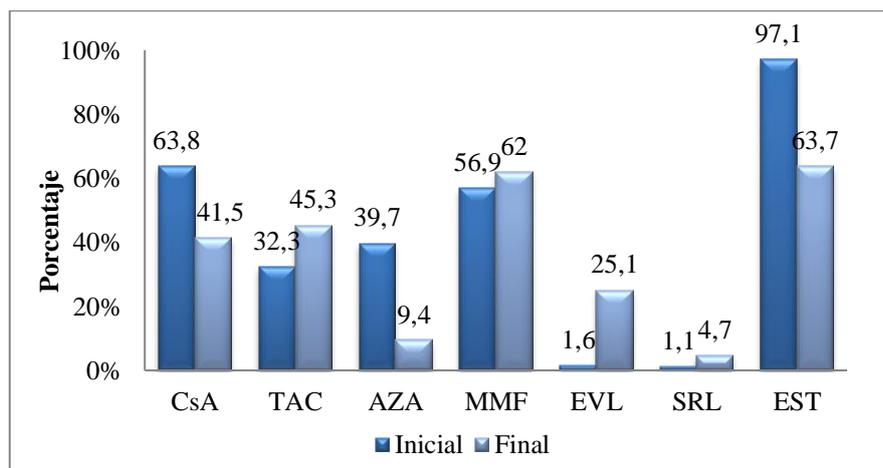
El tratamiento inmunosupresor post-trasplante comprende tres fases: *a*) Inducción; *b*) Mantenimiento, y *c*) Antirrechazo.

*a) Inducción:* se administra los días posteriores al trasplante y se emplean fármacos asociados a agentes biológicos. El basiliximab, un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad  $\alpha$  de los receptores de IL-2 en la superficie de los linfocitos T activados, es el más utilizado en la actualidad (Figura 1) (Ramirez & Marino, 2007). Esta terapia consigue una marcada reducción del rechazo en el período postoperatorio temprano y permite retrasar la introducción de agentes de mayor toxicidad, reduciendo así el riesgo de disfunción renal (Lindenfeld *et al*, 2004).



**Figura 1:** Fármacos utilizados en la inmunosupresión de inducción (González *et al*, 2017).

*b) Mantenimiento:* la terapia de mantenimiento se inicia tras los primeros días del trasplante y consiste en la denominada triple terapia: anticalcineurínico, antiproliferativo y esteroides (Figura 2). Son fármacos que interfieren en diferentes lugares de la cascada de activación de los linfocitos T y B. La ciclosporina A (CsA) y el tacrolimus (TAC) inhiben la transcripción de citocinas. La azatioprina (AZA) y el mofetil micofenolato (MMF) inhiben la síntesis de nucleótidos. Los inhibidores del mTOR: sirolimus (SRL) o rapamicina y everolimus (EVL), inhiben la transducción de la señal de factores de crecimiento (Martín-Dávila *et al*, 2006).



**Figura 2:** Inmunosupresión de mantenimiento. Variaciones evolutivas según el tipo de fármaco: al inicio del trasplante y al final del seguimiento. EST: esteroides (González, *et al* 2017).

A continuación detallaremos los principales principios activos utilizados en la triple terapia durante la fase de mantenimiento:

- Anticalcineurínicos:

Los inhibidores de la calcineurina (ICN) CsA y TAC han disminuido en gran medida la incidencia de rechazo de aloinjerto. Estos inmunosupresores inhiben la activación de las células T al unirse a inmunofilinas intracelulares; la CsA se une a la ciclofilina A y el TAC a la proteína de unión a FK-12 (Duncan & Wilkes, 2005).

- Antiproliferativos:

Los principales agentes antiproliferativos empleados en la triple terapia son la AZA y el MMF.

La AZA es un antagonista de las purinas, que interfiere en la síntesis de ácidos nucleicos durante la expansión clonal de las células produciendo una disminución de la síntesis de ADN y de las moléculas precursoras (Martín-Dávila *et al*, 2006).

El MMF fue introducido como una alternativa a la AZA y se encontró que proporciona una profilaxis superior contra el rechazo agudo después del trasplante renal y cardíaco. Es un antimetabolito que inhibe de manera reversible la enzima IMPDH, una enzima que limita la síntesis *de novo* de purinas, evita la proliferación de células T y B e inhibe la producción de anticuerpos (Almenara *et al*, 2010).

Existen otros inmunosupresores que pueden ser incluidos en la terapia de mantenimiento, como los inhibidores de mTOR. Entre ellos se encuentra el SRL, que inhibe la activación y proliferación de linfocitos T que se produce en respuesta a la estimulación antigénica y por citoquinas (Noguera *et al*, 2002).

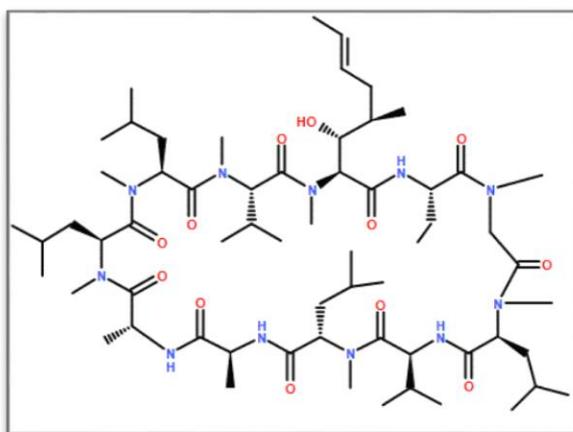
*c) Antirrechazo:* si las anteriores terapias de carácter preventivo fracasan y se produce un episodio de rechazo debe comenzarse la terapia antirrechazo, que será diferente según el tipo de rechazo que se produzca. Si se trata de rechazo celular, el tratamiento se basa en esteroides y anticuerpos antilinfocitarios OKT3; en el RMA, se utilizan esteroides, plasmaféresis, ciclofosfamida, rituximab e inmunoglobulinas (Almenara *et al*, 2010).

Los fármacos de elección en las diferentes terapias y la dosis de los mismos se determinan según el riesgo estimado de rechazo y van a ser diferentes en función del protocolo del centro

(Almenara *et al*, 2010). Podemos apreciar que hay un fármaco que ha estado muy presente en la gran mayoría de los regímenes inmunosupresores, la CsA. Su introducción a principios de los años 80 ha revolucionado el trasplante de órganos (Han *et al*, 2013). En este trabajo abordaremos la farmacogenética de este fármaco y veremos si la variabilidad genética observada podría afectar a la respuesta del paciente ante el fármaco y por tanto esto influir en éxito del TC.

### 1.2.1 Ciclosporina A

La CsA es un undecapéptido cíclico (Figura 3), se aisló por primera vez en 1971 del hongo *Tolypocladium inflatum* (Cascorbi, 2018). Su importancia en el campo del trasplante se debe a su efecto inmunosupresor que permitió disminuir significativamente la tasa de rechazo y prolongar la supervivencia del paciente y del aloinjerto (Burdmann *et al*, 2003).

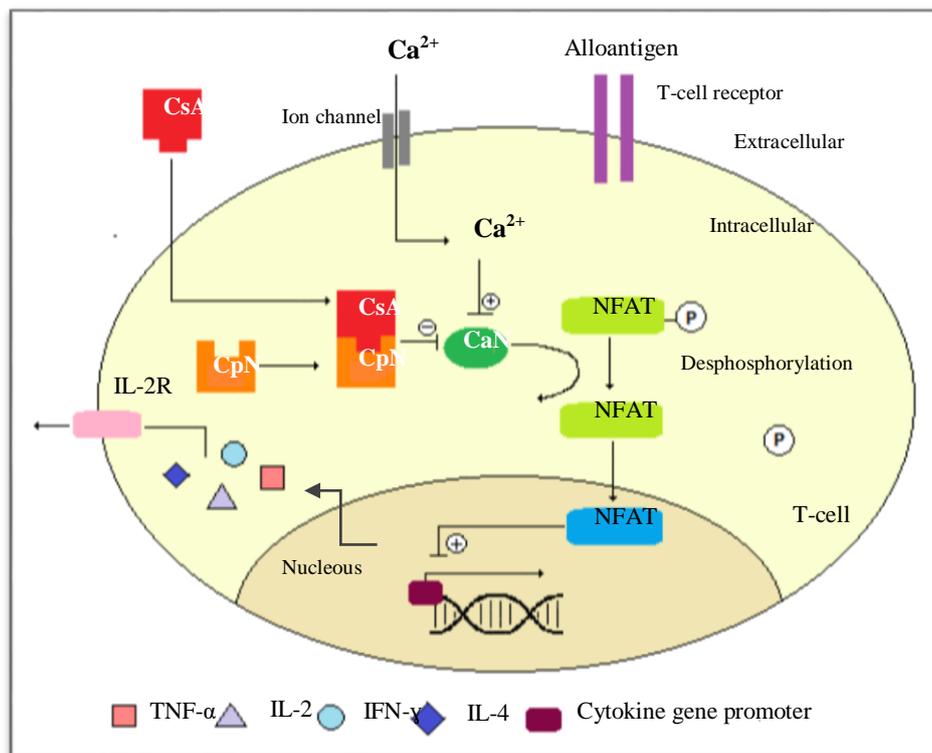


**Figura 3:** Estructura de la ciclosporina A (Royal Society of Chemistry, 2019).

#### 1.2.1.1 Farmacodinamia

La actividad inmunosupresora de la CsA se debe a que inhibe la activación y proliferación de los linfocitos T. En condiciones normales, cuando el péptido antigénico es presentado al receptor de células T, desencadena una señalización intracelular. Esta señalización dependiente del calcio resulta en la activación de la calcineurina (CaN), una proteína fosfatasa calcio-calmodulina dependiente (Tedesco & Haragsim, 2012). La CaN desfosforila al factor nuclear de células T activadas (NFAT), permitiendo su traslocación del citoplasma al núcleo. El NFAT promueve la unión de los factores de transcripción a los genes que codifican para las citoquinas proinflamatorias (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) (Figura 4).

La actividad inmunosupresora de la CsA se debe a que forma un complejo con una inmunofilina, la ciclofilina (CpN). Este complejo se une a la CaN, inhibiendo su actividad. Por lo tanto, se inhibe la activación y proliferación de los linfocitos T, las células no responden a la estimulación específica de antígenos debilitándose así el sistema inmunológico (Guada *et al*, 2016, Martín-Dávila *et al*, 2006).



