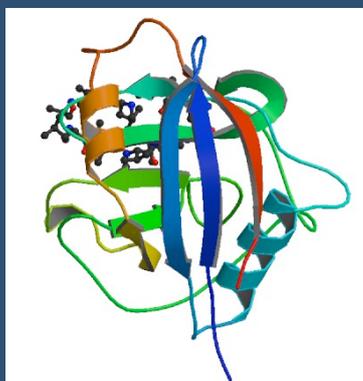




UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO DE LA CICLOSPORINA EN RELACIÓN A LOS FACTORES FARMACOCINÉTICOS- FARMACODINÁMICOS Y LA INCIDENCIA DE RECHAZO AGUDO TRAS EL TRASPLANTE CARDÍACO



Estructura obtenida por difracción de rayos X de un complejo monomérico cristalino de ciclofilina A-ciclosporina A a una resolución de 2.1 Anstroms (PDB)

BEATRIZ ISLA TEJERA
Granada 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Beatriz Isla Tejera
D.L.: GR.1976-2008
ISBN: 978-84-691-5978-1

ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO DE LA
CICLOSPORINA EN RELACIÓN A
FACTORES FARMACOCINÉTICOS-
FARMACODINÁMICOS Y LA INCIDENCIA
DE RECHAZO AGUDO TRAS EL
TRASPLANTE CARDÍACO

Beatriz Isla Tejera

Córdoba, 2008

DON ANTONIO SUÁREZ GARCÍA, DOCTOR EN FARMACIA Y PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

DOÑA MARIA DOLORES AUMENTE RUBIO, DOCTORA EN FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE FARMACOCINÉTICA DEL SERVICIO DE FARMACIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFIA DE CÓRDOBA

Hacemos constar:

Que el trabajo titulado “Análisis farmacogenético de la ciclosporina en relación a factores farmacocinéticos-farmacodinámicos y la incidencia de rechazo agudo tras el trasplante cardiaco” ha sido realizado por Dña Beatriz Isla Tejera, bajo nuestra dirección, en la Unidad de Investigación y en la Sección de Farmacocinética del Hospital Universitario Reina Sofía.

A nuestro juicio reúne los meritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor.

Córdoba, 14 de julio de 2008

Fdo.: Dra. Maria Dolores Aumente Rubio

Fdo.: Dr. Antonio Suárez García

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a realizar este trabajo:

Al Dr. D. Antonio Suárez García, por transmitirme clase a clase el interés por la Biología Molecular, abrirme las puertas de su departamento y aceptar la dirección de esta tesis.

A la Dra. D.^a M.^a Dolores Aumente Rubio, co-directora de esta tesis, por su ayuda, interés y enriquecedores consejos en el aspecto personal y científico.

A D. José Ramón del Prado LLergo, Jefe de Servicio de Farmacia Hospitalaria. Mi más sincera gratitud por confiar y respaldarme en este proyecto.

A D. José María Arizón, Jefe de Sección del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Reina Sofía, a D.^a Carmen Segura Saint-Genís, enfermera de la consulta de trasplante cardiaco y a Victor Mengibar Pareja por su colaboración en este trabajo.

A la Dra. D.^a Rosa Ortega Salas, F.E.A. del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía, por su ayuda y disponibilidad.

A Elier y Fe, maestros y amigos en el laboratorio, suma de disciplina, paciencia, humildad y tesón. Sin su ayuda no hubiese podido realizar esta tesis, gracias por transmitirme conocimientos y brindarme la posibilidad de trabajar con su equipo.

A Vero, Julio, Andrés, Vanesa y Ana grandes compañeros, con quienes trabajar en el laboratorio ha sido un placer.

A mis compañeros del Servicio de Farmacia y de residencia, quienes, deci-

didamente, han sido claves en mi búsqueda para ser buena profesional y mejor persona.

A los pacientes trasplantados de corazón que han participado en este estudio, espero que mis modestas aportaciones ayuden a mejorar su tratamiento.

A Ana, Cristina, Ia, Laura, Natalia, Pilar y Teresa, por ser un ejemplo de constancia, gracias por vuestra amistad.

A mis padres y hermano, por estar siempre ahí, incondicionalmente, por acompañarme en todos mis proyectos, por animarme, por vivir intensamente mis pequeños éxitos y “sufrir” con mis preocupaciones. Muchas Gracias, esta tesis también es vuestra.

Y en general a toda mi familia
y muy especialmente a Juan.

Gracias

A Juan

Índice general

Nomenclatura	11
0.1. Resumen	15
0.2. Introducción	18
0.2.1. El trasplante cardíaco ortotópico	18
0.2.1.1. Concepto y epidemiología	18
0.2.1.2. Factores pronósticos del trasplante cardíaco	21
0.2.1.3. Fármacos inmunosupresores utilizados en el trasplante cardíaco.	31
0.2.2. Rechazo del órgano trasplantado.	46
0.2.3. Farmacocinética y farmacodinamia de la Ciclosporina	53
0.2.3.1. Características químicas de la Ciclosporina	53
0.2.3.2. Farmacocinética.	54
0.2.3.3. Farmacodinamia.	56
0.2.4. Estudios farmacogenéticos en pacientes transplantados cardíacos	60
0.2.5. Estrategias de biología computacional en la búsqueda de nuevas dianas para estudios farmacogenéticos	62
0.2.5.1. Variaciones genéticas	62
0.3. Hipótesis	79
0.4. Objetivos	80
0.5. Diseño y metodología	81
0.5.1. Características de los pacientes y protocolo de trasplante	81

0.5.2.	Tratamiento inmunosupresor	83
0.5.3.	Seguimiento clínico y farmacoterapéutico	85
0.5.4.	Genotipado de los polimorfismos genéticos de nucleótido único	85
0.5.4.1.	Aislamiento de ADN	85
0.5.4.2.	Genotipado de MDR1 (ABCB1) 3435G>A	86
0.5.4.3.	Genotipado de CYP3A4 -290A>G	86
0.5.4.4.	Genotipado de CYP3A5 6986A>G	87
0.5.4.5.	Genotipado de PPIA 4C>A	88
0.5.4.6.	Genotipado de NFATC1 751G>C	89
0.5.4.7.	Genotipado de PRKCZ 268G>C	90
0.5.5.	Análisis farmacocinético	91
0.5.5.1.	Extracción de muestras	91
0.5.5.2.	Determinación analítica de los fármacos	91
0.5.5.3.	Parámetros farmacocinéticos	91
0.5.6.	Diagnóstico histológico de rechazo agudo	92
0.5.7.	Herramientas de Biología Computacional	92
0.5.8.	Aspectos éticos	93
0.5.9.	Procesamiento de los datos y análisis estadístico	93
0.6.	Resultados	96
0.6.1.	Características de la población estudiada.	96
0.6.1.1.	Características demográficas y clínicas	96
0.6.1.2.	Enfermedad cardíaca del receptor	96
0.6.1.3.	Características de los donantes	97
0.6.1.4.	Cirugía y tratamiento inmunosupresor	97
0.6.1.5.	Complicaciones no inmunológicas postrasplante	97
0.6.2.	Características de la población estudiada en función de la presencia o no de rechazo significativo.	98
0.6.2.1.	Frecuencia de rechazo significativo en la pobla- ción de estudio	98

0.6.2.2.	Rechazo significativo en el primer mes postrasplante	100
0.6.2.3.	Rechazo significativo en los primeros tres meses postrasplante	101
0.6.2.4.	Rechazo significativo en el primer año postrasplante	101
0.6.3.	Genotipos de los SNPs seleccionados	118
0.6.3.1.	Nuevas dianas para genotipar	118
0.6.3.2.	Frecuencias alélicas	121
0.6.4.	Análisis por genotipos de la presencia de rechazo agudo significativo	123
0.6.5.	Análisis por genotipos de las principales variables farmacocinéticas de CsA	125
0.6.5.1.	Valores de C0 y C2 en la primera semana postrasplante	125
0.6.5.2.	Estudio farmacocinético de CsA	126
0.6.6.	Análisis de las principales variables farmacocinéticas de CsA en función de la presencia de rechazo significativo.	131
0.6.7.	Curvas ROC para niveles de CsA e incidencia de rechazo.	136
0.6.8.	Análisis actuarial de tiempo libre de rechazo.	138
0.6.9.	Factores predictores de rechazo agudo precoz. Modelo de regresión logística para rechazo agudo.	140
0.7.	Discusión	141
0.7.1.	Incidencia de rechazo	141
0.7.2.	Factores poblacionales y rechazo	141
0.7.3.	Nuevas dianas obtenidas por Biología Computacional	144
0.7.4.	Frecuencias alélicas	148
0.7.5.	Genotipo, farmacocinética y rechazo	149
0.8.	Conclusiones	155
0.8.1.	Conclusión principal	155

