

## ARTÍCULO ORIGINAL

**Implantación de un protocolo Farmacogenético del polimorfismo del GENE CYP3A5 y la respuesta a Tacrolimus en el trasplante renal****Implementation of a pharmacogenetics protocol of the CYP3A5 GENE polymorphisms and Tacrolimus response in kidney transplantation****Chemello C<sup>\*1,2</sup>, Aguilera M<sup>2</sup>, Calleja-Hernández MA<sup>2</sup>, Faus MJ<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. Granada, España. CP: 18071

<sup>2</sup>Unidad de Farmacogenética, Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Avenida de las Fuerzas Armadas, 2 – Servicio de Farmacia, 4ª planta Granada, España. CP:18014. Tel:958 02 03 59; FAX: 950 02 00 04  
clac77@correo.ugr.es

**RESUMEN**

**Introducción:** La monitorización de fármacos revela una gran variabilidad interindividual en la farmacocinética del Tacrolimus, principalmente en la dosis requerida para atingir los niveles sanguíneos terapéuticos y evitar la nefrotoxicidad tras el trasplante renal. La presencia del polimorfismo genético rs776746 del gene CYP3A5 resulta en la reducción de la actividad enzimática y, consecuentemente en la disminución del aclaramiento renal, aumentando su biodisponibilidad, la posibilidad de toxicidad y rechazo agudo del riñón.

**Objetivo:** Generar una base de datos farmacogenéticos personalizada y complementaria a los datos clínicos estándares de los pacientes.

**Pacientes y método:** Estudio observacional descriptivo transversal, pacientes mayores de 18 años en la lista de espera para el trasplante renal en el periodo de Enero a Mayo de 2010 en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada. El ADN ha sido extraído de una muestra de sangre total y el polimorfismo del gene CYP3A5 ha sido determinado por PCR seguida por secuenciación.

**Resultados:** Setenta y nueve pacientes fueron genotipados, edad media de 57±13.4, 60% hombres. Los resultados del genotipado fueron: 77.2% CYP3A5 \*3/\*3 (homocigoto mutado) y 22.8% \*1/\*3 (heterocigoto).

**Discusión:** El 77.2% de los pacientes en la lista de espera para el trasplante de riñón en este hospital van a necesitar una dosis inicial de Tacrolimus cerca de 2 veces menor que los demás pacientes. Por lo tanto, con la traslación de este protocolo farmacogenético a la práctica clínica, se espera optimizar la terapia con Tacrolimus, así como contribuir al aumento de casos de éxito en los trasplantes renales.

**PALABRAS CLAVE:** CYP3A5, polimorfismos, Tacrolimus, trasplante renal.

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** drug monitoring reveals a great variability in the pharmacokinetics of tacrolimus, mainly in order to reach the required dose therapeutic blood levels and prevent nephrotoxicity after renal transplantation. The genetic polymorphism rs776746 of the CYP3A5 gene results in reduced enzymatic activity and consequently in decreased renal clearance, increasing its bioavailability, the possibility of toxicity and kidney acute rejection.

**OBJECTIVE:** To create a personalized pharmacogenetic database to complement the patient's standard clinical data.

**METHOD:** Descriptive study, patients over 18 years in the waiting list for renal transplantation in the period from January to May 2010 at the Hospital Virgen de las Nieves de Granada. The DNA was extracted from a sample of whole blood and CYP3A5 gene polymorphism was determined by PCR followed by sequencing.

**RESULTADOS:** Seventy-nine patients were genotyped, mean age 57±13.4, 60% men. The results of the genotyping were: 77.2% CYP3A5 \*3/\*3 (homozygous mutant) and 22.8% \*1/\*3 (heterozygous).

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 307-313.

---

DISCUSSION: The 77.2% of patients on the waiting list for kidney transplantation in this hospital will need an initial dose of tacrolimus about 2 times lower than other patients. Therefore, the translation of this protocol pharmacogenetics into clinical practice, is expected to optimize therapy with Tacrolimus and contribute to increased cases of successful kidney transplants.