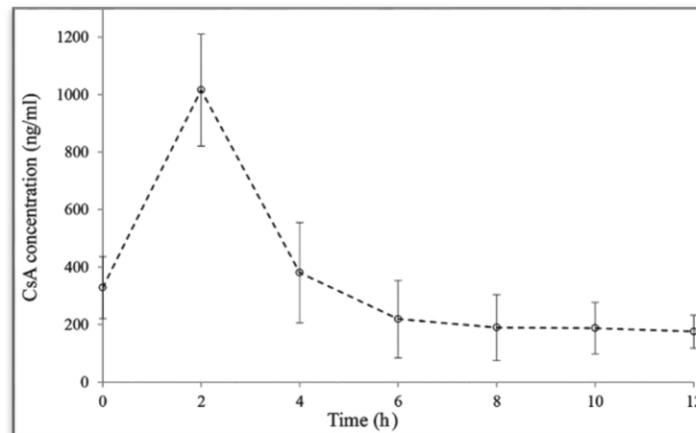
**Figura 4:** Mecanismo de acción de la ciclosporina. IL-2R: receptor para IL2 (Stepkowski, 2000).

### 1.2.1.2 Farmacocinética

La CsA es altamente lipófila y su absorción oral es lenta e incompleta. Su biodisponibilidad oral oscila entre el 10 y el 89%, se distribuye ampliamente en los tejidos periféricos. Su distribución es de aproximadamente entre un 41%-58% en eritrocitos, 33%-47% en plasma, 5-12% en granulocitos y 4 a 9% en linfocitos. (Han *et al*, 2013).

La CsA tiene una ventana terapéutica relativamente estrecha. Por este estrecho margen terapéutico, además de la elevada variabilidad de su biodisponibilidad, se debe monitorizar la concentración de CsA (Shu *et al*, 2015). Se recomienda la monitorización de la concentración de CsA a las 2h después de la administración (C2); ya que se correlaciona

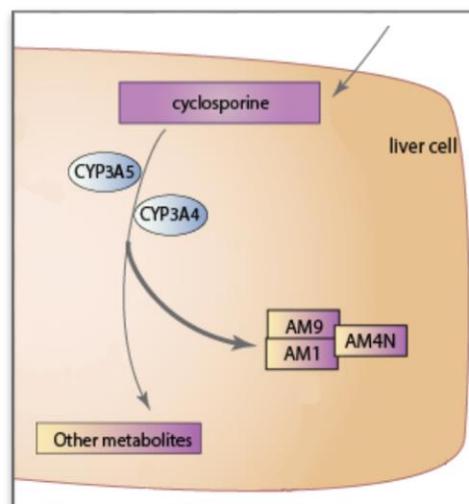
mejor con la exposición total y es en ese momento cuando alcanza la concentración máxima (Figura 5).



**Figura 5:** Perfil farmacocinético de la CsA (Jia *et al*, 2018).

La introducción de la microemulsión de CsA (Sandimmun Neoral®) en la década de los noventa, logró una farmacocinética más previsible en comparación con la formulación lipofílica original (Eisen & Ross, 2004).

El metabolismo de la CsA es principalmente hepático, a través del sistema de enzimas citocromo P450 (Figura 6). Sin embargo, también se metaboliza en el tracto gastrointestinal y el riñón en menor grado. La oxidación y la desmetilación de las cadenas laterales conducen a la formación de al menos 30 metabolitos, entre los que destacan los metabolitos AM1, AM9 y AM4N (Zununi *et al*, 2015).



**Figura 6:** Metabolismo principal de la ciclosporina A (Barbarino *et al*, 2013).

La eliminación de la CsA es fundamentalmente biliar. Únicamente el 6% se elimina en la orina, principalmente como metabolitos, y sólo el 0,1% como fármaco inalterado. La concentración plasmática disminuye de una manera bifásica con una vida media de eliminación terminal de 8,4 h aproximadamente (AEMPS, 2018; Wu y Kuca, 2018; Guada *et al*, 2016).

### **1.2.1.3 Reacciones adversas**

Las reacciones adversas derivadas del tratamiento con CsA son en general dosis-dependientes, cuanto mayor sea la dosis mayor incidencia de reacciones adversas. Como hemos visto anteriormente, este fármaco presenta un estrecho margen terapéutico. Por ello, es imprescindible un ajuste correcto de la dosis, ya que por debajo del nivel terapéutico puede producirse el rechazo del aloinjerto; por encima, se incrementará la toxicidad.

Entre las reacciones adversas informadas se incluyen la nefrotoxicidad, hipertensión, diabetes mellitus, hiperlipidemia, hiperplasia gingival, hirsutismo y neoplasia linfoproliferativa (Jia *et al*, 2018). La nefrotoxicidad es la principal preocupación en los pacientes tratados con CsA, se puede presentar de manera aguda o crónica.

La nefrotoxicidad aguda se caracteriza por constricción de la arteriola glomerular aferente, que da lugar a una reducción de la tasa de filtración glomerular, disminución del flujo sanguíneo renal, junto con un aumento de los parámetros bioquímicos séricos, como la urea y la creatinina. Este deterioro de la función renal es generalmente reversible y dosis dependiente, por lo que se solucionará reduciendo la dosis.

El tratamiento a largo plazo con CsA puede conducir a efectos nefrotóxicos crónicos. El deterioro estructural y funcional renal en este caso es irreversible; se puede presentar fibrosis intersticial, engrosamiento y fibrosis de la cápsula de Bowman, atrofia tubular, y esclerosis glomerular (Burdmann *et al*, 2015).

En la práctica clínica, hay pacientes que responden extraordinariamente bien, también los hay que muestran una buena respuesta pero con reacciones adversas, e incluso otros que no responden al tratamiento (Gervasini, 2018). Las diferencias interindividuales pueden ser debidas a la carga genética del receptor y dan como resultado una considerable variabilidad en la farmacocinética, la farmacodinámica, la toxicidad y la aparición de RMA.

### 1.3 Farmacogenética de la ciclosporina

La farmacogenética estudia cómo las variantes genéticas del paciente pueden afectar a la respuesta que presenta a un tratamiento. Se ha estimado que la genética puede representar de un 20% a 95% de la variabilidad en la disposición y el efecto de los medicamentos (Jonge & Kuypers, 2008). La farmacogenética puede explicar esta variabilidad en términos de la absorción y biodisponibilidad de la CsA, la susceptibilidad a reacciones adversas y al desarrollo de RMA.

Como hemos visto anteriormente la biodisponibilidad de la CsA presenta una gran variabilidad interindividual. A continuación veremos los genes con un posible papel en la farmacodinámica y la farmacocinética de la CsA:

- a. Se ha sugerido en diversos estudios que en gran parte se debe a la diferente expresión de *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1* (García *et al*, 2013; Grinyó *et al*, 2008; Hauser *et al*, 2005). Las isoenzimas del grupo CYP metabolizan en el hígado más del 50% de los fármacos utilizados en la actualidad. (Isla *et al*, 2009). Las enzimas *CYP3A4* y *CYP3A5* son las principales responsables del metabolismo de la CsA. La expresión de *CYP3A5* es altamente polimórfica y está determinada en gran medida por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Zheng *et al*, 2013). La expresión y la actividad de la enzima *CYP3A4* presentan una alta variabilidad interindividual. Se han identificado SNPs relacionados con la reducción de la expresión y la actividad de *CYP3A4*, constituyendo un factor de riesgo para el injerto y un empeoramiento del aclaramiento de creatinina (Sharaki *et al*, 2015).
- b. La oxidorreductasa (POR) del citocromo P450 es una flavoproteína que dona electrones a todas las enzimas microsomales P450, incluidas la *CYP3A4*, y *CYP3A5*, por lo que es imprescindible para su actividad metabólica. Zhang *et al*. concluyeron que los SNP en el gen *POR* influyen en las tasas de metabólica de fármacos metabolizados por enzimas de la familia CYP (Zhang *et al*, 2011). La correlación entre los polimorfismos genéticos de *POR* y el metabolismo de los fármacos catalizados por CYP se ha convertido en un punto crítico de investigación (Shu *et al*, 2015)
- c. La glucoproteína P, es codificada por el gen *ABCB1*, actúa como bomba desde el citoplasma al medio extracelular de numerosas sustancias, tanto endógenas como exógenas, entre ellas la CsA (Choi *et al*, 2005). Variantes en este gen tuvieron

efectos en el ajuste de la dosis para alcanzar las concentraciones terapéuticas (Turolo *et al*, 2010; Herrero *et al*, 2010).

- d. Otro gen relacionado con la farmacocinética de la CsA es *PPIA* que codifica una proteína citosólica la CpN. La CsA como hemos visto, ejerce su efecto inmunosupresor gracias a la acción del complejo CsA-CpN. Esta proteína es la predominante, sino la única, mediadora de efecto inmunosupresor (Colgan *et al*, 2005). Variantes en este gen podrían modificar su expresión, o su afinidad por la CsA, viéndose afectada su farmacodinámica y en consecuencia su efecto inmunosupresor.

La aparición de nefrotoxicidad es la reacción adversa más importante en el tratamiento con CsA. Distintas variantes en los genes *XPC*, *GAN*, *PAX4*, *CYP2C9*, *MTRR* y *NOD2* han sido asociadas con el desarrollo de reacciones adversas producida por CsA:

- a. Los genes *XPC*, *GAN* y *PAX4* se han relacionado con alteraciones en la respuesta de las células epiteliales tubulares a cambios mesenquimales inducidos por ICN y formación de fibroblastos.
- b. Las células endoteliales expresan las enzimas *CYP2C*, que metabolizan al ácido araquidónico para producir múltiples ácidos epoxieicosatrienoicos (EET). Los EET funcionan principalmente en los sistemas renal y cardiovascular, y regulan la función renal, pulmonar y cardíaca, y el tono vascular. Variantes en *CYP2C9* que conducen a la pérdida de EET aumentan la vasoconstricción de las arteriolas glomerulares y disminuyen la tasa de filtración glomerular.
- c. El gen *MTRR* regula la concentración plasmática de homocisteína; variantes en este gen pueden alterar la regulación de la vía de biosíntesis homocisteína-metionina, reduciendo el daño de proteínas, la muerte celular y la activación inmunitaria. (Jacobson, 2012).
- d. Variantes en el gen *NOD2* parecen estar también relacionadas por su implicación en el desarrollo de reacciones adversas (Sánchez-Lázaro *et al*, 2015). Este gen que codifica un receptor intracelular que participa en la defensa inmune innata, y es expresado en macrófagos. Su ligando principal es el dipéptido muramilo, el motivo mínimo de todos los peptidoglicanos, siendo estos potentes inductores de la secreción de citoquinas tanto en monocitos como en células dendríticas. Se han asociado SNPs en *NOD2* a un aumento significativo en la mortalidad relacionada con el trasplante (Krüger *et al*, 2007).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

Las variantes en los genes implicados en la farmacocinética y la farmacodinámica de la CsA, *PPIA*, *NOD2*, *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR*, juegan un papel en la respuesta interindividual al tratamiento inmunosupresor con CsA en pacientes con TC y en la aparición de RMA.

### 2.2 Objetivos

Los objetivos propuestos son los siguientes:

1. Identificar variantes en genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica de la CsA, *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR*, *NOD2*, *PPIA*, *XPC*, *GAN*, *PAX4*, *CYP2C9*, *MTRR*, en pacientes a los que se les ha practicado un TC que presentaron o no RMA.
2. Realizar análisis de asociación entre las variantes identificadas en los genes en estudio y el RMA.
3. Analizar la literatura existente sobre las variantes halladas en el análisis.