0.8.2. Conclusiones secundarias	155
Nomenclatura	156
Bibliografía	161

Nomenclatura

6-MP 6-Mercaptopurina

ABCB1 ATP-binding cassette sub-family B member 1

AMR Anticuerpos mediadores de rechazo

ARNm ARN mensajero

ARNt ARN de transferencia

AUC0-12h Area bajo la curva 0-12h

AZA Azatioprina

BAS Basiliximab

BEM Biopsia Endomiocardica

BIND Biomolecular Interaction Network Database

C0 Concentracion pre-dosis

C2 Concentracion a las 2 h de la dosis

Cl Aclaramiento

Cmax Concentracion maxima

CMV Citomegalovirus

CNV Copy number variant

- CsA Ciclosporina A
- Css Concentracion en estado de equilibrio
- CYP3A4 Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipeptido 4
- CYP3A5 Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipeptido 5
- D Dosis
- DAC Daclizumab
- DAI Desfibrilador automático implantable
- ECG Electrocardiograma
- EVE Everolimus
- FEVI Fraccion de eyeccion del ventriculo izquierdo
- FKBP FK506 binding protein
- GM-CSF Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrofagos
- GR Receptores de Glucocorticoides
- GST Glutation-S-tranferasa
- HGMD Human Gene Mutation Database
- HLA Human leukocyte antigen
- HMM Hidden Markov Models
- IECA Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
- iHOP Information Hyperlinked over Proteins
- IL-1 Interleukina 1
- IL-2 Interleukina 2
- IL-6 Interleukina 6

-
- ISHLT International Society for Heart and Lung Transplantation
- MDR1 Multidrug resistance protein 1
- MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- MMF Micofenolato mofetil
- MPA Acido micofenolico
- mTOR Mammalian Target of Rapamycin
- NFAT nuclear factor of activated T-cells
- NK Natural Killer
- NYHA New York Heart Association
- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man
- ONT Organización Nacional de Trasplantes
- P-gp P-glicoproteina
- PCR-RFLP Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism
- PPIA peptidylprolyl isomerase A
- PRKCZ protein kinase C zeta
- SNP Polimorfismos de nucleótido único
- SRL Sirolimus
- TAC Tacrolimus
- tC0 Tiempo en alcanzar concentracion pre-dosis en rango terapéutico.
- tC2 Tiempo en alcanzar concentraciones a las 2 h postdosis en rango terapeutico.

TNF Factor de necrosis tumoral

TPMT Tiopurina S-metil transferasa

UDP-GT Uridina difosfato glucuronotransferasa

0.1. Resumen

Introducción: El trasplante cardíaco continúa siendo el tratamiento definitivo en pacientes con insuficiencia cardíaca terminal. La ciclosporina (CsA) es uno de los fármacos más empleados para evitar el rechazo. Sin embargo, existe gran variabilidad interindividual en su comportamiento farmacocinético y farmacodinámico. Diversos estudios sobre el efecto de polimorfismos de nucleótido único (SNP) de MDR1, CYP3A4 y CYP3A5, implicados en la farmacocinética de la CsA, muestran discrepancia en los resultados. Además, muy pocos trabajos han sido realizados en trasplantados cardíacos y tan sólo uno analiza el efecto de dichos polimorfismos sobre el riesgo de aparición de rechazo agudo.

Hipótesis de trabajo: SNPs en genes relacionados con la farmacocinética y farmacodinamia de la CsA condicionan la variabilidad observada en el efecto inmunosupresor de este fármaco en trasplantados cardíacos.

Objetivo principal: Determinar el papel de los polimorfismos genéticos MDR1 3435G>A, CYP3A4 -290A>G (CYP3A4*1/*1B) y CYP3A5 6986A>G (CYP3A5*1/*3) sobre la farmacocinética de la CsA y la tasa de rechazo agudo en el primer año en pacientes adultos sometidos a un primer trasplante cardíaco.

Objetivos secundarios: 1.-Analizar diferencias en los parámetros clínicos, farmacocinéticos y farmacogenéticos en función del rechazo agudo tras un mes, tres meses y un año del trasplante. 2.-Analizar los factores que condicionan el tiempo libre de rechazo. 3.-Elaborar un modelo estadístico con los factores clínicos, farmacocinéticos y farmacogenéticos analizados que permita predecir las posibilidades de rechazo agudo tras un mes, tres meses y un año del trasplante. 4.-Diseñar una estrategia de Biología Computacional para seleccionar SNPs en genes implicados en la farmacodinamia de CsA analizando después su influencia en la aparición de rechazo agudo.

Población, diseño y metodología: Estudio descriptivo retrospectivo con 67 adultos trasplantados de corazón en el Hospital Universitario Reina Sofía que habían recibido CsA durante, al menos, un año. Se obtuvo información sobre

aspectos demográficos, antropométricos y clínicos, tanto de los receptores como de los donantes, sobre la monitorización terapéutica y la farmacocinética de la CsA (D, C0, C2, C0/D, C2/D, tC0, tC2, AUC0-12h, AUC0-12/D, Cmax, Cl, Css) y sobre los episodios de rechazo agudo diagnosticados en el primer año postrasplante mediante biopsia endomiocárdica (BEM). A cada paciente se realizó el genotipado por PCR-RFLP de MDR1 3435G>A, CYP3A4 -290A>G (CYP3A4*1B/*3) y CYP3A5 6986A>G (CYP3A5*1/*3).

Resultados: La incidencia de rechazo agudo significativo fue de 31,3% al mes, 40,3% a los tres meses y 55,2% al año del trasplante. Se asoció una mayor incidencia de rechazo agudo en el primer mes a una FEVI del receptor baja antes del trasplante ($p=0,05$); en el tercer mes, al grupo sanguíneo A del donante ($p=0,023$); y en el primer año postrasplante, a mayor edad ($p=0,037$) y a la hemorragia intracraneal como causa de muerte en el donante ($p=0,026$). Los portadores del genotipo TT para el polimorfismo MDR1 3435G>A se asociaron a menor riesgo de rechazo agudo en el primer mes postrasplante ($p=0,026$), sin evidenciarse dicho efecto con el resto de polimorfismos analizados. Dicho genotipo se asocia a mayores valores de C0 en la primera semana postrasplante ($p=0,003$) así como mayores valores de AUC0-12 ($p=0,05$) y Css ($p=0,05$) frente a los portadores de los genotipos CT y CC. Se observaron mayores valores de C0/D ($p=0,04$) y C0/D/peso ($p=0,03$) el día +3 y de C2/D/peso ($p=0,04$) el día +7 entre los pacientes que no presentaron ningún episodio de rechazo agudo significativo en el primer mes postrasplante. Sólo tuvieron capacidad discriminativa las curvas ROC de C0/D (AUC=0,714; $p=0,001$; punto de corte=0,346 ng.mL⁻¹.mg⁻¹) y de C0/D/peso (AUC=0,696; $p=0,003$; punto de corte=23,67 ng.Kg. mL⁻¹.mg⁻¹) en el día +3 y de C2/D/peso en el día +7 (AUC=0,758; $p=0,001$; punto de corte=200,2 ng.Kg. mL⁻¹.mg⁻¹) para el rechazo al primer mes. También se analizó, de igual forma, el efecto de los polimorfismos PPIA 4C>A, NFATC1 751G>C y PRKCZ 268G>C, que habían resultado de la búsqueda de nuevas dianas por métodos de Biología Computacional, encontrando una mayor tasa de infecciones en el primer año postrasplante asociada a los

portadores en homocigosis de T para NFATC1 751G>C. Con el fin de crear un modelo que permitiese predecir el riesgo de rechazo agudo en el primer mes, se incluyeron en un análisis de regresión logística la edad, el género del receptor, el genotipo de MDR1 3435G>A, C0/D y C0/D/peso del día +3 y la FEVI del receptor antes del trasplante. Las únicas variables que quedaron en el modelo final fueron el genotipo MDR1 y el género del receptor. De este modo, ser portador del genotipo TT supone un menor riesgo ($p=0,0237$) y el género mujer un mayor riesgo ($p=0,0184$) de presentar rechazo agudo en el primer mes postrasplante.

Conclusiones: 1) La incidencia de rechazo agudo significativo fue máxima en el primer mes tras la cirugía. 2) Los factores demográficos y clínicos relacionados con una mayor incidencia de rechazo agudo en el primer mes, tercer mes y el primer año postrasplante fueron el género femenino y una baja fracción de eyección del ventrículo izquierdo del receptor antes del trasplante, así como una mayor edad, el grupo sanguíneo A y la hemorragia intracraneal como causa de muerte en el donante. 3) Ser portador del genotipo TT para el polimorfismo MDR1 3435G>A se asocia a un menor riesgo de rechazo agudo en el primer mes postrasplante frente a los portadores de los genotipos CT y CC. 4) El genotipo TT para el polimorfismo MDR1 3435G>A se asocia a la presencia de concentraciones más altas de ciclosporina en la primera semana postrasplante así como a una mejor absorción de la misma, en comparación con los portadores de los genotipos CT y CC. 5) Concentraciones bajas de CsA en la primera semana postrasplante se asocian a una frecuencia mayor de rechazo agudo en el primer mes postrasplante. 6) Estrategias basadas en Biología Computacional pueden ayudar a seleccionar posibles genes candidatos para realizar estudios farmacogenéticos.

Conflicto de intereses: Este trabajo carece de conflicto de intereses.