---

KEYWORDS: CYP3A5, kidney transplantation, polymorphism, Tacrolimus.

---

### INTRODUCCIÓN:

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) es un proceso fisiopatológico con múltiples causas, cuya consecuencia es la pérdida inexorable del número y el funcionamiento de nefronas, y que a menudo desemboca en la Insuficiencia Renal Terminal (IRT). A su vez, la IRT es un estado o situación clínica en la que se ha producido la pérdida irreversible de función renal endógena, de una magnitud suficiente como para que el paciente dependa de forma permanente del tratamiento sustitutivo renal (diálisis o trasplante) con el fin de evitar la uremia (síndrome clínico y analítico que refleja la disfunción de todos los sistemas orgánicos como consecuencia de la insuficiencia renal aguda o crónica no tratada), que pone en peligro la vida. Dada la capacidad de los riñones de recuperar su función después de una lesión aguda, la inmensa mayoría de los pacientes con IRT (más del 90%) llega a esta situación como consecuencia de la IRC<sup>1</sup>.

Según la guía de práctica clínica para Enfermedad Renal Crónica Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)<sup>2</sup>, la IRC es un importante problema de salud pública y es definida como una disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular (FG) o por un aclaramiento de creatinina estimados  $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , o como la presencia de daño renal de forma persistente durante al menos 3 meses. El principal marcador de daño renal es una excreción urinaria de albúmina o proteína elevada. La IRC está dividida en 5 estadios (de I a V) dependiente del grado de daño renal y/o FG. En el estadio V, los pacientes necesitan una terapia renal sustitutiva que puede ser la inclusión en el programa de diálisis o el trasplante de riñón.

Los pacientes sometidos a diálisis son candidatos al trasplante de riñón, si cumplen con los criterios clínicos necesarios. En el año 2009, se han realizado 381 trasplantes renales en Andalucía y 2093 en España<sup>3</sup>. Cerca de 30% de los pacientes en la lista de trasplante renal han tenido un trasplante anterior que ha fallado<sup>4</sup>. Una de las causas principales del rechazo es la dosis inadecuada de inmunosupresor en la fase de preparo para el trasplante y la toxicidad de estos medicamentos. El Tacrolimus, un inhibidor de la calcineurina, es uno de los inmunosupresores más usados en el trasplante renal, posee un margen terapéutico estrecho y es nefrotóxico. El gen CYP3A5 es el responsable por su metabolización y diversos estudios han demostrado que el polimorfismo un solo nucleótido (SNP), rs776746, está asociado con la dosis individual requerida y el surgimiento de eventos adversos<sup>5,6,7</sup>.

La farmacogenética es una disciplina que estudia la variabilidad genética individual entre los pacientes, concretamente de aquellos genes específicos que codifican estructuras moleculares involucradas en el mecanismo de acción o metabolización de un fármaco, llamados "Farmacogenes"<sup>8</sup>. Esta área avanza muy rápidamente mediante la realización de numerosos estudios de investigación que determinan su futuro impacto en la

medicina molecular<sup>9</sup>. La transferencia a la práctica clínica de los resultados validados en investigación es un reto y una necesidad, que permitirá la aplicación de farmacoterapias personalizadas con las consecuentes mejoras en los rendimientos farmacéuticos y su coste-efectividad en los Sistemas de Salud<sup>10</sup>.

El análisis genético en IRC tiene el potencial para crear terapias individualizadas a través de la identificación de las mutaciones en los genes involucrados en la metabolización de fármacos<sup>11</sup>. Los polimorfismos genéticos de la enzima de metabolización (CYP3A5) son conocidos por influir en la dosis requerida de Tacrolimus y en sus niveles sanguíneos en pacientes trasplantados<sup>12</sup>. La práctica diaria de monitorización de fármacos revela una grande variabilidad inter-individual en la farmacocinética del Tacrolimus y particularmente en la dosis requerida para atngir los niveles sanguíneos terapéuticos<sup>13,14</sup>.

En un estudio reciente, se ha descrito que pacientes trasplantados que presentaban el alelo mutado \*3 han necesitado una dosis 2 veces menor que los pacientes homocigotos \*1/\*1<sup>15</sup>.