Objetivos secundarios:

4. Identificar variantes en genes implicados en la farmacocinética y farmacodinámica de la CsA, *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR*, *NOD2*, *PPIA*, *XPC*, *GAN*, *PAX4*, *CYP2C9*, *MTRR*, en pacientes con TC que presentaron o no nefrotoxicidad.
5. Realizar análisis de asociación entre las variantes identificadas en los genes en estudio y la aparición de nefrotoxicidad.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Población de estudio

En el estudio se han analizado los datos genéticos de las muestras de 29 pacientes, pertenecientes a la “Colección de muestras para la investigación de insuficiencia cardiaca avanzada y trasplante cardiaco” del 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. A los 29 pacientes se les ha practicado un TC y todos fueron

tratados con CsA tras el mismo, siendo este el criterio de inclusión en el estudio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para la utilización de muestras biológicas en el estudio.

Los 29 pacientes se establecieron en dos grupos de estudio:

- grupo “Control”, compuesto por 16 pacientes que no presentaron RMA tras el TC.
- grupo “RMA”, compuesto por los 13 pacientes restantes, que presentaban RMA tras el TC.

Complementariamente, los 29 pacientes fueron establecidos en otros dos grupos:

- grupo “Control”, compuesto por 23 pacientes que no presentaron nefrotoxicidad tras el TC.
- grupo “NEFTX”, compuesto por los 6 pacientes restantes, que presentaban nefrotoxicidad tras el TC.

### **3.2 Análisis bioinformático de los datos obtenidos por NGS**

El grupo de investigación de Cardiología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) realizó la secuenciación de un exoma clínico, que incluyen los 11 genes seleccionados, mediante *Next Generation Sequencing* (NGS). Para ello, el grupo de investigación de Cardiología empleó la tecnología de Illumina (San Diego-USA) para la ampliación del exoma clínico, y el kit TruSight™ One Sequencing Panel Library Preparation para la preparación de las librerías (Illumina Inc., 2017).

Entre los genes secuenciados, se seleccionaron los siguientes para este TFM:

- por su implicación en la farmacodinámica de la CsA: *PPIA*
- por su implicación en la farmacocinética de la CsA: *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR*,
- por su posible implicación en el desarrollo de reacciones adversas: *NOD2*, *XPC*, *MTRR*, *GAN*, *CYP2C9* y *PAX4*.

De esto genes varios presentaban varias isoformas, siendo seleccionada la que presentaba un mayor número de nucleótidos. Sin embargo, en los genes *ABCB1* y *CYP3A5* se han examinado más de una isoforma, dado que no todos los exones eran expresados en la isoforma seleccionada (Tabla 2). En el caso del gen *ABCB1* hemos examinado la isoforma NM\_001348945, además de analizar el exón 3 de la isoforma NM\_000927 que no se

expresaba en la anterior. Por otro lado en el gen *CYP3A5* examinamos la isoforma NM\_000777, los exones 13 y 14 de la isoforma NM\_001291830 y la isoforma NM\_001190484 que daba lugar a un transcrito distinto.

**Tabla 2:** Genes seleccionadas para el análisis.

Gen	Posición	Hebra	Código Pubmed isoforma	Código ensembl Transcrito ID
ABCB1*	chr7:87,131,179-87,344,639	N	NM_001348945	ENST00000265724.7
	chr7:87,131,179-87,344,639	N	NM_000927	ENST00000265724.7
CYP3A4	chr7:99,352,583-99,383,811	N	NM_017460	ENST00000336411.6
CYP3A5	chr7:99,243,812-99,279,649	N	NM_000777	ENST00000222982.8
	chr7:99,243,812-99,279,649	N	NM_001291830	ENST00000222982.8
	chr7:99,243,812-99,279,649	N	NM_001190484	ENST00000439761.2
NOD2	chr16:50,729,050-50,768,988	P	NM_022162	ENST00000300589.6
PPIA	chr7:44,834,378-44,844,865	P	NM_021130	ENST00000468812.5
POR	chr7:75,542,420-75,618,173	P	NM_000941	ENST00000461988.5
XPC	chr3:14,184,648-14,222,172	N	NM_004628	ENST00000285021.11
GAN	chr16:81,346,571-81,415,803	P	NM_022041	ENST00000248272
MTRR	chr5:7,867,217-7,903,235	P	NM_024010	ENST00000264668.6
CYP2C9	chr10:96,696,415-96,751,148	P	NM_022041	ENST00000260682.7
PAX4	chr7:127,248,346-127,257,780	N	NM_006193	ENST00000341640.6

\*Genes en los que hemos examinado más de una isoforma; N: Negativa. P: positiva. ID: Identificación.

### 3.2.1 Profundidad de lectura de los genes analizados

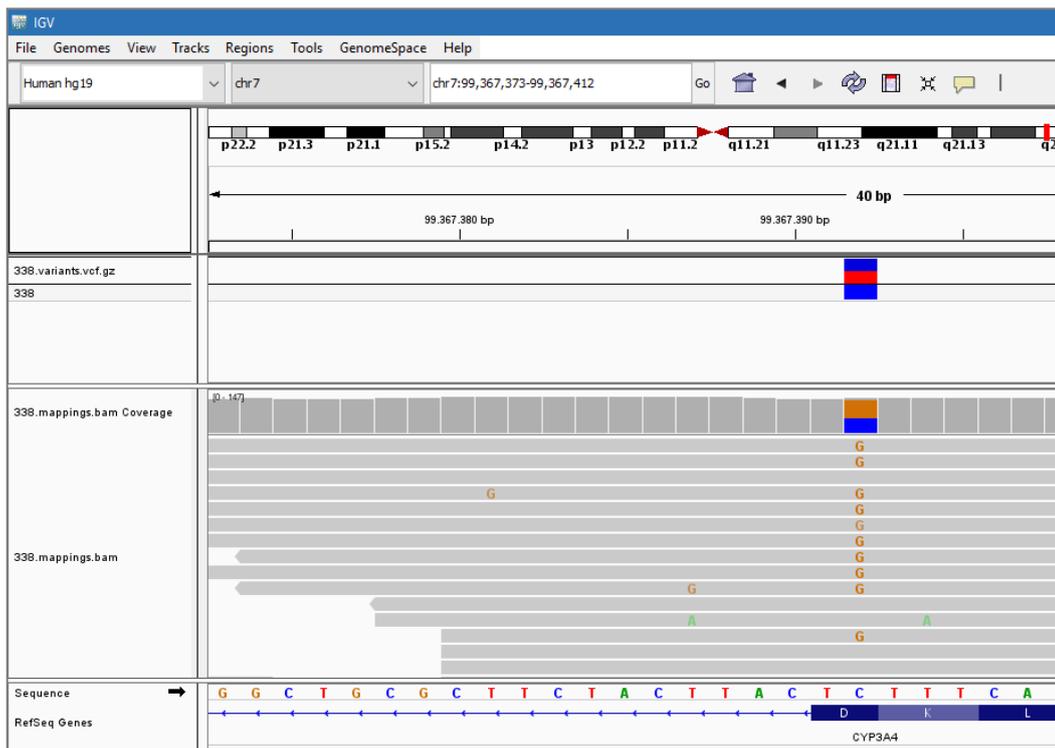
El método ideal de secuenciación podría leer los nucleótidos de un extremo al otro de un cromosoma sin cometer errores y en una sola lectura. En la actualidad eso no es posible, las longitudes de lectura son cortas y pueden contener errores. Por lo tanto, realizando una única lectura, sería imposible distinguir un error en la secuenciación de una variante en la secuencia. Para subsanar este problema se incrementa el número de lecturas, al número de veces que ha sido secuenciada una base se le denomina profundidad o *coverage* (Sims *et al*, 2014).

Para examinar la profundidad de lectura de los genes analizados realizamos la media de la profundidad de lectura de los exones codificantes de los 11 genes de los pacientes incluidos en el análisis. A partir de esta media calculamos la desviación estándar de la media (STD) y el error estándar de la media (ESM). La STD refleja la dispersión de los datos; mientras que el ESM indica la incertidumbre en torno a la estimación del valor de la media (Altman, 2005).

### 3.2.2 Visualización de las secuencias

La NGS genera grandes cantidades de datos genómicos. El análisis de los mismos puede ser automatizado en gran parte, sin embargo, la revisión manual para la confirmación e interpretación de las variantes es esencial. *Integrative Genome Viewer* (IGV) es un programa que se emplea para la exploración visual de datos genómicos y nos va a permitir visualizar nuestras secuencias. Para ello es preciso cargar dos archivos generados en la NGS: BAM (*Binary Alignment/Map format*) y VCF (*Variant Call Format*) de cada uno de los pacientes secuenciados en el software. Del alineamiento de las secuencias se origina el archivo.bam; las variaciones entre la secuencia de referencia y la analizada se almacenan en un archivo .vcf (Thorvaldsdóttir *et al*, 2013).

La visualización de la secuencia en IGV nos permite ver las variantes y conocer datos sobre ellas: profundidad de lectura, posición, *reference SNP*, entre otros (Figura 7).



**Figura 7:** Visualización de los ficheros .bam y .vcf en IGV.

### 3.2.3 Identificación de variantes

En este TFM hemos analizado las variantes que se encuentran en las regiones exónicas de los genes seleccionados, además de diez bases *upstream* y *downstream* de las regiones intrónicas adyacentes.

Para que una variante detectada por NGS sea considerada como tal, debe cumplir una serie de criterios:

- Presentar una calidad de al menos un valor de 250.
- En el caso de que no se cumpla el criterio anterior:
  - La profundidad de lectura o *coverage* de la posición de la variante  $\geq 15$
  - Estar presente al menos en el 40% de las lecturas existentes en esa posición, si se encuentra en heterocigosis.

Para poder considerar una variante encontrada como rara, además de los criterios expuestos anteriormente, debe cumplir que:

- La variante no debe estar recogida en las principales bases de datos de variantes, Pubmed, dbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism Database*), y ExAc (*Exome Aggregation Consortium*).
- La variante debe presentar una frecuencia en las principales bases de datos menor de un 1%.

## 3.3 Estudio de asociación de variantes

### 3.3.1 Recogida de datos

Los polimorfismos observados fueron recogidos en una base de datos en formato Excell, donde se reunió la siguiente información (Figura 8):

- el número de identificación de la muestra,
- el grupo al que pertenece (RMA o Control)/ (NEFTX o Control),
- el rs que identifica al polimorfismo,
- el genotipo identificado en cada muestra, indicando la presencia de la variante, el alelo de referencia o Not Avaliable (NA) si no es posible confirmar ninguno de los dos.