0.2. Introducción

0.2.1. El trasplante cardíaco ortotópico

0.2.1.1. Concepto y epidemiología

El trasplante cardíaco ortotópico continúa siendo el único tratamiento definitivo para algunos pacientes con insuficiencia cardíaca terminal [88]. Consiste en la sustitución del corazón de una persona que presenta una cardiopatía terminal por el corazón sano de una persona fallecida [118]. Se reserva generalmente para aquellos casos en estadio final de la enfermedad con un pronóstico de supervivencia sin trasplante menor de un año y que no son candidatos o no han mejorado con el tratamiento médico convencional [145][116]. Cada año se benefician de este procedimiento un 1 % del total de enfermos con insuficiencia cardíaca. La mayoría de las indicaciones se realizan en pacientes con disfunción severa del ventrículo izquierdo secundaria a cardiopatía dilatada de origen isquémico o idiopático [197]. Otras indicaciones, que representan en la mayoría de las series menos del 15 % de todos los pacientes trasplantados, son las miocardiopatías secundarias a enfermedades valvulares cardíacas, algunas cardiopatías congénitas y arritmias ventriculares sintomáticas rebeldes al tratamiento médico o quirúrgico. La desproporción entre el número de pacientes con una cardiopatía severa sin respuesta al tratamiento médico y el número de receptores potenciales exige la realización del trasplante cardíaco únicamente a aquellos pacientes que no se pueden beneficiar de otro tratamiento médico o quirúrgico, como, por ejemplo, la revascularización miocárdica mediante bypass aortocoronario o la corrección mediante anuloplastia mitral en pacientes con insuficiencia valvular secundaria a miocardiopatía. Algunos pacientes presentan contraindicaciones para el trasplante cardíaco, como la hipertensión pulmonar (en este caso está indicado el trasplante cardiopulmonar), la presencia de infección activa, neoplasia o enfermedad sistémica con corto pronóstico de vida, insuficiencia renal severa o inestabilidad psicosocial. Además, es necesario que exista compatibilidad a nivel de grupo sanguíneo ABO entre donante y receptor, así como la presencia de

un *cross match* negativo al enfrentar los linfocitos del donante con el suero del receptor.

El donante cardíaco debe ser una persona fallecida sin daño cardíaco. Habitualmente el diagnóstico de la muerte se establece al comprobar el cese de la actividad cardíaca que posteriormente, debido a la isquemia originada, conlleva la muerte cerebral. Sin embargo, en el 1% de las personas fallecidas ocurre el proceso inverso, es decir, se produce primero la muerte cerebral y, secundariamente, tras unas horas o varios días, se produce la parada cardíaca. El donante ha de ser, pues, una persona fallecida por criterios neurológicos¹, que mantiene la actividad respiratoria al estar conectada a un respirador y que, durante las primeras horas o días, hasta que sobreviene la parada cardíaca, el corazón mantiene la función del resto de órganos y sistemas.

En España disponemos de una gran experiencia en el trasplante cardíaco, siendo nuestros resultados equiparables con los de otros países, tanto de nuestro entorno como norteamericanos [29][199]. En 2006, el número de centros activos en los hospitales españoles creció, mientras que el número de donantes óptimos ha permanecido constante (con tendencia a disminuir), probablemente debido al menor número de muertes por traumatismo y a la mejora de los cuidados en las unidades médicas especializadas (Medicina Intensiva, Neurocirugía). Esto conlleva un incremento en el tiempo de espera de un donante óptimo, lo que ha aumentado el riesgo de fallecer en lista de espera (10%) o tras salir de la misma por un empeoramiento (7%).

Según el último informe publicado con datos del Registro Español de Tras-

¹1. Coma profundo con cese de todas las funciones cerebrales valorables clínicamente como la ausencia de los siguientes reflejos cerebrales (reacción pupilar a la luz, reflejos oculocefálicos, reflejos oculoestibulares, reflejo corneal, reflejos orofaríngeos, reflejos respiratorios mediante el test de apnea) mediante un test de confirmación en caso de duda.

2. Cese irreversible de todas las funciones cerebrales:

-Se conoce la causa del coma y es suficiente para que se pierdan las funciones cerebrales.

-Exclusión de posibilidades de recuperación de las funciones cerebrales, descartando intoxicación metabólica o por drogas, hipotermia o shock.

-El cese de las funciones persiste tras un adecuado período de observación.

-El período de observación depende del juicio clínico (cuando el EEG es plano es necesario una observación clínica durante 6 horas; cuando no se cuenta con EEG, durante 12 horas; En la anoxia cerebral: observación clínica durante 12 horas (menos si se hace alguna otra prueba)).

3. Pruebas de confirmación: EEG o diagnóstico del cese del flujo cerebral Angiografía Gamagrafía Doppler.

plante Cardíaco, en sus 22 años de actividad (1984-2006), se han realizado 5.241 trasplantes en 18 centros, de los cuales, el 94 % han sido aislados ortotópicos en adultos [6]. Desde que se se inició el programa de trasplante cardíaco en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba el 6 de mayo de 1986, se han realizado 487 trasplantes en pacientes adultos y pediátricos. El perfil clínico medio del paciente al que se realiza un trasplante cardíaco en España es el de un hombre de 52 años, diagnosticado de cardiopatía isquémica no revascularizable con depresión severa de la función del ventrículo izquierdo y en situación funcional avanzada (NYHA IV²), al que se le implanta, tras un tiempo de espera de 125 días, el corazón de un donante de 34 años fallecido por traumatismo craneal.

La mortalidad precoz (primeros 30 días postrasplante) es del 13 % y las probabilidades de supervivencia actuarial al primer, quinto, décimo y decimoquinto años son del 75 %, 64 %, 51 % y 31 % respectivamente, con una esperanza media de vida de 11,4 años. La causa más frecuente de fallecimiento es la infección (21 %), seguida del fallo agudo del injerto (18 %), enfermedad vascular del injerto más muerte súbita (13 %), tumores (10 %) y rechazo agudo (8 %).

La indicación para el trasplante cardíaco urgente (código '0') es un tema que está en revisión, debido a la controversia que ha suscitado, ya que este tipo de intervenciones tienen un peor pronóstico que las programadas, debido a sus características especiales (receptores en peor condición clínica, donantes subóptimos y mayores tiempos de isquemia). Las guías europeas para la insuficiencia cardíaca consideran que es mejor estabilizar al paciente que indicar el trasplante. Sin embargo, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) cree necesario mantener esta opción para poder resolver situaciones extremas de pacientes en estado crítico, aunque se recomienda la realización de auditorias externas en este grupo de pacientes para poder verificar que se han cumplido los requisitos para establecer esta indicación.

Los criterios de inclusión pueden modificarse anualmente según la evolución de estos pacientes y la aparición de nuevas medidas de apoyo cardíaco. Se puede

²*New York Heart Association*: Grado I (sin disnea), II (disnea con grandes esfuerzos), III (disnea con moderados-leves esfuerzos) ó IV (disnea de reposo).

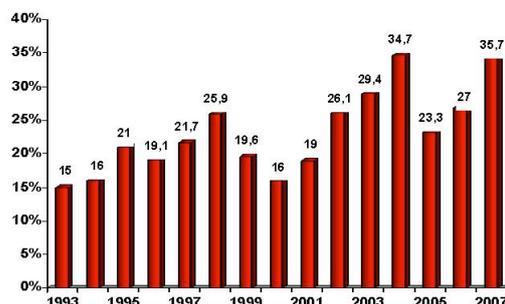


Figura 1: Porcentaje de trasplantes cardíacos realizados de forma urgente con respecto al total en España (2007).

plantear el trasplante cardíaco urgente, en todo paciente con shock cardiogénico o con IC crónica agudizada (a la espera de trasplante cardíaco electivo), con menos de 65 años de edad y alto riesgo de muerte a pesar del tratamiento optimizado y sin otras opciones quirúrgicas razonables [95].

0.2.1.2. Factores pronósticos del trasplante cardíaco

Factores relacionados con el donante

El número de pacientes esperando un trasplante cardíaco ha aumentado progresivamente en los últimos 10 años; sin embargo, el número de trasplante cardíaco realizados está disminuyendo debido a que el número de donantes no ha aumentado [199]. Un 10% de los receptores en lista de espera se mueren y un alto porcentaje de la lista de espera nunca recibirá el trasplante.

En 2007, el número absoluto de trasplantes cardíacos realizados en España fue de 241, la cifra más baja de los últimos 15 años, según datos proporcionados por la ONT³. Debido a la necesidad de aumentar el número de donantes cardíacos, se están reevaluando los criterios para promover la expansión de su número.

Existe una serie de factores relacionados con el donante que se han demostrado determinantes para el éxito del trasplante:

Edad del donante

³<http://www.ont.es/donacion/estadistica/home.htm>

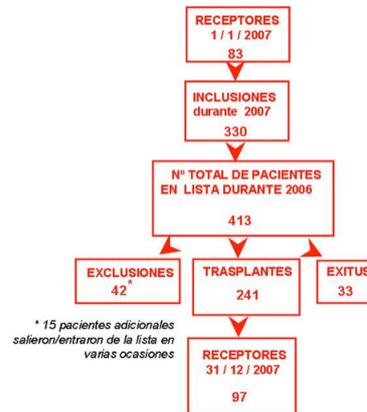


Figura 2: Evolución de la lista de espera global para el trasplante cardíaco en España (2007).