Por lo tanto, como el análisis farmacogenético de los SNP involucrados en la metabolización del Tacrolimus tiene un papel importante en la práctica clínica porque permite optimizar su farmacoterapia y evitar el rechazo agudo de riñón, el objetivo de este trabajo ha sido analizar el polimorfismo del gene CYP3A5 (6986A>G) de pacientes en la lista de espera para el trasplante renal para crear una base de datos farmacogenética personalizada y complementaria a la historia clínica estándar del paciente.

## PACIENTES Y MÉTODO

**Diseño:** Estudio observacional descriptivo transversal

**Tamaño muestral y ámbito del estudio:** todos los pacientes con IRC en programa de diálisis en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada, en el periodo de Enero a Mayo de 2010.

**Criterios de inclusión:** pacientes mayores de 18 años en programa de hemodiálisis o diálisis peritoneal, en la lista de espera para el trasplante renal.

**Criterios de exclusión:** pacientes mayores de 75 años, patologías que impiden el transplante renal.

**Genotipado:** De una muestra de 3 ml de sangre total se extrajo el ADN usándose el QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen<sup>®</sup>, Duesseldorf, Germany), conforme protocolo establecido por el fabricante, en la Unidad de Farmacogenética del Servicio de Farmacia de este hospital. El fragmento específico del gen CYP3A5 ha sido amplificado por PCR, volume final de 25 µl, conforme protocolo: 400 nM dNTPs (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 600 mM de cada primer específico (Tabla 1), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x PCR Gold Buffer y 0.2 U de AmpliTaq Gold (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). Touchdown PCR ha sido

realizada en un teremo ciclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) con las siguientes condiciones: danaturación inicial de 15 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 65-55°C (la temperatura de alineamiento ha sido reducida en 0.5°C en cada ciclo), 30 segundos a 72°C y un paso de elongamento final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR (196 bp) han sido analizados en gel de agarose 2% y purificado usando el MiniElute® PCR Purification Kit (Qiagen®, Duesseldorf, Germany). Los productos de secuenciación han sido purificados usando DyeEx 2.0 Spin Kit y secuenciados en el ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA).

**Tabla 1:** Primers y metodología de PCR.

Gen	SNP	Primers (F/R)	Metodología	TA (°C)	Producto PCR (bp)
CYP3A5	rs776746	F: 5'-CCTGCCTTCAATTTTCACT-3' R: 5'-GGTCCAAACAGGGAAGAGGT-3'	PCR-SEQUENCING	55-65	196

F= primer Forward; R= primer Reverse; TA= Temperatura de alineamiento; bp=pares de base (base pairs)

Los resultados del genotipado han sido registrados en la base de datos y correlacionados con la necesidad de dosis variable de Tacrolimus inicial indicada. Los genotipos esperados son: homocigoto Wild Type (WT) = \*1/\*1; heterocigoto \*1/\*3; homocigoto mutado = \*3/\*3. Los datos de historia clínica han sido recogidos de la base de datos del hospital (Estación Clínica).

Por ser un estudio observacional, el análisis estadístico se constituyó en un análisis descriptivo de los polimorfismo presentes en esta población, usándose o programa SPSS versión 15.0 para Windows .