		PPIA	ABCB1	ABCB1	ABCB1	ABCB1	ABCB1
Muestra	Grupo	rs6850	rs2214102	rs9282564	rs2032582	rs1045642	rs35068177
328	RMA	A/A	C/C	T/C	A/A	A/A	T/T
338	RMA	A/G	T/C	T/T	C/C	A/G	T/T
350	RMA	NA	C/C	T/T	C/T	A/G	T/T
394	RMA	A/A	C/C	T/T	C/A	G/G	T/T
414	RMA	A/A	C/C	T/C	C/A	A/G	T/T

**Figura 8:** Base de datos de polimorfismos hallados.

### 3.3.2 Asociación de variantes con RMA en el TC

#### 3.3.2.1 Asociación de polimorfismos presentes en pacientes con TC que presentan o no RMA

Para realizar el análisis de asociación de los polimorfismos entre los grupos se utilizó la herramienta web *SNPstats* (Solé *et al*, 2006). El análisis de asociación se llevó a cabo considerando cinco modelos de herencia: codominante, dominante, sobredominante, recesivo y el log-aditivo.

Una vez obtenidos los resultados, en aquellos casos donde se encontró asociación entre un SNP y la variante (un p-valor menor o igual a 0.05), se repitió el análisis empleando el programa estadístico R (R Core Team, 2018). Para ello, debemos utilizar el paquete “*SNPassoc*”:

- En primer lugar, se crea una función con los datos para el análisis:
  - >“Nombre”<-read.table (“nombre del archivo con los datos.txt”, header=T)
- En segundo lugar se creó un objeto de clase *setupSNP.colSNPs* que especifica en que columnas se encuentra la información referida a los SNPs:
  - >myData<-setupSNP (data=“Nombre”, colSNPs=3:x, sep=“”), x representa la columna del último SNP a analizar.
- En tercer lugar, se realiza en análisis de asociación para cada uno de los SNPs:
  - >association (casco~snp10001, data=myData)
- Finalmente se obtiene una tabla de resultados análoga a la obtenida con *SNPstats*.

En los casos en los que se obtuvo resultados significativos, se realizó el test de significación de Fisher con el programa R. Para ello, se empleó el comando *fisher.test* :

- >Casco<-c (rep (“RMA”,13), rep (“Control”,16))
- >SNP<-c (rep (“genotipo 1”, nº de pacientes con genotipo de referencia en grupo RMA), (rep (“genotipo 2”, nº de pacientes con la variante en grupo RMA), (rep (“genotipo 3”, nº de pacientes con NA en grupo RMA), (rep

(“genotipo 1”, nº de pacientes con genotipo de referencia en grupo “Control”), (rep (“genotipo 2”, nº de pacientes con la variante en grupo Control), (rep (“genotipo 3”, nº de pacientes con NA en grupo Control),

- >.Table\_est<-table (Casco, SNP)
- >.Table\_est
- > Fisher.test (.Table\_est)

### **3.3.3 Asociación de variantes con NEFTX en el TC**

#### **3.3.3.1 Asociación de polimorfismos presentes en pacientes con TC que presentan o no NEFTX**

Para realizar el análisis de asociación entre los dos grupos se utilizó la herramienta *SNPstats*, al igual que en el caso anterior. Asimismo, en aquellos casos donde se encontró asociación, se repitió el análisis empleando el programa estadístico R. En los casos en los que se obtuvo resultados significativos, se realizó el test de significación de Fisher.

### **3.4 Análisis de variantes.**

#### **3.4.1 Búsqueda bibliográfica.**

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las diferentes bases de datos sobre las variantes y mutaciones encontradas. Para la búsqueda de información más detallada se han utilizado diferentes bases de datos donde se encuentra información genética de variaciones: *ExAc*, *Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)* y *Varsome*.

En cuanto a las mutaciones, las bases de datos utilizadas para buscar información sobre los efectos de las mismas han sido *Pubmed* y *Human Gene Mutation Database (HGMD)*, utilizando para la búsqueda la posición de la variante y el cambio aminoacídico.

#### **3.4.2 Predicciones bioinformáticas.**

Para poder predecir los efectos de las mutaciones encontradas se han utilizado diferentes herramientas de análisis *in silico* que predicen el posible impacto de un cambio de aminoácido en la proteína tanto estructural como funcionalmente:

- *Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT)*,
- *Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhD-SNP)*,
- *Mutation Taster*,

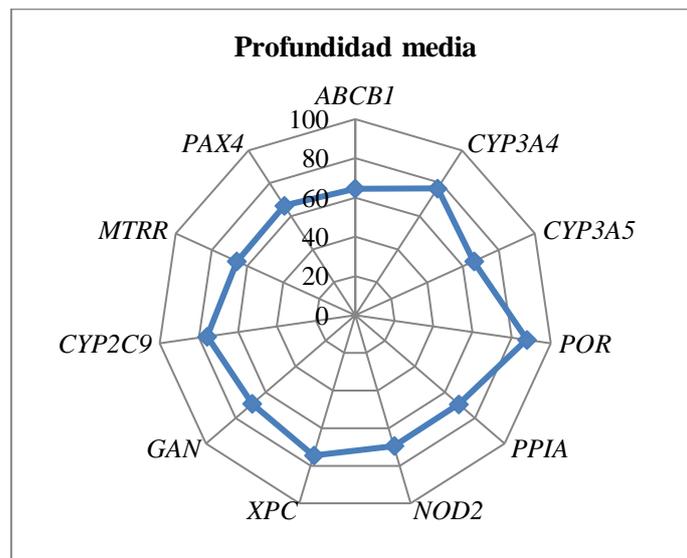
- *The 2nd Sprint National Anaesthesia Project (SNAP2)*,
- *Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2)*,
- *Open Reading Frame Finder (ORF)*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Profundidad de lectura de los genes analizados

El primer análisis que hemos realizado tras la secuenciación consiste en comprobar la profundidad de lectura de los genes que hemos seleccionado. De este modo, evaluamos si poseen un número de lecturas adecuado para continuar con el análisis.

Los 11 genes seleccionados presentaban una profundidad de lecturas media de  $71,44 \pm 2,06$ , es decir, cada nucleótido presentaba de media 71x lecturas (Figura 9).



**Figura 9:** Profundidad media de los genes analizados.

### 4.2 Análisis del gen *ABCB1*

#### 4.2.1 Variantes encontradas en el gen *ABCB1*

Tras el análisis de los 27 exones de la isoforma NM\_000927/ENST00000265724.7 y del exón 3 de la isoforma NM\_001348945/ENST00000265724.7; se han identificado 9 polimorfismos (Tabla 3).

**Tabla 3:** SNPs encontrados en el gen *ABCBI*.

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs2214102	C	C/T	T	0.0248 (T)	(11HM/2HZ)/ (14HM/1HZ)	(6HM)/ (19HM/3HZ)	0,0862 (T)	5'UTR	-
rs9282564	T	T/C	C	0.0260 (C)	(3HZ)/-	-(3HZ)	0.0517 (C)	<i>missense</i>	p.Asn21Asp
rs2032582	C	C/A	A	0.3343 (A)	(4HM/6HZ)/ (8HM/7HZ)	(4HM/2HZ)/ (8HM/12HZ)	0.3448 (A)	<i>missense</i>	p.Ser893Ala
rs1045642	G	G/A	A	0.3952 (A)	(3HM/7HZ)/ (5HM/7HZ)	(1HM/5HZ)/ (7HM/9HZ)	0.4827 (A)	sinónima	c.3435T>C(p.=)
rs35068177	T	T/C	C	0.00022 (C)	-(1HZ)	-(1HZ)	0.0172 (C)	sinónima	c.1308A>G(p.=)
rs1128503	G	G/A	A	0.4161 (A)	(4HM/6HZ)/ (8HM/5HZ)	(3HM/2HZ)/ (9HM/9HZ)	0.3965 (A)	sinónima	c.1236T>C(p.=)
rs2229109	C	C/T	T	0.0126 (T)	(1HZ)/(1HZ)	(1HZ)/(1HZ)	0.0344 (T)	<i>missense</i>	p.Ser400Asn
rs36008564	T	T/C	C	0.0062(C)	(1HZ)/-	(1HZ)/-	0.0172 (C)	<i>missense</i>	p.Ile261Val
rs2235022	T	T/C	C	0.0024 (C)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (C)	sinónima	c.729A>G(p.=)

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 9 variantes encontradas:

- el 44,44% (n=4) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs1045642, rs35068177, rs1128503, rs2235022),
- el 44,44% (n=4) corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs9282564, rs2032582, rs2229109, rs36008564),
- el 11,11% (n=1) de las variantes están presentes en la región 5'-UTR, región no traducida situada antes del codón de inicio (rs2214102).

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

#### 4.2.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *ABCBI*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *ABCBI*:

- se encontró asociación entre el polimorfismo rs9282564 y el RMA.
- se encontró asociación entre el polimorfismo rs1045642 y NEFTX.

Se procedió entonces a realizar un segundo análisis con el paquete “*SNPassoc*” de R para estos dos SNPs. Tras el análisis, la asociación del SNP rs9282564 se pierde la asociación. Por el contrario, la asociación del SNP rs1045642 la mantiene. Sin embargo, tras realizar el test de Fisher no se obtiene un resultado significativo para esta variante.

### 4.3 Análisis del gen *CYP3A4*

#### 4.3.1 Variantes encontradas en el gen *CYP3A4*

Tras el análisis de los 13 exones de la isoforma NM\_017460/ENST00000336411.6; se han identificado 2 polimorfismos (Tabla 4).

**Tabla 4:** SNPs encontrados en el gen *CYP3A4*.

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs4986907	C	C/T	T	0.0052 (T)	-(1HZ)	-(1HZ)	0.0172 (T)	missense	p.Arg162Gln
rs4986908	C	C/G	G	0.0018 (G)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (G)	missense	p.Asp174His

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 2 variantes encontradas:

- el 100% (n=2) corresponden a variantes missense, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs4986907, rs4986908).

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

#### 4.3.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *CYP3A4*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *CYP3A4*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de ninguna de las variantes y los grupos de pacientes en los cuales se encuentran, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

### 4.4 Análisis del gen *CYP3A5*

#### 4.4.1 Variantes encontradas en el gen *CYP3A5*

Tras el análisis de los 13 exones de la isoforma NM\_000777/ENST00000222982.8, el exón 14 de la isoforma NM\_001291830/ ENST00000222982.8 y el exón 5 de la isoforma NM\_001190484/ ENST00000439761.2; se han identificado 2 polimorfismos (Tabla 5).

**Tabla 5:** SNPs encontrados en el gen *CYP3A5*

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs28365069	A	A/G	G	0.0102 (G)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (G)	intrónica	-
rs6977165	T	T/C	C	0.0649 (C)	-(1HZ)	-(1HZ)	0.0172 (C)	Stop	p.Ter141Trp extTer12

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 2 variantes encontradas:

- el 50% (n=1) es una variante situada en la región intrónica, podría afectar al *splicing* (rs28365069),
- el 50% (n=1) es una variante que genera un codón de terminación (rs6977165).