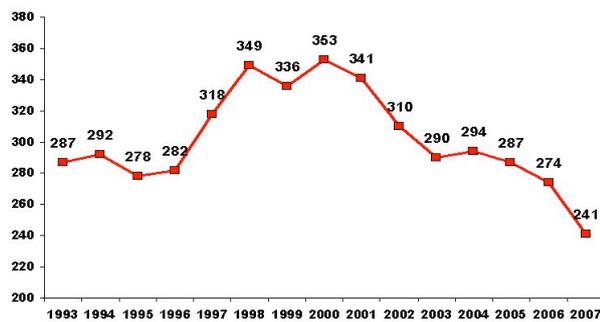


Figura 3: Actividad del trasplante cardíaco en España (1993-2007).

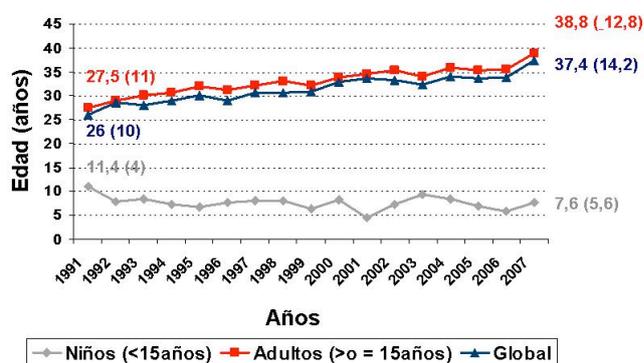


Figura 4: Evolución de la edad del donante cardíaco en España (1991-2007).

Dentro de los criterios de selección del donante cardíaco, la edad es un criterio que ha creado a lo largo del tiempo una gran controversia. La edad avanzada es un factor que determina mayor riesgo de desarrollar lesiones arterioscleróticas o vasculopatía del injerto a largo plazo [30][76][222]. Sin embargo, esta relación no se ha observado cuando se ha estudiado el efecto sobre la supervivencia en el primer año.

Como único criterio de valoración no se puede establecer una edad límite en la aceptación del donante cardíaco. En nuestro país, en los 10 últimos años, se ha incrementado 11 años la media de edad de los donantes y se ha reducido 23 puntos el porcentaje de donantes menores de 45 años. La edad es un predictor independiente de mortalidad tras el trasplante cardíaco, aunque en experiencias individuales, no hay impacto en la mortalidad precoz ni en la tardía con el uso de donantes mayores de 40 años y, en cualquier caso, la mortalidad en lista de espera es superior al incremento de mortalidad hospitalaria por el uso de donantes mayores de 40 años. Para mejorar los resultados, en la evaluación del donante mayor de 40 años es obligatorio disponer de un ecocardiograma reciente. En la Conferencia de Consenso de los Grupos Españoles de Trasplante Cardíaco se propuso incrementar el *pool* de donantes consensuando el uso “obligado”, mediante la creación de listas alternativas o complementarias, de corazones procedentes de donantes mayores de 55 años que cumplan: a) ecocardiograma sin afectación estructural; b) tiempo de isquemia previsto <180 min, y c) uso de

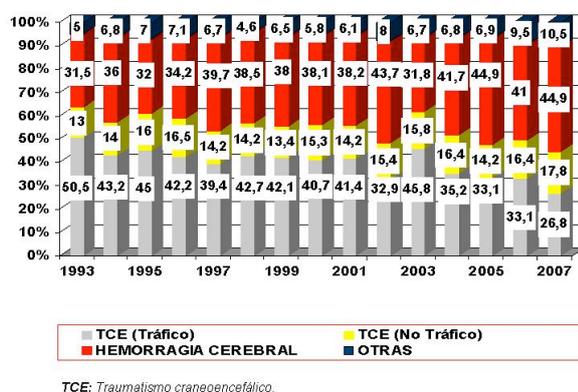


Figura 5: Causas de muerte de los donantes cardíacos en España (1993-2007).

dosis moderadas de fármacos inotrópicos.

Causa de muerte del donante

La causa de muerte del donante es otro factor pronóstico de forma que si la causa de muerte fue una hemorragia cerebral el riesgo de muerte precoz en los pacientes trasplantados de corazón es mayor que si la causa de muerte fue un traumatismo craneoencefálico [177].

Función cardíaca del donante

La función cardíaca del donante debe seguir un manejo cuidadoso que optimice la situación hemodinámica y corrija los desequilibrios respiratorios y endocrinometabólicos, con los menores requerimientos de fármacos simpaticomiméticos. El electrocardiograma (ECG) es necesario siempre, para descartar hipertrofia ventricular izquierda, ondas de necrosis y arritmias. La determinación de las concentraciones de enzimas cardíacas no es obligatoria, aunque sería deseable poder interpretar sus valores junto con el resto de variables. El hecho de que el paciente donante haya requerido de fármacos inotrópicos suponen un mayor riesgo de disfunción del injerto, pero nunca deben excluir la donación por sí solo. La ecocardiografía es recomendable en todos los donantes y disponer de un ecocardiograma en las últimas 24h es obligatorio en el donante subóptimo (edad mayor de 40 años, altas dosis de inotrópicos, hipertrofia ventricular izquierda en el ECG o traumatismo torácico).

Compatibilidad inmunitaria

Una discordancia de HLA (2DR o 4 en total) entre donante y receptor se ha asociado a mayor riesgo de rechazo y menor supervivencia [129][147]. Sin embargo, en la práctica no es posible la preselección por el HLA debido a la escasez de donantes. La compatibilidad ABO es un requisito indispensable, mientras que la compatibilidad Rh no lo constituye. La ausencia de anticuerpos linfocitotóxicos en el suero del receptor es un requisito en la evaluación pre-trasplante. Una reactividad mayor del 10 % en un panel de 30 células obliga a realizar pruebas cruzadas de forma prospectiva frente a linfocitos del donante.

Tiempo de isquemia

Se considera isquemia óptima la menor a 180 minutos y prolongada la de más de 240 minutos. La supervivencia al año es similar en ambos casos, aunque los datos a largo plazo (10 años) son insuficientes para llegar a una conclusión al respecto [138]. Se considera isquemia libre la de 300 minutos; partir de este valor no se dispone de datos clínicos suficientes, por lo que no se debe superar este tiempo, sobre todo si concurren otros factores de riesgo como la edad avanzada [138][161]. Los trasplantes con isquemia prolongada deben considerarse de riesgo y la protección miocárdica debe optimizarse durante la cirugía.

Otros factores

Un menor peso del donante con una diferencia respecto al receptor mayor al 25 % supone un factor de riesgo añadido. El género femenino del donante se asocia a una mayor mortalidad precoz [206], independientemente del género del receptor, así como a un curso postoperatorio con mayor riesgo de complicaciones, como la aparición de insuficiencia renal, de episodios de rechazo celular agudo del injerto y una menor supervivencia en el primer año [155]. En este caso es recomendable individualizar y considerar el resto de las variables (peso, tiempo de isquemia, dosis de ionotrópicos). La existencia de antecedentes de abuso de alcohol y cocaína inhalada en el donante se asocia a mayor riesgo de disfunción del injerto y de coronaropatía en el caso de la cocaína. Esto obliga al estudio de la función cardíaca y a individualizar cada caso.

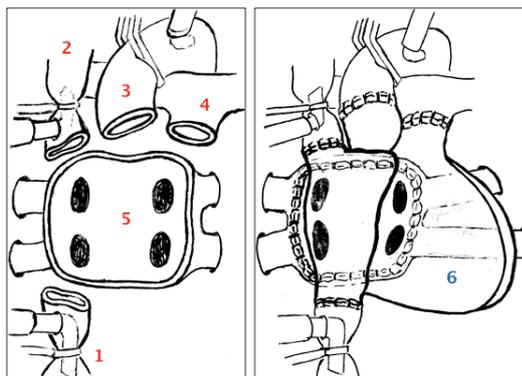


Figura 6: Técnica bicava. La figura muestra los manguitos preimplante (1:vena cava inferior; 2:vena cava superior; 3: aorta ascendente; 4: arteria pulmonar común; 5: cara posterior de la aurícula izquierda donde se ven los ostium de las venas pulmonares) y tras la sutura de los manguitos con el corazón del donante, antes de realizarse la liberación de los clampajes vasculares (6).

Factores relacionados con la intervención quirúrgica

La técnica bicava de Sievers y cols. [175] se caracteriza por una completa excisión de la aurícula derecha y un pequeño corte de la aurícula izquierda alrededor de las venas pulmonares, permitiendo la anastomosis directa del injerto a las venas cava superior e inferior. Se trata de una modificación de la técnica de Dreyfus y cols., [52] que vino a sustituir a la estándar descrita por Lower y Shumway [121]. Ambas técnicas tienen sus ventajas y sus inconvenientes, entre los que se encuentra una mayor tasa de arritmias, bloqueos, dilatación auricular e insuficiencia mitral/tricuspídea asociados a la técnica estándar y un mayor tiempo de isquemia, debido a la mayor complejidad de la técnica bicava [136]. Se han realizado diversos estudios para intentar determinar cuál de las dos técnicas es la más efectiva para el trasplante ortotópico cardíaco [14]. Aunque los resultados de estos estudios no son concluyentes, actualmente en la mayoría de los centros hospitalarios se realiza la técnica bicava. Otros factores relacionados con la cirugía son los tiempos de isquemia y de circulación extracorporea prolongados, una mala técnica de preservación y el fenómeno de rechazo hiperagudo.