## RESULTADOS

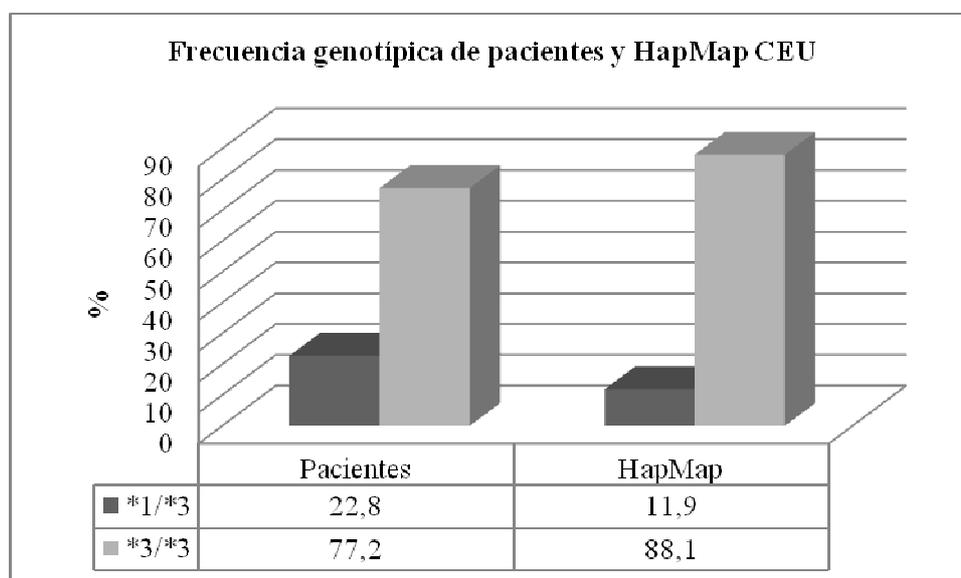
De enero a mayo de 2010, han sido genotipados 79 pacientes, con edad media de 57±13.4 años, 60% hombres. La Tabla 2 muestra los datos demográficos de los pacientes por genotipo y las dosis recomendadas según estudios previos. El análisis del genotipado ha demostrado que 22.8% (18) de los pacientes expresan la enzima (pacientes que presentan el alelo \*1), sin embargo no hay ninguno con el genotipo WT (\*1/\*1). El 77.2% (61) de los pacientes presentan una menor o ninguna expresión de la enzima CYP3A5, por lo tanto presentarán mayor probabilidad de riesgo de sufrir toxicidad al Tacrolimus. La frecuencia de pacientes \*3/\*3 se asemeja a la registrada en HapMap, sin embargo, la de \*1/\*3 es más que el

doble (Gráfico 1).

**Tabla 2:** Datos demográficos y dosis propuestas de acuerdo con el genotipo de los pacientes.  
SD=desviación típica.

VARIABLES	GENOTIPO (n)	
	*1/*3 (18)	*3/*3 (61)
Sexo (F/M)	8/10	24/37
Edad (años; media±SD)	53±13	58±13.5
Dosis propuesta2	0.30mg/Kg/día	0.15mg/Kg/día

**Gráfico 1:** Frecuencias genotípicas de los pacientes y HapMap CEU



## DISCUSIÓN

La monitorización terapéutica de fármacos utilizados tras el trasplante es realizada en la práctica clínica habitual para ajustar las dosis de acuerdo con el nivel sanguíneo y respuesta clínica del paciente. Sin embargo, esto solo puede ser llevado a cabo después de implementado el tratamiento, lo que no evita el surgimiento de eventos adversos y el rechazo agudo del injerto. Se estima que la genética influye en 20-95% en la variabilidad de las respuestas y efectividad de los medicamentos<sup>16</sup>.

---

El polimorfismo del CYP3A5 (6986A>G) ha sido reportado como responsable por cerca de 45% de la variabilidad de la respuesta al Tacrolimus<sup>17</sup>. Es bien conocido que pacientes heterocigóticos o homocigóticos portadores del alelo \*1 expresan altos niveles de la proteína CYP3A5, mientras los homocigóticos portadores del alelo \*3 producen niveles funcionales muy bajos o indetectables de la proteína;**Error! Marcador no definido.** En el grupo estudiado el 74.4% de los pacientes eran homocigóticos para el alelo \*3 y 25.6% eran heterocigóticos \*1/\*3. Al comparar esta frecuencia genotípica con la publicada en HapMap para caucásicos (CEU)<sup>18</sup> se ha observado que la frecuencia encontrada es de aproximadamente el doble de la esperada para heterocigóticos \*1/\*3, lo que necesitará de un análisis más completo para verificar la razón de esta diferencia en esta población, mientras que la frecuencia para \*3/\*3 es semejante a la esperada.