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

#### 4.4.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *CYP3A5*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *CYP3A5*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de ninguna de las variantes y los grupos de pacientes en los cuales se encuentran, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

#### 4.5 Análisis del gen *NOD2*

##### 4.5.1 Variantes encontradas en el gen *NOD2*

Tras el análisis de los 12 exones de la isoforma NM\_022162 /ENST00000300589.6; se han identificado 9 polimorfismos (Tabla 6).

**Tabla 6:** SNPs encontrados en el gen *NOD2*.

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs2067085	C	G/G	G	0.2466 (G)	(1HM)/(2HM/3HZ)	(1HM)/(2HM/3HZ)	0.1551 (G)	sinónima	c.534C>G(p.=)
rs2066842	C	C/T	T	0.1020 (T)	(1HM/6HZ)/(9HZ)	(3HZ)/(1HM/12HZ)	0.2931 (T)	missense	p.Pro268Ser
rs1861759	T	T/G	G	0.2161 (G)	(1HM/8HZ)/(2HM/10HZ)	(1HM/3HZ)/(2HM/15HZ)	0.4137 (G)	sinónima	c.1761T>G(p.=)
rs2066843	C	C/T	T	0.1076 (T)	(1HM/5HZ)/(9HZ)	(3HZ)/(1HM/11HZ)	0.2758 (T)	sinónima	c.1377C>T(p.=)
rs5743291	G	G/A	A	0.0333 (A)	(2HZ)/(4HZ)	(1HZ)/(5HZ)	0.1034 (A)	missense	p.Val955Ile
rs2066844	C	C/T	T	0.0144 (T)	(1HZ)/(2HZ)	(1HZ)/(2HZ)	0.0517 (T)	missense	p.Arg702Trp
rs5743271	A	A/G	G	0.0040 (G)	-(1HZ)	-(1HZ)	0.0172 (G)	missense	p.Asn289Ser
rs104895457	G	G/A	A	0.00004 (A)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0127 (A)	missense	p.Gly978Glu
rs2066845	G	G/C	C	0.0046 (C)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (C)	missense	p.Gly908Arg

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 9 variantes encontradas:

- el 33,33% (n=3) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs2067085, rs1861759, rs2066843),
- el 66,66% (n=6) corresponden a variantes missense, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs2066842, rs5743291, rs2066844, rs5743271, rs104895457, rs2066845).

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

#### 4.5.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *NOD2*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *NOD2*:

- se encontró asociación entre el polimorfismo rs2067085 y el RMA.

Se procedió entonces a realizar un segundo análisis con el paquete “*SNPassoc*” de R para este SNP. Tras el análisis, la asociación del SNP rs2067085 se mantiene. Sin embargo, tras realizar el test de Fisher no se obtiene un resultado significativo para esta variante.

#### 4.6 Análisis del gen *PPIA*

##### 4.6.1 Variantes encontradas en el gen *PPIA*

Tras el análisis de los 5 exones de la isoforma NM\_021130 /ENST00000468812.5; se ha identificado 1 polimorfismo (Tabla 7).

**Tabla 7:** SNPs encontrados en el gen *PPIA*

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS _prot
rs6850	A	A/G	G	0.2545 (G)	(2HZ)/(3HZ)	(2HZ)/(3HZ)	0.0862 (G)	5'UTR	-

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM:homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, la variante encontrada:

- es una variante en la región 5' UTR, región no traducida situada antes del codón de inicio (rs6850).

La MAF observada de la variante es similar a la descrita en las bases de datos.

#### 4.6.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *PPIA*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de la variante encontrada en el gen *PPIA*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de esta variante y los grupos de pacientes en los cuales se encuentra, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

#### 4.7 Análisis del gen *POR*

##### 4.7.1 Variantes encontradas en el gen *POR*

Tras el análisis de los 15 exones de la isoforma NM\_000941/ENST00000461988.5; se han identificado 7 polimorfismos (Tabla 8).

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

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs2228104	C	C/T	T	0.1647 (T)	(13HM)/(15HM)	(6HM)/(22HM)	0.0344 (T)	sinónima	c.1455T>C(p.=)
rs1057868	C	C/T	T	0.2861 (T)	(2HM/7HZ)/(8HZ)	(2HZ)/2HM/13HZ)	0.3275 (T)	<i>missense</i>	p.Ala503Val
rs1057870	G	G/A	A	0.1953 (A)	(1HM/4HZ)/(11HZ)	(2HZ)/(1HM/13HZ)	0.2931 (A)	sinónima	c.1716G>A(p.=)
rs1135612	A	A/G	G	0.2494 (G)	(3HM/4HZ)/(8HZ)	(1HM/4HZ)/(2HM/8HZ)	0.3103 (G)	sinónima	c.387A>G(p.=)
rs10262966	A	A/G	G	0.1046 (G)	(2HZ)/(2HZ)	-(4HZ)	0.0689 (G)	sinónima	c.15A>G(p.=)
rs374967948	C	C/T	T	0.0002 (T)	-(1HZ)	-(1HZ)	0.0172 (T)	<i>missense</i>	p.Ala172Val
rs145782750	G	G/A	A	0.0024 (A)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (A)	<i>missense</i>	p.Val631Ile

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 7 variantes encontradas:

- el 57,15% (n=4) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs2228104, rs1057870, rs1135612, rs10262966),
- el 42,85% (n=3) corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs1057868, rs374967948, rs145782750).

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

##### 4.7.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *POR*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *POR*:

- se encontró asociación entre los polimorfismos rs1057870, rs1135612, y el RMA.

Se procedió entonces a realizar un segundo análisis con el paquete “*SNPassoc*” de R para estos dos SNPs. Tras el análisis, la asociación del SNP rs1135612 se pierde. Por el contrario, la asociación del SNP rs1057870 se mantiene. Sin embargo, tras realizar el test de Fisher no se obtiene un resultado significativo para esta variante.

## 4.8 Análisis del gen *XPC*

### 4.8.1 Variantes encontradas en el gen *XPC*

Tras el análisis de los 16 exones de la isoforma NM\_004628/ENST00000285021.11; se han identificado 14 polimorfismos (Tabla 9).

**Tabla 9:** SNPs encontrados en el gen *XPC*

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs2607775	C	C/G	G	0.4169 (G)	(7HM/3HZ)/ (5HM/10HZ)	(2HM/4HZ)/ (10HM/9HZ)	0.6379 (G)	5'UTR	-
rs2958057	T	T/A	A	0.0000 (A)	-(1HM)	-(1HM)	0.0172 (A)	sinónima	c.1881T>A(p.=)
rs2227998	C	C/T	T	0.2354 (T)	(4HZ)/ (2HM/4HZ)	(1HM/1HZ)/ (1HM/7HZ)	0.2068 (T)	sinónima	c.2061G>A(p.=)
rs2279017	G	G/T	T	0.3203 (T)	(2HM/3HZ)/ (2HM/9HZ)	(4HZ)/ (4HM/8HZ)	0.3448 (T)	intrónica	-
rs2228001	T	T/G	G	0.3153 (G)	(2HM/2HZ)/ (2HM/8HZ)	(3HZ)/ (4HM/7HZ)	0.3103 (G)	missense	p.Gln939Lys
rs1126547	G	G/C	C	0.0793 (C)	(9HM/3HZ)/ (14HM/1HZ)	(5HM/1HZ)/ (18HM/3HZ)	0.1379 (C)	3'UTR	-
rs2470458	T	T/C	C	0.1078 (C)	(4HM/5HZ)/ (1HM/7HZ)	(1HM/2HZ)/ (4HM/10HZ)	0.3793 (C)	3'UTR	-
rs67353494	A	A/T	T	0.1082 (T)	(3HM/5HZ)/ (1HM/7HZ)	(2HZ)/ (4HM/10HZ)	0.3448 (T)	3'UTR	-
rs2229090	G	G/C	C	0.2550 (C)	(3HM/1HZ)/ (1HM/4HZ)	(2HZ)/ (4HM/3HZ)	0.2241 (C)	3'UTR	-
rs2228000	G	G/A	A	0.2330 (A)	(3HM/5HZ)/ (1HM/7HZ)	(2HZ)/ (4HM/10HZ)	0.03448 (A)	missense	p.Ala499Val
rs182616621	C	C/A	A	0.0022 (A)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (A)	missense	p.Lys481Asn
rs2227999	C	C/T	T	0.0232 (T)	(2HM/3HZ)/ (2HZ)	(1HZ)/ (2HM/4HZ)	0.1551 (T)	missense	p.Arg492His
rs756352923	G	G/A	A	0.00002 (A)	-(1HZ)	(1HZ)/-	0.0172 (A)	5'UTR	-
rs533121927	C	C/T	T	0.00012 (T)	-(1HZ)	-(1HZ)	0.0172 (T)	missense	p.Arg378Lys

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 14 variantes encontradas:

- el 14,29% (n=2) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs2958057, rs2227998),

- el 35,7 % (n=5) corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs2228001, rs2228000, rs182616621, rs2227999, rs533121927),
- el 7,15% (n=1) son variantes intrónicas, podría afectar al *splicing* ( rs2279017),
- el 28,57% (n=4) corresponden a variantes en la región 3´ UTR, región no traducida situada después del codón de *stop* ( rs1126547, rs2470458, rs67353494, rs2229090),
- el 14,29% (n=2) corresponden a variantes en la región 5´ UTR, región no traducida situada antes del codón de inicio (rs2607775, rs756352923).

Las MAF observadas de las variantes en algunos casos difirieren de las descritas en las bases de datos.

#### 4.8.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *XPC*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *XPC*:

- se encontró asociación entre los polimorfismos rs2228001, rs2607775, y el RMA.

Se procedió entonces a realizar un segundo análisis con el paquete “*SNPassoc*” de R para estos dos SNPs. Tras el análisis, la asociación los SNPs rs2228001 y rs2607775 se mantiene. Sin embargo, tras realizar el test de Fisher no se obtiene un resultado significativo para ambas variantes.

#### 4.9 Análisis del gen *GAN*

##### 4.9.1 Variantes encontradas en el gen *GAN*

Tras el análisis de los 11 exones de la isoforma; se han identificado 1 polimorfismo (Tabla 10).

**Tabla 10:** SNPs encontrados en el gen *GAN*.

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs2608555	C	C/T	T	0.1512 (T)	(1HM/5HZ)/ (1HM/9HZ)	(1HM/3HZ)/ (1HM/11HZ)	0.3103 (T)	sinónima	c.1293C>T(p.=)

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, la variante encontrada:

- es una variante sinónima, que no produce cambios en la secuencia de aminoácidos (rs2608555).

La MAF observada de la variante es el doble a la descrita en las bases de datos.