Figura 7: Al corazón extraído del donante se le infunde solución cardiopléjica y se aplican medidas para conseguir la hipotermia tópica e inducir una parada en diástole. Se coloca envuelto en hielo en un contenedor con solución de preservación y se traslada al centro donde espera el equipo que realizará la implantación en el receptor.

Factores relacionados con las características del receptor

Pacientes pediátricos y retrasplantes

Los receptores de un trasplante cardíaco suelen pertenecer a uno de los siguientes grupos: adultos, pediátricos y retrasplantes. Tanto los pacientes pediátricos como los retrasplantados constituyen una pequeña fracción del total de trasplantados cardíacos cada año. Sin embargo, constituyen dos grupos con una características especiales que condicionan peores resultados del trasplante. En primer lugar, los pacientes pediátricos, aunque no tienen factores de riesgo cardiovascular, presentan una mayor tasa de hipertensión arterial pulmonar secundaria a la cardiopatía que sienta la indicación del trasplante y que suele corresponder a una enfermedad cardíaca congénita o a una miocardiopatía dilatada idiopática o hipertrófica/restrictiva (muchas veces asociadas a enfermedades sistémicas o genéticas). Por otro lado, los pacientes retrasplantados suelen presentar más factores de riesgo cardiovascular y mayor tasa de enfermedad vascular del injerto que los pacientes sometidos a un primer trasplante cardíaco.

Código "0"

El caso de los trasplantes urgentes también condiciona los resultados ya que, se trata de pacientes que, por lo general, llegan al trasplante en peores condiciones clínicas, la compatibilidad con el donante no es la idónea y el periodo de isquemia suele ser mayor. El porcentaje de trasplantes urgentes ha aumentado

en los últimos años⁴, probablemente, debido al menor número de donantes, lo que hace que el receptor permanezca durante más tiempo en lista de espera y aumenten las posibilidades de que empeore su situación pasando a ser incluido como código "0".

Edad del receptor

También se ha observado que la edad del receptor condiciona los resultados del trasplante. Inicialmente, el trasplante cardiaco fue restringido a pacientes menores de 50 años [44]. Como los resultados del trasplante cardiaco mejoraron, el número de pacientes en lista de espera fue marcadamente en aumento y, con ello, la edad de los pacientes incluidos en lista, pasando de 55 a 70 años [205][27][33][80]. Algunos estudios han aportado datos de supervivencia equiparables y menor número de rechazos en pacientes mayores [137][23][47][139][141]. Sin embargo, en otros trabajos se ha comprobado una disminución en la supervivencia tras el trasplante en este grupo de pacientes [27][67][33]. Debido a que en los últimos años se ha producido un descenso en el número de donantes, actualmente se debate si se debe seguir incluyendo en lista de espera a este tipo de pacientes [137]. Según Tjang y cols., el resultado del trasplante cardiaco en pacientes de mayor edad es menos favorable que en personas jóvenes, observando que el riesgo relativo de mortalidad es de un 25 % para pacientes de 55 a 65 años y de 58 % para pacientes mayores de 66 años[205].

Factores relacionados con el régimen inmunosupresor

Los efectos generales de los inmunosupresores pueden condicionar el resultado del trasplante [1]. Se trata de fármacos muy eficaces pero con un estrecho margen terapéutico, por lo que su uso conlleva un riguroso control de sus niveles plasmáticos y una constante vigilancia de las otras terapias farmacológicas utilizadas en el paciente trasplantado, ya que existen frecuentes interacciones que modifican los efectos. Debido a ello, se pueden producir efectos secundarios que condicionen el curso del trasplante, principalmente a largo plazo. De este

⁴27 % del total de trasplantes realizados en 2007 (frente al 22 % de 2005).

modo, se han descrito una mayor tasa de infecciones oportunistas y neoplasias, sobre todo cutáneas y linfomas, especialmente en los primeros 18 meses tras el trasplante [78][186][108].

La incidencia de neoplasias *de novo* en pacientes trasplantados es 3-4 veces superior al resto de la población general, aumenta con la edad del receptor y es mayor en hombres que en mujeres. Es más frecuente la presencia de melanomas malignos, siendo factores de riesgo la exposición al sol, la edad, el género masculino, tener ojos azules y piel blanca. Como medidas preventivas hay que mantener la mínima inmunosupresión posible y evitar el uso de AZA [87]. El pronóstico de los tumores no cutáneos es malo, con casi un 50% de mortalidad al año del diagnóstico. El desarrollo de linfomas se asocia a la infección por CMV, Epstein-Barr y al uso de OKT-3 a dosis mayores a 70mg durante la evolución [192][191]. El cáncer de pulmón es el tumor sólido más frecuente y está relacionado con el antecedente de tabaquismo [11].

Debido al estado de inmunosupresión del paciente trasplantado, actualmente se realiza profilaxis habitual de infecciones por *Pneumocystis jirovecii*, citomegalovirus (CMV) y *Mycobacterium tuberculosis*. Es aconsejable la profilaxis frente a CMV en pacientes de alto riesgo, es decir, aquellos receptores seronegativos con donantes seropositivos para CMV. El valganciclovir oral durante los primeros 100 días tras el trasplante cardíaco es eficaz en la prevención de la enfermedad precoz por CMV, pero puede incrementar el riesgo de enfermedad tardía ocasionada por CMV resistentes a ganciclovir [152][176]. El tratamiento de los episodios de rechazo agudo con repercusión hemodinámica o corticoresistentes con anticuerpos antilinfocitarios o anti IL-2R aumenta el riesgo de desarrollar una infección por CMV, por lo que debe reservarse la profilaxis en estos casos, ya que no existen aún evidencias para recomendarla fuera de estas situaciones. Sin embargo, la estrategia de terapia anticipada a este tipo de pacientes ha demostrado en algunas series reducir la incidencia de enfermedad por CMV [150]. La profilaxis con cotrimoxazol se realiza en todos los trasplantados cardíacos durante los primeros 6-12 meses, siendo eficaz en la prevención de la neumo-

nía por *Pneumocystis jiroveci*, *Lysteria monocytogenes* y *Nocardia asteroides*. La profilaxis de la infección tuberculosa se realiza con isoniacida (300mg/día durante 6-12 meses) en aquellos pacientes que hayan presentado una prueba de la tuberculina positiva, una vez se haya descartado enfermedad activa en la evaluación pretrasplante. La profilaxis antifúngica con nistatina, itraconazol o voriconazol y la profilaxis contra el virus de herpes simple con aciclovir se realizan en algunos programas de trasplante cardíaco, pero su eficacia no ha sido demostrada.

También son comunes las complicaciones no inmunológicas como la hipertensión arterial sistémica, la insuficiencia renal postrasplante y la hiperlipidemia asociada a la ciclosporina, así como diabetes y osteoporosis asociadas al uso de corticosteroides. Tras la introducción de la CsA, la hipertensión arterial sistémica probablemente sea la complicación más frecuente en el trasplante cardíaco [17][130]. El tacrolimus (TAC) tiene unos efectos similares a los de la CsA, si bien la prevalencia de hipertensión arterial en regímenes basados en TAC es menor [153]. Entre las combinaciones de fármacos para su tratamiento se emplean los antagonistas del calcio y los IECA. La insuficiencia renal es una complicación muy frecuente, cuya incidencia aumenta con el paso del tiempo tras el trasplante [79] y que empeora el pronóstico de estos pacientes [162][172]. Aunque está claro el papel que representa la CsA en su desarrollo, también se han visto relacionados otros factores como la edad del receptor, el grado de deterioro de la función renal previo al trasplante, la etiología isquémica de la cardiopatía del receptor previa al trasplante o el desarrollo de otros factores de riesgo vascular como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus [37][171]. El diagnóstico *de novo* de diabetes mellitus y la intolerancia a los hidratos de carbono, son complicaciones frecuentes del trasplante cardíaco a largo plazo que se asocian al uso de corticoides y CsA, siendo la incidencia estimada a los 5 años del 32% [100][125]. La incidencia de osteopenia u osteoporosis es de hasta el 50% en los pacientes con insuficiencia cardíaca terminal [173], sumándose hasta en un 5% de casos fracturas vertebrales [115]. Después del trasplante hay una mayor

aceleración en la pérdida ósea, pues se produce un aumento de la resorción, causada fundamentalmente por CsA y TAC, y una formación ósea inadecuada, por el efecto inhibitorio sobre los osteoblastos que ejercen los corticoides. Debido a ello, se puede llegar a perder hasta un 20% de la masa ósea en el primer año postrasplante [24] con una incidencia de fracturas vertebrales de hasta un 35% [174].

0.2.1.3. Fármacos inmunosupresores utilizados en el trasplante cardíaco.

El tratamiento inmunosupresor ha sido determinante en mejorar el pronóstico de los pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido. La introducción de fármacos eficaces como ciclosporina, azatioprina y corticoides permitió el desarrollo de los programas de trasplante cardíaco en todo el mundo. En los últimos 15 años han aparecido nuevos fármacos que han ampliado las opciones terapéuticas. Los fármacos inmunosupresores disponibles hoy se pueden clasificar en fármacos inductores (muromonad-CD3, timoglobulinas y antagonistas de los receptores de IL-2, daclizumab (DAC) y basiliximab (BAS)); anticalcineurínicos (ciclosporina (CsA) y tacrolimus (TAC)); antimetabolitos o inhibidores de la síntesis de purinas (micofenolato mofetil (MMF) y azatioprina (AZA)); corticosteroides y antiproliferativos o inhibidores de mTOR (sirolimus (SRL) y everolimus (EVE)).