Según estudios previos, la dosis inicial de Tacrolimus puede ser estimada de acuerdo con el genotipo del paciente según el SNP en el CYP3A5. Distintos estudios han descrito que los pacientes \*3/\*3 suelen necesitar aproximadamente la mitad de la dosis inicial habitual recomendada para evitar el rechazo del riñón;**Error! Marcador no definido.**;**Error! Marcador no definido.**<sup>19</sup>. Según Thervet (2010), pacientes heterocigotos \*1/\*3 necesitan dosis de 0.30 mg/Kg/día, mientras los homocigotos \*3/\*3, 0.15 mg/Kg/día.

Por lo tanto, el 77.2% de los pacientes en la lista de espera para el trasplante de riñón en este hospital probablemente va a necesitar una dosis inicial de Tacrolimus cerca de 2 veces menor que la habitual recomendada en la ficha técnica. Por lo tanto, con la traslación de este protocolo de investigación a la práctica clínica, se espera optimizar la terapia con Tacrolimus, así como contribuir al aumento de casos de éxito en los trasplantes renales.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Kasper, DL, et al. Harrison. Principios de medicina interna. Translated from the sixteenth English edition of Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th edition. Copyright © 2005 by The McGraw-Hill Companies, Inc. ISBN 970-10-5165-3 (obra completa).
  2. National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. 2000. Disponible en: [www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines\\_ckd/p4\\_class\\_g1.htm](http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/p4_class_g1.htm). Acceso en 8 de marzo de 2010.
  3. <http://www.ont.es/Documents/Datos%20%20donacion%20y%20trasplante%202009%20revisada.pdf> Acceso en Septiembre 2010.
  4. Krüger B, Schröppel B, Murphy BT. Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ. *Transplant Rev.* 2008; 22: 131-140.
  5. Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *Transplantation.* 2009; 88: S62-S67.
  6. Press R, Ploeger B, et al. Explaining Variability in Tacrolimus Pharmacokinetics to Optimize Early Exposure in Adults Kidney Transplant Recipients. *Ther Drug Monit.* 2009; 31:187-197.
  7. Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, et al. Biotransformation Enzymes and Drug Transporters Pharmacogenetics in Relation to Immunosuppressive Drugs: Impact on Pharmacokinetics and Clinical Outcome. *Transplantation.* 2008; 85:S19-S24.
  8. Huang RS, Duan S, Kistner EO, et al. Identification of genetic variants and gene expression relationships associated with pharmacogenes in humans. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18 (6): 545-9.
  9. Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metab Rev.* 2008; 40 (2):187-224.
  10. Hopkins M M, Ibarreta D, Gaisser S, et al. Putting pharmacogenetics into practice. *Nat Biotechnol.* 2006; 24 (4):403-10.
  11. Haufroid H, Wallemacq P, VanKerckhove V, et al. CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms and Tacrolimus Pharmacokinetics in Renal Transplant Candidates: Guidelines from an Experimental Study. *Am J Transplant.* 2006; 6 (11):2706-13.
  12. Press RR, Fijter JW, Guchelaar HJ. Individualizing Calcineurin Inhibitor Therapy in Renal Transplantation – Current Limitations and Perspectives. *Curr Pharm Des.* 2010 (16): 176-86.
  13. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, et al. Opportunities to Optimize Tacrolimus Therapy in Solid Organ Transplantation: Report of the European Consensus Conference. *Ther Drug Monit.* 2009; 31 (2): 139-152.
  14. Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics.* 2007; 8 (7): 835-49.
  15. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, et al. Optimization of Initial Tacrolimus Dose Using Pharmacogenetic Testing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 87(6):721-26.
  16. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 Single Nucleotide Polymorphisms on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Calcineurin Inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2010; 49(3):141-175.
  17. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics.* 2004; 14:147-154.
  18. International HapMap Project. <http://www.hapmap.org/thehapmap.html.en> Accessed in April 2010.
  19. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, et al. Influence of CYP3A5 Genetic Polymorphism on Tacrolimus Daily Dose Requirements and Acute Rejection in Renal Graft Recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 103:546-52.
-