#### 4.9.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *GAN*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variante encontrada en el gen *GAN*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de la variante y los grupos de pacientes en los cuales se encuentra, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

#### 4.10 Análisis del gen *CYP2C9*

##### 4.10.1 Variantes encontradas en el gen *CYP2C9*

Tras el análisis de los 9 exones de la isoforma NM\_022041/ENST00000260682.7; se han identificado 3 polimorfismos (Tabla 11).

**Tabla 11:** SNPs encontrados en el gen *CYP2C9*.

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs1799853	C	C/T	T	0.0479 (T)	(4HZ)/ (1HM/2HZ)	(2HZ)/ (1HM/4HZ)	0.1379 (T)	<i>missense</i>	p.Arg144Cys
rs1057910	A	A/C	C	0.0485 (C)	(2HZ)/(2HZ)	-(/4HZ)	0.0689 (C)	<i>missense</i>	p.Ile359Leu
rs1057911	A	A/T	T	0.0489 (T)	(2HZ)/(2HZ)	-(/4HZ)	0.0689 (T)	sinónima	c.1425A>T(p.=)

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 3 variantes encontradas:

- el 33,33 % (n=1) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs1057911),
- el 66,66 % (n=2) corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs1799853, rs1057910).

La MAF observada en la primera variante difiere de la descrita en las bases de datos.

##### 4.10.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *CYP2C9*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *CYP2C9*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de

ninguna de las variantes y los grupos de pacientes en los cuales se encuentran, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

#### 4.11 Análisis del gen *MTRR*

##### 4.11.1 Variantes encontradas en el gen *MTRR*

Tras el análisis de los 15 exones de la isoforma NM\_024010/ENST00000264668.6; se han identificado 14 polimorfismos (Tabla 12).

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

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs1532268	C	C/T	T	0.2700 (T)	(3HM/3HZ)/ (3HM/8HZ)	(4HZ)/ (6HM/7HZ)	0.3965 (T)	<i>missense</i>	p.Ser202Leu
rs2303080	T	T/A	A	0.0391 (A)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (A)	<i>missense</i>	p.Ser284Thr
rs2287780	C	C/T	T	0.0679 (T)	(1HZ)/(1HZ)	-(2HZ)	0.0344 (T)	<i>missense</i>	p.Arg442Cys
rs16879334	C	C/G	G	0.0645 (G)	(1HZ)/(1HZ)	-(2HZ)	0.0344 (G)	<i>missense</i>	p.Pro477Arg
rs1802059	G	G/A	A	0.2664 (A)	(2HM/3HZ)/ (3HM/8HZ)	(4HZ)/ (5HM/7HZ)	0.3620 (A)	sinónima	c.1992G>A(p.=)
rs161870	T	T/C	C	0.2530 (C)	(3HZ)/(4HZ)	(2HZ)/(5HZ)	0.1206 (C)	sinónima	c.618T>C(p.=)
rs162036	A	A/G	G	0.2532 (G)	(3HZ)/(4HZ)	(2HZ)/(5HZ)	0.1206 (G)	<i>missense</i>	p.Lys377Arg
rs10380	C	C/T	T	0.2194 (T)	(3HZ)/(3HZ)	(2HZ)/(4HZ)	0.1034 (T)	<i>missense</i>	p.His622Tyr
rs12347	G	G/A	A	0.2438 (A)	(3HZ)/(4HZ)	(2HZ)/(5HZ)	0.1206 (A)	sinónima	c.1956G>A(p.=)
rs2287779	G	G/A	A	0.0681 (A)	(1HZ)/(1HZ)	-(2HZ)	0.0344 (A)	sinónima	c.1236G>A(p.=)
rs35890938	A	A/G	G	0.0080 (G)	(1HM)/(3HZ)	(2HZ)/ (1HM/1HZ)	0.0862 (G)	sinónima	c.1545A>G(p.=)
rs34172797	C	C/T	T	0.0090 (T)	(1HM)/(1HZ)	-(1HM/1HZ)	0.0344 (T)	sinónima	c.1617C>T(p.=)
rs6874544	T	T/C	C	0.0080 (C)	(1HM)/(3HZ)	(2HZ)/ (1HM/1HZ)	0.0862 (C)	sinónima	c.1842T>C(p.=)
rs1801394	A	A/G	G	0.4677(G)	(5HM/5HZ)/ (6HM/6HZ)	(3HM/2HZ)/ (8HM/9HZ)	0.5689 (G)	<i>missense</i>	p.Ile49Met

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 14 variantes encontradas:

- el 50% (n=7) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs1802059, rs161870, rs12347, rs2287779, rs35890938, rs34172797, rs6874544),
- el 50% (n=7) corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs1532268, rs2303080, rs2287780, rs16879334, rs162036, rs10380, rs1801394),

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

#### 4.11.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *MTRR*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *MTRR*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de ninguna de las variantes y los grupos de pacientes en los cuales se encuentran, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

#### 4.12 Análisis del gen *PAX4*

##### 4.12.1 Variantes encontradas en el gen *PAX4*

Tras el análisis de los 9 exones de la isoforma NM\_006193/ENST00000341640.6; se han identificado 4 polimorfismos (Tabla 13).

**Tabla 13:** SNPs encontrados en el gen *PAX4*.

dbSNP	Ref	GT	Alelo	MAF Bases de datos	RMA/Control	NEFTX/Control	MAF Observado	Efecto	HGVS_prot
rs712701	G	G/T	T	0.3295 (T)	(10HM/2HZ)/ (9HM/6HZ)	(4HM/2HZ)/ (15HM/6HZ)	0.2068 (T)	<i>missense</i>	p.His321Pro
rs77039439	G	G/A	A	0.0451 (A)	(2HZ)/(3HZ)	-(5HZ)	0.0862 (A)	sinónima	c.450C>T(p.=)
rs942218701	G	G/A	A	0.00002 (A)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (A)	sinónima	c.489C>T(p.=)
rs2233578	G	G/A	A	0.0256 (A)	(1HZ)/-	-(1HZ)	0.0172 (A)	<i>missense</i>	p.Arg133Trp

\*Chr: cromosoma. Ref.: alelo de referencia. GT.: Genotipo. MAF: frecuencia del alelo minoritario. HM: homocigosis. HZ: heterocigosis.

Tal y como podemos observar en la tabla, del total de las 4 variantes encontradas:

- el 50% (n=2) son variantes sinónimas, que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos (rs77039439, rs942218701),
- el 50% (n=2) corresponden a variantes *missense*, es decir, variantes que producen un cambio de aminoácido (rs712701, rs2233578),

Las MAF observadas de las variantes son similares a las descritas en las bases de datos.

##### 4.12.2 Análisis de asociación de las variantes en el gen *PAX4*

Tras el análisis estadístico con el programa *SNPStats* de las variantes encontradas en el gen *PAX4*, los resultados indican que no hay asociación entre la presencia de ninguna de las variantes y los grupos de pacientes en los cuales se encuentran, grupo “RMA”/ “NEFTX” o grupo “Control”.

#### 4.13 Mutaciones encontradas en los genes estudiados

Con los criterios expuestos en “Material y Métodos”, se encontró una mutación en heterocigosis en 1 de los 29 pacientes analizados perteneciente al grupo Control. Dicha mutación se visualizó en el gen *CYP3A5* y supone un cambio en el aminoácido 117 de la proteína, de Glutamina a un codón de terminación (Tabla 14) (Figura 11).

**Tabla 14:** Características de la mutación encontrada en el gen *CYP3A5*.

Gen	Mutación	Efecto	HGVS-cDNA	Codón	Exón
CYP3A5	p.Gln117Ter	Stop	c.349C>T	Cag/Tag	5



**Figura 11:** Representación esquemática del gen *CYP3A5*.

Tras la detección de esta mutación se llevaron a cabo estudios in silico con el fin de predecir el efecto potencial de esta variante. Para ello se emplearon diferentes herramientas bioinformáticas: *Mutation Taster*, *SIFT*, *PhD-SNP*, *SNAP2* y *Polyphen-2*. Los resultados muestran que esta mutación podría tener un posible efecto funcional en la proteína como predicen dos de las herramientas empleadas. En el caso de *PhD-SNP*, *SNAP2* y *Polyphen-2* no nos permiten hacer la predicción al existir un codón de terminación y no un cambio aminoacídico (Tabla 15).

**Tabla 15:** Análisis de la mutación mediante diferentes herramientas bioinformáticas.

Mutation Taster	SIFT	PhD-SNP	SNAP2	Polyphen-2
Causante de enfermedad	Dañina	No disponible	No disponible	No disponible

Para predecir cómo se trunca la proteína, se utilizó el software en línea *Open Reading Frame Finder (ORF)* del NCBI. Para ello, se usó la secuencia de codificación de consenso (CCDS) de la secuencia de referencia y de la secuencia con la variante. Podemos observar cómo se genera un codón de parada prematuro, originándose una proteína truncada (Figura 12).

226	GAAGGTCAACTCCCTGTGCTGGCCATCACAGATCCCACGTGATC E G Q L P V L A I T D P D V I	226	GAAGGTCAACTCCCTGTGCTGGCCATCACAGATCCCACGTGATC E G Q L P V L A I T D P D V I
271	AGAACAGTGTAGTGAAAGAATGTTATTCTGTCTTCACAAATCGA R T V L V K E C Y S V F T N R	271	AGAACAGTGTAGTGAAAGAATGTTATTCTGTCTTCACAAATCGA R T V L V K E C Y S V F T N R
316	AGGATTTGTGCAACGACCAGCACCATCAAGATGCAGACCCATTCC R I C A T T S T I K M Q T H S	316	AGGATTTGTGCAACGACCAGCACCATCAAGATGTAG R I C A T T S T I K M *
361	GTCACCATGTGGCTCCCTCCTGCTGTCTACAGTCACAACATGGA V T M W L P P A V L Q S Q H G		
406	GTTTGTCTTTTCTCTGA V C L F L *		

**Figura 12:** Predicción con el software *Open Reading Frame Finder (ORF)*. Secuencia de nucleótidos y su secuencia de aminoácidos correspondiente para la secuencia de referencia (izquierda) y para la secuencia con la mutación puntual c349C>T (derecha). Los números indican la posición del ADNc.

## 5. DISCUSIÓN

En este TFM se han analizado 11 genes que codifican para proteínas que participan en la farmacodinámica, la farmacocinética y el desarrollo de reacciones adversas de la CsA. Este análisis se llevó a cabo en muestras de 29 pacientes a los que se les había practicado un TC y estaban siendo tratados con CsA, de los cuales 13 desarrollaron RMA y 6 nefrotoxicidad. Tras el estudio se han encontrado 66 variantes: 9 variantes en el gen *ABCB1*, 2 variantes en el gen *CYP3A4*, 2 variantes en el gen *CYP3A5*, 9 variantes en el gen *NOD2*, 1 variante en el gen *PPIA*, 7 variantes en el gen *POR*, 14 variantes en el gen *XPC*, 1 variante en el gen *GAN*, 3 variantes en el gen *CYP2C9*, 14 variantes en el gen *MTRR* y 4 variantes en el gen *PAX4*. Además de las 66 variantes se ha identificado 1 mutación en el exón 5 del gen *CYP3A5*. Las MAF de las variantes incluidas en la cohorte de estudio difieren en ocasiones a las descritas en las bases de datos.