Los fármacos inmunosupresores utilizados en el trasplante cardíaco se pueden combinar de diversas formas, constituyendo diferentes pautas de tratamiento, que se pueden clasificar según el objetivo que se persiga: inducción, mantenimiento y rechazo.

El *régimen de inducción* tiene por finalidad bloquear la respuesta inmune en el período inicial del trasplante. Se pretende conseguir un estado de inmunosupresión más intenso, aunque esto pueda aumentar el número de infecciones y neoplasias. En esta fase se han empleado tradicionalmente agentes antilinfocíticos, como la timoglobulina en los primeros 7 a 14 días post-trasplante [32].

En los últimos diez años se han introducido los anticuerpos bloqueadores de los receptores de IL-2, que parecen reducir los episodios de rechazo sin aumentar mucho la tasa de infecciones ni tumores [18][45]. En algunos centros, la inducción con anticuerpos monoclonales se reserva sólo para los pacientes con disfunción renal pretrasplante (porque permite retrasar el uso de anticalcineurínicos) y/o para pacientes con alto riesgo de rechazo [34]. Según el registro del ISHLT, aproximadamente el 50 % de los receptores de trasplante cardíaco han recibido una pauta de inducción.

En el *régimen de mantenimiento* se suele emplear la combinación de un anticalcineurínico, un antimetabolito y un esteroide. En los últimos años han surgido nuevas pautas para reducir el riesgo de nefrotoxicidad asociada los anticalcineurínicos y los problemas metabólicos de los corticoides, mediante la introducción de un inhibidor de mTOR para reducir las dosis o eliminar alguno de los anteriores, con buenos resultados [68][154]. También existe un creciente uso de pautas en las que se elimina el corticoide entre los 6 meses y 2 años sin que ello implique un mayor riesgo de rechazo [196].

La decisión de tratar los *episodios de rechazo agudo* depende de la magnitud del episodio (si hay o no compromiso hemodinámico) así como del tipo (celular o humoral) y grado histológico. El tratamiento de rutina del rechazo agudo significativo consiste en dosis altas de metilprednisolona intravenosa durante 3 días. Posteriormente, en el caso de que haya existido más de 3 episodios de rechazo significativo, se suele dejar la prednisona oral durante un periodo de tiempo para luego disminuirla lentamente hasta dejar una dosis pequeña de mantenimiento. En pacientes con inestabilidad hemodinámica o episodios de rechazo agudo refractarios a los glucocorticoides, está indicado el tratamiento de rescate con globulina antitimocito o inmunoglobulinas mono/policlonales.

Inhibidores de la calcineurina

Dos de los principales fármacos inmunosupresores utilizados tras el trasplante de corazón son la ciclosporina (CSA) y el tacrolimus (TAC). Diferentes

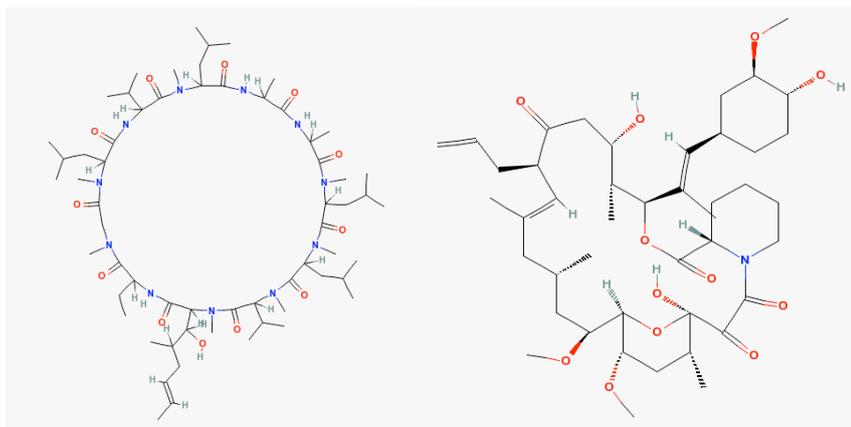


Figura 8: Estructura de ciclosporina A (izquierda) y de tacrolimus (derecha).

estructuralmente, como puede apreciarse en la figura ⁵ ⁶, sin embargo poseen rutas metabólicas de distribución, excreción y mecanismos de acción similares [53][180].

Ambos actúan bloqueando la calcineurina celular activada por calcio, aunque se ha visto que TAC también inhibe pasos distales a este punto en la cascada de activación de las células T, que incluyen el bloqueo de la expresión del receptor de citoquinas y los efectos de las citoquinas sobre las células diana. Sus concentraciones tisulares presentan una estrecha correlación con las concentraciones sanguíneas, de modo que estas últimas son de potencial utilidad para predecir sus efectos en el lugar de acción. Sin embargo, ambos fármacos poseen una gran variabilidad interindividual en el comportamiento farmacocinético y un margen terapéutico muy estrecho. A concentraciones sanguíneas supraterapéuticas, estos fármacos producen efectos tóxicos (nefrotoxicidad, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus, neurotoxicidad, trombopenia, hirsutismo y síntomas digestivos) y favorecen condiciones en las que existe mayor probabilidad de aparición de infecciones oportunistas y tumores asociados [198]. Por otro lado, las concentraciones infraterapéuticas conllevan un menor efecto inmunosupresor y, por tanto, mayor probabilidad de reacción inmunológica que media el rechazo

⁵http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280754&loc=ec_rcs

⁶http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=445643&loc=ec_rcs

agudo.

Se conocen múltiples factores que contribuyen a la variabilidad en el perfil cinético de estos fármacos, tales como la edad, el género, la etnia, la enfermedad, la exposición ambiental y la hora de día en que se administran. Hoy en día, tan sólo la monitorización periódica de sus concentraciones plasmáticas permite el control de dichas variaciones, de modo que, con los valores obtenidos y un juicio clínico apropiado, el facultativo establece si ha de modificarse o no la siguiente dosis del fármaco. De este modo, se pretende que los niveles del fármaco estén, en la medida de lo posible, dentro de su margen terapéutico.

Igual que con otros fármacos, se ha querido ver si el componente genético influye tanto en la eficacia como en la probabilidad de que se produzca una reacción adversa a dichos medicamentos. La biodisponibilidad de los fármacos que se administran a través del tracto gastrointestinal depende en gran medida de la actividad de una familia de proteínas transportadoras expresadas en la superficie del epitelio intestinal y de las enzimas de la subfamilia CYP3A del complejo del citocromo P450. La mayoría de los estudios farmacogenéticos realizados hasta la fecha en pacientes trasplantados se han encaminado a dilucidar el papel que juegan la P-glicoproteína (P-gp) intestinal y las isoformas hepáticas CYP3A4 y CYP3A5 del citocromo P450 en relación con los procesos de absorción y biotransformación de CsA y TAC.

Una de estas proteínas es la proteína P-gp cuya secuencia aminoacídica está codificada por el gen de la proteína 1 asociada a la resistencia a drogas (MDR1 ó ABCB1). Recientemente se han descrito 15 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) relacionados de MDR1, de los que sólo el existente en el exón 26 (C3435T) se ha visto que es de importancia funcional. Se trata de un polimorfismo de tipo no sinónimo, por lo que no origina cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína. Recientemente se ha publicado un interesante trabajo que demuestra que el cambio en la funcionalidad de la proteína se produce porque el ARNt correspondiente al nuevo codon está menos representado en la célula. En situaciones metabólicas de gran actividad en la síntesis proteica, en

las que existe una mayor demanda general de ARNt, el retraso relativo en la incorporación de dicho ARNt a la subunidad ribosómica origina una alteración conformacional de la proteína durante su empaquetamiento [102]. Los individuos que expresan en homocigosis el alelo T tienen una menor expresión de P-gp a nivel duodenal, mayor actividad in vivo y mayores concentraciones de los sustratos de esta proteína. Se han observado diferentes frecuencias alélicas para este polimorfismo en distintas poblaciones. Así, el alelo T se ha encontrado en un 54 % en la raza caucásica y en la población japonesa, mientras en la africana tan sólo representa un 13 %. Bernal y cols. han realizado un análisis de las frecuencias alélicas encontradas en España, encontrando que C está en un 52 % de la población y las frecuencias genotípicas para C/C, T/T Y C/T y son 26 %, 22 % y 52 % respectivamente [19].

La isoforma CYP3A4 del citocromo P450 se encuentra en grandes cantidades en la superficie de los enterocitos y en el hígado. Tanto CYP3A4 como P-gp tienen una gran coincidencia en la especificidad de sustratos y una gran proximidad anatómica. Se han identificado diversas variantes alélicas, siendo la más frecuente la que representa una transición A→G en la región promotora 5' (CYP3A4*1B). Está ausente en chinos y japoneses, siendo baja su frecuencia en caucásicos e hispanos y mucho mayor en individuos de raza negra.

CYP3A5 es también polimórfica y su expresión en el hígado es muy variable. La mayor razón para explicar esta variabilidad reside en un SNP del intrón 3 del gen de CYP3A5 (conocido como alelo CYP3A5*3), que causa fallo en el proceso de corte y empalme. Se detecta en cantidades apreciables sólo en un 10-30 % de individuos de raza caucásica y asiática. Sin embargo, hasta un 50 % de los afroamericanos expresa la proteína, siendo el alelo predominante en estos casos CYP3A5*1.