### 5.1. Variantes identificadas en los Genes seleccionados

En este trabajo hemos encontrado 66 variantes, en 6 de ellas hubo asociación significativa con RMA (rs9282564, rs2067085, rs2228002, rs1057870, rs2607775, rs1135612) y en 1 de ellas con la nefrotoxicidad (rs1045642) tras el análisis de asociación con el software *SNPstats*. Tras el análisis de estas variantes con el paquete *SNPassoc* de R, únicamente 5 de ellas conservaban esa asociación. Posteriormente, después de realizar el test de Fisher en R, ninguna de las variantes presentó significación con el RMA o el desarrollo de nefrotoxicidad.

Diversos estudios analizaron el posible efecto de las variantes implicadas en la farmacocinética y la farmacodinámica de la CsA. No se ha encontrado ningún estudio que relacione estas variantes con el RMA. Sin embargo, Sánchez-Lázaro *et al*, encontraron

asociación entre la variante rs2066844 en el gen *NOD2*, implicado en la activación de linfocitos, y el rechazo del aloinjerto (celular o humoral). Los pacientes fueron tratados con CsA o TAC; el 76,1% de los portadores del genotipo CC presentaron rechazo de aloinjerto el primer año tras el trasplante, frente al 33,3% de los portadores de CT / TT. Los pacientes con genotipo CC tendrían mayor activación linfocitaria y, por lo tanto, una mayor liberación de citoquinas y una inflamación más intensa. (Sánchez-Lázaro *et al*, 2015). Aunque nosotros sí hemos encontrado esta variante en un paciente perteneciente al grupo RMA y en dos del grupo Control no hemos encontrado asociación. Sin embargo se podría aumentar la cohorte en estudio para comprobar la posible relación de la variante rs2066844 con el RMA.

Respecto al metabolismo de la CsA, en el gen *ABCB1*, tres son los SNPs más comúnmente estudiados. Chowbay *et al* analizaron la influencia de tres SNPs en este gen (rs1128503, rs2032582, rs1045642) en los valores del área bajo la curva concentración plasmática-tiempo en un intervalo de 12h (AUC0-12h) y de 4h (AUC0-4h), concentración máxima (Cmax) y mínima (Cmin) de CsA en condición estable después del trasplante. Estos autores encontraron que los valores de AUC0-12 h, AUC0-4 h y Cmax fueron mayores en aquellos pacientes que presentaron el haplotipo T-T-T (Chowbay *et al*, 2003). Sin embargo, Ahsen *et al* y Hesselink *et al* estudiaron el rs1045642 en pacientes con trasplante renal, y no afectó a las concentraciones mínimas de CsA ajustadas a la dosis (Ahsen *et al*, 2001; Hesselink *et al*, 2003). Con respecto al SNP rs2032582, Sharaki *et al* observaron una diferencia significativa tanto en los requisitos de dosis diarias de CsA como en los niveles mínimos ajustados a la dosis entre diferentes genotipos. Esto podría explicarse por el hecho de que los pacientes con genotipo GG tienen más probabilidades de eliminar el fármaco inmunosupresor de las células intestinales y, por lo tanto, requieren una dosis diaria más alta para alcanzar niveles terapéuticos en la sangre (Sharaki *et al*, 2015). Siguiendo con el rs2032582 Grinyó *et al*, estudiaron a 237 pacientes de origen caucásico con trasplante de riñón. Los pacientes homocigotos para el alelo T triplicaban las probabilidades de experimentar BPAR (rechazo agudo probado por biopsia) que los pacientes homocigotos GG (Grinyó *et al*, 2008). En nuestro estudio, aunque no hemos encontrado asociación, estas variantes sí están presentes: rs1128503 está presente en 23 pacientes; rs2032582 en 25 pacientes y rs1045642 en 22 pacientes. Por lo tanto sería conveniente medir el AUC en pacientes con estas variantes y observar si se obtienen las concentraciones plasmáticas de CsA esperadas.

Siguiendo con variantes identificadas en este mismo gen el rs9282564, presente en el gen ABCB1 ha sido identificado en tres de nuestros pacientes del grupo RMA. Jacobson *et al* encontraron que los portadores del alelo G mostraron una tasa de filtración glomerular menor y presentaban niveles de CsA en sangre más altos, lo que sugiere que los niveles más altos de CsA podrían contribuir al daño renal (Sánchez-Lázaro *et al*, 2015). Esta variante fue identificada en 3 de nuestros pacientes del grupo RMA, sin embargo la asociación encontrada con *SNPstats* se pierde al realizar el análisis con el paquete *SNPassoc* de R.

En cuanto al metabolismo de la CsA, Sharaki *et al* encontraron una asociación de la variante rs4646437 en el gen *CYP3A4* con la farmacocinética de CsA a los 3, 6 y 9 meses después del trasplante. Los portadores del genotipo con el alelo T tenían un requerimiento de dosis más alto y niveles mínimos ajustados a la dosis más bajos que los no portadores (Sharaki *et al*, 2015). Esta variante se encuentra en la región intrónica, a 202 pares de bases del exón 8, por en diseño de las sondas utilizadas en la secuenciación no se visualiza en nuestro estudio.

Otras variantes de este mismo gen implicadas en el metabolismo de la CsA, se encuentra la variante rs2740574, que aumenta la expresión de la enzima al incrementarse la afinidad de la unión al factor de transcripción. Además, la variante rs35599367, identificada en este gen, jugó un papel importante en la expresión de *CYP3A4* hepática y su actividad, así como en la alteración del metabolismo de las estatinas, TAC y CsA (Lee *et al*, 2013). Ninguna de estas dos variantes fue identificada en nuestros pacientes.

En cuanto a genes que afectan a la farmacodinámica de la CsA, el *PPIA* es el único gen que codifica una inmunofilina del que se han hecho estudios de su posible implicación en trasplante. Moscoso-Solorzano *et al* investigaron los SNPs rs6850 y rs8177826 en 290 receptores de trasplante renal. Los SNP no tuvieron efecto en la farmacocinética de CsA y no se encontró asociación para el rechazo renal agudo o la función retardada del injerto (Pouché *et al*, 2016). En nuestro estudio sólo se encontró un SNP en este gen, la variante rs6850 presente en 5 pacientes, la cual no presentó asociación con el RMA o nefrotoxicidad.

Otra aproximación a la farmacogenética de la CsA es la asociación de las variantes en los genes de interés con las reacciones adversas, en especial con la nefrotoxicidad. Jacobson *et al*, encontraron asociación entre nueve SNP en los genes *XPC*, *CYP2C9*,

*PAX4*, *MTRR* y *GAN* y la nefrotoxicidad por CsA. Los SNP en los genes *XPC* y *MTRR* se asociaron con un 57% a 59% menos de riesgo de desarrollar nefrotoxicidad. Los SNP en los genes *CYP2C9*, *PAX4* y *GAN* se asociaron con un riesgo de toxicidad de 2.09 a 3.55 veces mayor (Jacobson *et al*, 2012). De esas 9 variantes, 6 han sido identificadas en nuestros pacientes (rs2228001, rs1057910, rs1057911, rs1802059, rs2608555, rs1532268), aunque no hemos encontrado asociación.

Por lo tanto, aunque en este estudio no encontremos una asociación significativa entre estas variantes y en RMA, no se debe descartar la posible implicación de estos genes en la farmacocinética y la farmacodinámica de la CsA, el RMA y el desarrollo de reacciones adversas. Como podemos observar otros estudios si han confirmado la implicación de numerosas variantes que identificamos en nuestros pacientes en la farmacogenética de la CsA. Ampliar la cohorte de estudio y monitorizar la concentración plasmática podría esclarecer las implicaciones de estas variantes en la farmacocinética, la farmacodinámica de la de la CsA y asociación con el RMA y el desarrollo de reacciones adversas.

Respecto a la asociación de las variantes halladas con el desarrollo de nefrotoxicidad lo hemos considerado como un objetivo secundario debido a que:

- todos los pacientes recibían otros tratamientos de manera concomitante con la CsA,
- los pacientes presentaban diversas patologías.

Con lo cual, nos era imposible discernir la causa del deterioro de la función renal.

Para mitigar las variables de confusión habría que cambiar el enfoque del estudio. Sería necesario ampliar y garantizar la homogeneidad de la cohorte de estudio, en lo referido a la terapia inmunosupresora, otras patologías, edad del donante, entre otras.

## **5.2. Mutación identificada en el gen *CYP3A5***

En este estudio hemos descrito la mutación p.Gln117Ter en el exón 5 del gen *CYP3A5* identificada en un paciente del grupo Control. Este gen codifica una enzima de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Estas proteínas son monooxigenasas que catalizan muchas reacciones involucradas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos.

En este mismo gen se ha identificado otra variante rs776746, que al igual que la identificada en nuestro estudio origina con un codón de parada prematuro y codifica una proteína truncada. Los portadores del alelo salvaje requirieron una dosis más alta en comparación con los portadores de la variante para lograr niveles mínimos similares de TAC. Esto pone de manifiesto la pérdida de funcionalidad de la proteína (García-Roca *et al*, 2012). Otros estudios habían confirmado anteriormente esta asociación, como el realizado por Anglicheau *et al* en 106 pacientes con trasplante renal, de los que 97 presentaban la variante en homocigosis. Sin embargo, tras analizar diversos parámetros farmacocinéticos ( $C_0$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-4}$ , vida media, entre otros), no se encontró asociación entre este SNPs y la farmacocinética de la CsA. La ausencia de esta asociación puede ser el resultado del menor papel de la enzima CYP3A5 en el metabolismo de la CsA si lo comparamos con el TAC (Anglicheau *et al*, 2004). Además, puede que la proteína truncada no se esté expresando, al actuar el mecanismo de reparación de degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras, *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Este mecanismo de reparación detecta codones de stop prematuros y que evita la expresión de proteínas truncadas o erróneas (Hug *et al*, 2016).

Los resultados obtenidos en estos estudios seguramente no podrían extrapolarse a nuestra mutación, dado que en nuestro caso la variante se encuentra en el último exón de otra isoforma. Aunque los programas de predicción in silico predigan que esta mutación es dañina, lo más probable es que no sea apreciable una función deficiente, y que las demás isoformas compensen su función (Bai *et al*, 2010). Sin embargo, sería necesario realizar estudios funcionales para determinar el papel de esta mutación c.349C>T en la farmacogenética de la CsA.