La existencia de una relación entre la información genética de cada individuo con la respuesta farmacocinética observada para una dosis determinada permitiría a priori individualizar el tratamiento para cada paciente. Este es el objetivo de la farmacogenética: seleccionar un régimen posológico individual-

lizado en función de la composición genética del individuo para alcanzar una eficacia máxima y mínima toxicidad, con el fin de evitar problemas terapéuticos y lograr resultados clínicos óptimos. Cuando se han llevado a cabo estudios para determinar dicha relación en pacientes trasplantados que tomaban inhibidores de la calcineurina, se han encontrado resultados discordantes.

Balram y cols. estudiaron la frecuencia y la expresión del polimorfismo C3435T en pacientes asiáticos trasplantados de corazón que recibían tratamiento con CsA, observando que se asociaba a una menor expresión de P-gp [15]. Chowbay y cols. analizaron el impacto de varios polimorfismos de los genes CYP3A4 (en la región promotora y exones 5, 7 y 9) y MDR1 (exones 12, 21 y 26) sobre los parámetros farmacocinéticos de la CsA en pacientes trasplantados de corazón de varias poblaciones de origen asiático [40]. Las concentraciones de CsA (AUC0-4h, AUC0-12h y Cmax) fueron mayores en los que tenían haplotipo T-T-T comparado con aquellos con C-G-C. Yates y cols. identificaron el genotipo C3435T del gen MDR1 como el mejor predictor de las variaciones plasmáticas de CsA en trasplantados renales. Este grupo considera que este SNP explica hasta el 43 % de la variabilidad interindividual del aclaramiento oral del fármaco, encontrando menores concentraciones en los portadores del alelo T [218]. Sin embargo, también existen estudios negativos, como el de Anglicheau D y cols. que evaluaron de forma retrospectiva en trasplantados de riñón los efectos de 4 SNPs del gen MDR1 (T-129C, C1236T, G2677(T,A), C3435T) y uno de CYP3A5 (CYP3A5*1/*3). Estos autores no encontraron asociación estadísticamente significativa de estos polimorfismos con la farmacocinética de CsA [9].

En relación las dosis de TAC, Zheng y cols. encontraron que los portadores del haplotipo MDR1 G2677T/C3435T tenían mayores concentraciones plasmáticas del fármaco [225]. En el estudio de Hoffmeyer y cols. el genotipo TT 3435 MDR1 se asoció con una baja expresión de P-gp en los enterocitos. Tada y cols. observaron que los trasplantados renales de Japón portadores del genotipo CYP3A5*1 requerían mayores dosis de TAC que aquellos con CYP3A5*3/*3,

indicando una menor AUC_{0-12h} [194]. Sin embargo, el polimorfismo C3435T de MDR1 pareció no ser un factor determinante en la farmacocinética de dicho fármaco. Estos resultados fueron reproducidos en los trabajos de Zhao y cols. en población china, de MacPhee y cols. en población caucásica y del sur de Asia [123] y de Thervet y cols. en población caucásica, afro-americana e indú [203], cuando se analizó la relación entre las concentraciones de TAC y el polimorfismo CYP3A5*1/*3. Zheng y cols. encontraron resultados similares con los polimorfismos MDR1 C3435T, MDR1 G2677T y CYP3A5*1/*3 en adultos trasplantados de pulmón [224].

Existen dos trabajos publicados por Hesselink y cols. que analizan, en pacientes trasplantados de riñón y corazón, polimorfismos de los tres genes anteriores en relación a la cinética de CsA y TAC [83][81]. Concluyen que ninguno de los polimorfismos analizados se correlaciona con las concentraciones predosis de CsA. Sin embargo, en relación a TAC observaron que los portadores del alelo CYP3A5*1 o del alelo CYP3A4*1B, tanto en homocigosis como en heterocigosis, tenían niveles menores del fármaco, no se observó relación alguna con el polimorfismo MDR1 C3435T. Sólo un trabajo realizado por Von Ashen y cols. relaciona la farmacogenética de CsA y TAC con el pronóstico del paciente. Encontraron que el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y el CYP3A4*3 no eran determinantes mayores de la incidencia de rechazo en trasplantados renales de origen caucásico.

Corticosteroides

Desde 1950 los corticoides han sido utilizados en enfermedades autoinmunes y, más tarde, para prevenir el rechazo agudo de órgano trasplantado sólido, La terapia esteroidea es un componente estandar en la inducción, mantenimiento y terapia antirechazo. Altas dosis de corticoides son generalmente administrados intraoperatoriamente y posteriormente en pauta descendente por via oral durante meses. En bolus IV también son utilizados cuando se evidencia rechazo significativo. Los esteroides a largo plazo están ligados a un gran número de

efectos adversos, entre otros: hipertensión, osteopenia, diabetes, úlcera gástrica, cataratas, fragilidad emocional o Sd de Cushing.

- Estas moléculas interactúan con receptores específicos citosólicos (GR, receptores de Glucocorticoides), formando un complejo hormona-receptor que migra al interior del núcleo, donde se fija a elementos reguladores de las regiones promotoras, conocidos como “elementos de respuesta a glucocorticoides” formando el complejo “GRE”. Este complejo modula la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria. Los glucocorticoides afectan al número, distribución y función de todos los tipos de leucocitos (linfocitos T y B, granulocitos, macrófagos y monocitos) así como células endoteliales. En las células presentadoras de antígeno afecta a la expresión génica de IL-1, IL-6 y TNF- α ; en la célula T activada, el complejo GRE bloquea la transcripción génica de la IL-2 ya que fija los factores nucleares NFATc/NFATp y NFATn/AP1 activadores e impide su interacción con los elementos de potenciación AP1. También se ha comprobado que inhiben la migración hacia el núcleo del factor Kappa B (NF-kB), factor fundamental para la transcripción génica de un espectro amplio de citosinas. Esta acción depende de la inducción de la transcripción del gen I κ B α que atrapa el nuclear FNkB en forma de complejo inactivo a la altura del citoplasma. El concepto de resistencia a glucocorticoides es relevante en el tratamiento de alergias y de enfermedades autoinmunes. Además, se ha estimado que 20-30 % de los rechazos agudos del injerto son resistentes a esteroides [42]. El origen de este fenómeno es multifactorial; sin embargo, la herencia parece jugar un papel importante [221][163][7][113]. Se han identificado varios SNPs en el gen del receptor de los glucocorticoides [221][163] que se han correlacionado con una resistencia mayor a su acción antiinflamatoria. Por el contrario, otros investigadores [7] han hipotetizado que los polimorfismos genéticos dentro del gen de la glutathion-S-transferasa (GST) pueden ser importantes clínicamente en la resistencia a glucocorticoides. Homocigotos para la

delección de GSTT1 confiere una reducción 6,7 veces del riesgo de tener una peor respuesta a la prednisona. La respuesta a esteroides puede estar también influenciada por polimorfismos en los genes del factor de necrosis tumoral (TNF) e interleukina-10 (IL-10)[113]. El polimorfismo G/G para IL-10 confiere un efecto protector en pacientes con leucemia frente a una peor respuesta a prednisona, mientras que la expresión del alelo TNF2 tiene mayor riesgo de recaída. Todos estos polimorfismos pueden ser importantes en el manejo de los pacientes transplantados.

Inhibidores de la síntesis de nucleótidos

Azatioprina (AZA)

La azatioprina es un fármaco con efecto antimetabolito citotóxico que se transforma in vivo en 6-mercaptopurina (6-MP), comúnmente usada como inmunosupresor y para el tratamiento de neoplasias, como la leucemia aguda linfoblástica. En el trasplante es usado generalmente como terapia de mantenimiento en combinación con esteroides e inhibidores de la calcineurina. El compuesto activo 6-MP requiere de la conversión intracelular a nucleótidos de tioguanina (principalmente 6-tioguaninas) a través de la ruta de la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HG-PRT) para ejercer su actividad biológica. La AZA también es metabolizada a las formas inactivas 6-metilmercaptopurina por la enzima tiopurina S-metil transferasa (TPMT) o ácido 6-tioúrico por la enzima xantina oxidasa. Estas rutas reducen la formación de nucleótidos activos y disminuyen la toxicidad [39]. El efecto adverso más importante es la mielosupresión, incluyendo leucopenia, anemia, y trombocitopenia, que son generalmente dosis dependiente.