## 6. CONCLUSIÓN

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

1. Se identificaron 66 variantes: :
  - Que podría influir en la farmacodinámica de la CsA: 1 variante en el gen *PPIA*,
  - Que podrían influir en la farmacocinética de la CsA: 9 en el gen *ABCB1*, 2 variantes en el gen *CYP3A4*, 2 variantes en el gen *CYP3A5*, 7 variantes en el gen *POR*,

- Que podrían influir en la en el desarrollo de reacciones adversas: 9 variantes en el gen *NOD2*, 14 variantes en el gen *XPC*, 14 variantes en el gen *MTRR*, 1 variante en el gen *GAN*, 3 variantes en el gen *CYP2C9* y 4 variantes en el gen *PAX4*.
2. La frecuencia de las variantes encontradas es muy similar a las descritas en las bases de datos.
  3. No se encontró asociación entre las variantes encontradas y el RMA tras realizar un estudio de asociación.
  4. No se encontró asociación entre las variantes encontradas y el desarrollo de nefrotoxicidad tras realizar un estudio de asociación.
  5. Se identificó una mutación en el gen *CYP3A5* que podría afectar a la función de esta enzima.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha técnica Sandimmun Neoral®. [Internet]. [Consultado el 13 de Diciembre de 2018]. Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/60320/FT\\_60320.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/60320/FT_60320.html)
- Almenara, L., Delgado, J., Crespo, M.G., Segovia, J. (2010). Situación actual del trasplante cardiaco en España. *Rev Esp Cardiol.* 63(S1):132–149.
- Alrajes, M.C., & Eckman, P. (2014). Adult heart transplant: indications and outcomes. *J Thorac Dis.* 6(8):1120-1128.
- Altman, D.G. (2005). Standard deviations and standard errors. *BMJ.* 331:903.
- Anglicheau, D., Thervet, E., Etienne, I., *et al.* (2004). CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 75(5):422-433.
- Bai, Y., Shi, Z., Zhuo, Y., *et al.* (2010). In glaucoma the upregulated truncated TrkC.T1 receptor isoform in glia causes increased TNF-alpha production, leading to retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(12):6639-6651.
- Barbarino, J., Staats C., Venkataramanan, R., Klein, T., Altman, R. (2013). PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 23(10):563-585.
- Burdmann, E., Takeshi, F., Yu, L., Bennett, W. (2003). Cyclosporine Nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology.* 23:465–476.
- Cascorbi, I. (2018). The Pharmacogenetics of Immune-Modulating Therapy. *Adv Pharmacol.*83:275–296.
- Choi, C.H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* 5:30.
- Chowbay, B., Cumaraswamy, S., Cheung, Y.B., Zhou, Q., Lee, E.J. (2003). Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics.* 13(2):89-95.
- Colgan, J., Asmal, M., Yu, B., Luban, J. (2005). Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol.* 174:6030-6038.
- Crespo, M.G. (2001). Inmunosupresión a largo plazo. En: Campistol, J.L., Cuevas-Mons V, Manito, N., (Eds). Aula sobre trasplante de órganos sólidos. Madrid: Drug Farma SL, pp:121-128.
- Duncan, M., & Wilkes, D. (2005). Transplant-related Immunosuppression. A Review of Immunosuppression and Pulmonary Infections. *Proc Am Thorac.* 2 (5):449-455.
- Eisen, H., & Ross, H. (2004). Optimizing the Immunosuppressive Regimen in Heart Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 23(5S):207-213.
- García, M., Macías, R.M., Cubero, J.J., Benítez, J., Caravaca, F., Gervasini, G. (2013). ABCB1 polymorphisms are associated with cyclosporine-induced nephrotoxicity and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 69:385–393.
- García-Roca, P., Medeiros, M., Reyes, H., *et al.* (2012). CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res.* 43(4): 283-287.
- Gervasini, G. (2018). Pharmacogenetics and personalized medicine. Are expectations being met? *Med Clin (Barc).*1-4.
- González, F., Gómez, M., Almenar, L., Crespo, M.G., *et al.* (2017). Registro Español de Trasplante Cardiaco. XXVIII Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardiaca de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2016). *Rev Esp Cardiol.* 70:1098-1109.

- Grinyó, J., Vanrenterghem, Y., Nashan, B., *et al.* (2008). Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transplant Int.* 21(9):879-891.
- Guada, M., Beloqui, A., Kumar, R., Preat, V., Dios-Vieitez, M.C., Blanco, M.J. (2016). Reformulating cyclosporine A (CsA): More than just a life cycle management strategy. *J Control Release.* 225:269-282.
- Han, K., Pillai, V.C., and Venkataramanan, R. (2013). Population pharmacokinetics of cyclosporine in transplant recipients. *AAPS J.* 15(4): 901-912.
- Hauser, I.A., Schaeffeler, E., Gauer, S., *et al.* (2005). 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.* 16 (5):1501-1511.
- Herrero, M.J., Almenar, L., Jordán, C., Sánchez, I., Poveda, J.L., Aliño, S.F. (2010). Clinical interest of pharmacogenetic polymorphisms in the immunosuppressive treatment after heart transplantation. *Transplant Proc.* 42(8):3181-3182.
- Hesselink, D.A., van Schaik, R.H., Van Der Heiden, I.P., *et al.* (2003). Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 74(3):245-254.
- Hug, N., Longman, D., Cáceres, J.F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* 44(4):1483-1495.
- Illumina Inc. (2017). Prepare Library. Sequence. Analyze Data. TruSight™ One Series of Sequencing Panels. [Consultada el 25 de Noviembre de 2018]. Disponible en: [https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_trusight\\_one\\_panel.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_one_panel.pdf).
- Isla, B. (2009). Análisis farmacogenético de la cinética de absorción de ciclosporina en una población española de pacientes trasplantados cardíacos. *Farm Hosp.* 33:324-329.
- Jacobson, P.A., Schladt, D., Israni, A., *et al.* (2012). Genetic and clinical determinants of early, acute calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity: results from a kidney transplant consortium. *Transplantation.* 93(6):624-631.
- Jia, Y., Meng, X., Li, Y., *et al.* (2018). Optimal sampling time-point for cyclosporin A concentration monitoring in heart transplant recipients. *Exp Ther Med.* 16(5):4265-4270.
- Jonge, H., and Kuypers, D.R. (2008). Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplant Rev.* 22(1):6-20.
- Kim, I.C., Youn, J.C., and Kobashigawa, J.A. (2018). The Past, Present and Future of Heart Transplantation. *Korean Circ J.* 48(7):565-590.
- Krüger, B., Böger, C.A., Schröppel, B., *et al.* (2007). Impact of NOD2/CARD15 haplotypes on the outcome after kidney transplantation. *Transpl Int.* 20(7):600-607.
- Lee, J.S., Cheong, H.S., Kim, L.H., *et al.* (2013). Screening of genetic polymorphisms of CYP3A4 and CYP3A5 genes. *Korean J Physiol Pharmacol.* 17(6):479-484.
- Lindenfeld, J., Miller, G.G., Shakar, S.F., *et al.* (2004). Drug Therapy in the Heart Transplant Recipient. Part I: Cardiac Rejection and Immunosuppressive Drugs. *Circulation.* 110:3734-3740.
- Martín-Dávila, P., Blanesb, M., Fortúna, J. (2006). Inmunosupresión e infección en el paciente trasplantado. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 25(2):143-154.
- Organización Nacional de Trasplantes (ONT). [Internet]. Memoria de Actividad ONT 2017. [Consultado el día 7 de Diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20Coraz%C3%B3n%202017.pdf>
- Noguera, A., Massó, J., Soy, D., Codina, C., Ribas, J. (2002). Sirolimus: una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor. *Farmacia Hosp.* 26:96-105.

- Ponikowski, P., Voors, A., Anker, S., *et al.* (2016). Guía ESC 2016 sobre el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica. *Rev Esp Cardiol.* 69(12):1167-1185.
- Pouché, L., Stojanova, J., Marquet, P., Picard, N. (2016). New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics.* 17(3):277-296.
- Price, D.A., Eng, H., Farley, K.A., *et al.* (2017). Comparative pharmacokinetic profile of cyclosporine (CsA) with a decapeptide and a linear analogue. *Org Biomol Chem.* 15(12):2501-2506.
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponible en: <https://www.R-project.org>
- Ramirez, C.B., & Marino, I.R. (2007). The role of basiliximab induction therapy in organ transplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 7(1):137-148.
- Royal Society of Chemistry. [Internet]. ChemSpider. [Consultado el día 1 de Febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4447449.html>
- Sánchez-Lázaro, I., Herrero, M.J., Jordán-De Luna, C., *et al.*(2015). Association of SNPs with the efficacy and safety of immunosuppressant therapy after heart transplantation. *Pharmacogenomics.* 16(9):971–979.
- Sharaki, O., Zeid, M., Moez, P., Zakaria, N.H., Nassar, E. (2015). Impact of CYP3A4 and MDR1 gene (G2677T) polymorphisms on dose requirement of the cyclosporine in renal transplant Egyptian recipients. *Mol Biol Rep.* 42(1):105-117.
- Shu, W.Y., Li, J.L., Wang, X.D., Huang, M. (2015). Pharmacogenomics and personalized medicine: a review focused on their application in the Chinese population. *Acta Pharmacol Sin.* 36:535–543.
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N.E., Heger, A., Ponting, C.P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet.* 15(2):121-132.
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 22:1928-1929.
- Stepkowski, S.M. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med.* 2(4):1-23.
- Strecker, T., Rösch, J., Weyand, M., Agaimy, A. (2013). Endomyocardial biopsy for monitoring heart transplant patients: 11-years-experience at a german heart center. *Int J Clin Exp Pathol.* 6(1):55-65.
- Tanai, E. & Frantz, S. (2016). Pathophysiology of Heart Failure. *Comprehensive Physiology.* American Physiological Society. *Compr Physiol.* 6:187-214.
- Tedesco, D. & Haragsim, L. (2012). Cyclosporine: A Review. *Journal of Transplantation.* 2012:1-7.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 14(2):178-192.
- Turolo, S., Tirelli, A.S., Ferrareso, M., *et al.* (2010). Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in Italian teenagers after kidney transplantation. *Pharmacol Rep.* 62(6):1159-1169.
- von Ahsen, N., Richter, M., Grupp, C., Ringe, B., Oellerich, M., Armstrong, V.W. (2001). No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clinical chemistry.* 47(6):1048-1052.
- Wu Q & Kuca K. (2018). Metabolic Pathway of Cyclosporine A and Its Correlation with Nephrotoxicity. *Curr Drug Metab.* 19:1-7.

Zhang, X., Li, L., Ding, X., Kaminsky, L.S. (2011). Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab Dispos.* 39:1433-1439.

Zheng, S., Tasnif, Y., Hebert, M.F., *et al.* (2013). CYP3A5 Gene Variation influences cyclosporine A metabolite formation and renal cyclosporine disposition. *Transplantation.* 95:821-827.

Zununi, S., Ardalan, M., Samadi, N., Omid, Y. (2015). Pharmacogenetics and drug-induced nephrotoxicity in renal transplant recipients. *BioImpacts.* 5(1):45-54.