La AZA se ha utilizado en clínica desde 1960, lo que explica porqué la mayoría de los primeros estudios farmacogenéticos se centraron en este fármaco y en las enzimas implicadas en su metabolismo, y más concretamente en la TPMT [EC 2.1.1.67] y HGPRT [EC 2.4.2.8]. El principal polimorfismo genético de la TPMT fue comunicado por primera vez en 1980 [214]. Posteriormente se de-

mostró que la actividad de esta enzima tenía una herencia de tipo autosómica codominante. Las primeras observaciones también documentaron que se puede clasificar a la población blanca en tres grupos de acuerdo a la actividad de TPMT (baja/baja, baja/alta, alta/alta). Aproximadamente el 90 % de la población tiene una actividad alta (fenotipo silvestre), el 10 % tiene una actividad intermedia (heterocigotos) y el 0,5-1 % tiene una actividad baja o indetectable. Posteriormente, cuando se clonó el gen de esta enzima, se descubrieron dos alteraciones en la secuencia de aminoácidos como resultado de polimorfismos de nucleótido único. TPMT*1 es el alelo común (silvestre), mientras que los tres alelos mutantes, llamados TPMT*2 (G238C) y TPMT*3 (A719G y/o G460A) son responsables de la frecuencia trimodal de la actividad de TPMT en la población blanca [Yates:1997p3910]. La presencia de los alelos menores (TPMT*2 y *3) se asoció a una mayor probabilidad de mielosupresión en un grupo de 30 pacientes trasplantados de corazón. Además, no se observó agranulocitosis en pacientes con el genotipo silvestre y sí en los que tenían la mutación TPMT3/A719G. Debido a ello, los pacientes con una actividad de TPMT reducida tenían mayor riesgo de toxicidad grave, incluyendo la mielosupresión fatal después de recibir una dosis estándar de AZA [169][168]. Por otro lado, aquellos pacientes con una actividad de TPMT incrementada podían

no beneficiarse de dicho tratamiento. Dervieux y cols. analizaron el genotipo y midieron las variaciones inter e intraindividual de la actividad de TPMT en eritrocitos de 22 pacientes pediátricos sometidos a trasplante renal [48]. Comprobaron que una mayor actividad de TPMT se asociaba con un mayor riesgo de rechazo, probablemente debido a mayor tasa de metabolización del fármaco. Estos resultados concuerdan con estudios previos que mostraban cómo una alta actividad de TPMT se relacionaba con resultados peores, definidos como mayor incidencia de rechazos [202] y menor supervivencia del injerto [39], en pacientes adultos trasplantados renales. Como alternativa, se pueden determinar las concentraciones en sangre de 6-MP o de sus metabolitos, los nucleótidos de tioguanina. Sin embargo, aunque se ha utilizado ampliamente AZA duran-

te 40 años, la monitorización en clínica de la actividad inmunosupresora no se ha establecido aún. Dado el existe desacuerdo en el uso de la matriz biológica más adecuada, el analito y la relevancia de su monitorización. Parece que es la actividad de TPMT el marcador más importante para predecir la actividad inmunosupresora y los efectos adversos asociados a este fármaco.

Las mutaciones somáticas aparecen de forma regular en los linfocitos T humanos, siendo mucho más frecuentes en condiciones en que está aumentada la proliferación de estas células como ocurre en las enfermedades autoinmunes o durante la respuesta activa frente al injerto. El gen HPRT1 está localizado en humanos en el cromosoma X y es constitutivamente expresado en todas las células. Se ha detectado mutaciones de dicho gen que alteran el fenotipo celular originando mutantes resistentes a la la citotoxicidad de los análogos de la purina, como la AZA, ya que requiere la fosforibosilación para adquirir su actividad intracelular. En un estudio realizado en pacientes trasplantados cardíacos, una elevada presencia de linfocitos T con dichas mutaciones se asoció a una mayor tasa de rechazos agudos [10].

Los polimorfismos en los genes de ambas enzimas, TPMT y HPRT1, pueden ser importantes mediadores de las resistencias al efecto de la AZA encontradas con frecuencia en la clínica. Por ese motivo, su genotipado podría ayudar a un uso más efectivo de este inmunosupresor. Además, estas alteraciones podrían ser de especial importancia teniendo en cuenta el renovado interés por la AZA. Recientemente, de hecho, se ha demostrado que los metabolitos de este fármaco pueden bloquear la señal coestimuladora CD28 en los linfocitos, lo que originaría la apoptosis de los linfocitos T en proliferación y el consecuente efecto de tolerancia específica al injerto. De este modo, el estudio farmacogenético mediante el genotipado de estos polimorfismos también podría tener relevancia en predecir la tolerancia antígeno-específica.

Ácido micofenólico (MPA)

El ácido micofenólico (MPA), compuesto activo derivado del profármaco micofenolato de mofetilo (MMF) y, en su nueva formulación, como micofenolato sódico, actúa como inhibidor selectivo, no competitivo y reversible de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima clave en la biosíntesis de nucleótidos, sustratos imprescindibles para la síntesis de ADN y ARN. A diferencia de otros tipos celulares, los linfocitos B y T sólo pueden usar la síntesis de novo para la generación de guanosina [59]. Así MMF es inhibidor selectivo de la proliferación de linfocitos en ausencia de la inhibición del crecimiento de otras líneas celulares. MMF es considerado tan eficaz como la AZA pero produce menos mielosupresión. En general es bien tolerado; los efectos adversos más frecuentes incluyen náusea, vómitos y diarrea.

Existen dos isoformas de la IMPDH, la tipo I y la tipo II. La primera se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos y la otra puede ser inducida por activación de los linfocitos T o tras un periodo largo de tratamiento con el MMF.

MPA sufre una metabolización primaria mediante glucuroconjugación que origina la forma inactiva 7-O-glucuronido (MPAG) por la uridina difosfato glucuronotransferasa (UDP-GT). Se han identificado tres formas de UDP-GT responsables de la glucuroconjugación de MPA, llamadas UDP-GT1A8, UDP-GT1A9 y UDP-GT1A10. Estas enzimas se expresan en el tracto gastrointestinal, el hígado y el riñón.

MMF se administra generalmente en dosis diaria fija y en principio no se recomendó la monitorización de sus concentraciones plasmáticas para controlar su actividad y los posibles efectos secundarios, pero cada vez hay más evidencias que apuntan a que la monitorización de los niveles se asocia a una mejoría en los resultados clínicos [35].

Se han observado diferentes patrones de exposición al fármaco y su metabolismo que podrían estar relacionados con la existencia de polimorfismos genéticos de las enzimas implicadas en su biodisponibilidad. Se han identificado

varios polimorfismos en la superfamilia de UDP-GT que afectan al metabolismo de compuestos endógenos como la bilirrubina y que también se han relacionado con la toxicidad de diferentes fármacos antineoplásicos. Recientemente, Huang y cols. identificaron varios polimorfismos funcionalmente significativos que origina cuatro alelos relacionados con UGT1A8 (UGT1A8*1a A255G⁷; UGT1A8*1 A¹⁷³C²⁷⁷; UGT1A8*2 G¹⁷³C²⁷⁷; UGT1A8*3 A¹⁷³Y²⁷⁷⁸) [61]. Las frecuencias alélicas varían desde 0'22 a 0'551. Se ha comprobado que la presencia del alelo UGT1A8*3 se asocia con una marcada reducción de la actividad catalítica de la enzima. Sobre el resto de alelos se dispone de menos información en la actualidad.

Se ha observado que algunos pacientes trasplantados presentaban rechazos agudos a pesar de que mantenían niveles de MPA en sangre dentro del rango terapéutico. Esto se podría deber a mutaciones en el gen de IMPDH, tanto en el sitio de unión al fármaco como a los sitios de unión al sustrato enzimático. Se ha comprobado que mutaciones inducidas experimentalmente en el sitio activo (G326A, D364A) reducen la actividad de IMPDH II a menos del 0'1% con respecto a la forma silvestre. La mutación, L310A también origina un descenso de 10 veces en la constante inhibitoria K_i para la inhibición por MPA y un fuerte incremento en la K_m ⁹ para IMP y NAD, sustratos ambos de IMPDH. El polimorfismo E431Q provoca un descenso de seis veces en la K_i para MPA, mientras que el doble mutante mostró una sensibilidad a MPA 20 veces mayor.

Inhibidores de la proteína mTOR

Representan una familia relativamente nueva de inmunosupresores con propiedades antiangiogénicas. Sirolimus o Rapamicina (SRL) es un macrólido liposoluble e hidrofóbico, de estructura química similar a tacrolimus que se aisló por primera vez en la isla de Pacua (Rapa-Nui, Islandia) del hongo *Streptomyces hygroscopicus* [207][170]. Al igual que ocurre con TAC, se une a la familia de las

⁷Una sustitución nucleotídica origina una mutación silente.

⁸Sustituciones de aminoácidos en las posiciones 173 y 277

⁹Constante de Michaelis-Menten

inmunofilinas. Everolimus (EVE) se obtiene modificando la estructura química de sirolimus tras la inclusión de un grupo hidroxilo en la posición-40, EVE. Este cambio aumenta la solubilidad en solventes orgánicos y excipientes galénicos y reduce de dos a tres veces la afinidad de unión a su receptor citosólico (inmunofilina FKBP 12). EVE está indicado en la profilaxis de rechazo tanto renal como cardíaco.

A diferencia de la CsA y el TAC, que interfieren en las fases iniciales de la activación de los linfocitos (bloquean la progresión G0-G1 del ciclo celular), los mTOR (mammalian Target of Rapamycin) afectan a fases posteriores, impidiendo que las células progresen de la fase G1 a la fase S. SRL y EVE poseen dos dominios de unión, uno que media la interacción con FKBP12 y otro que interactúa específicamente con una quinasa citosólica que interviene en el ciclo de división celular llamada mTOR. El complejo inmunosupresor-mTOR inhibe la activación de p70S6K y estimula la expresión de la quinasa inhibidora de la división celular p27Kip1. El tratamiento con EVE ó SRL produce una reducción aguda del proceso de la división celular, un acumulo de glucógeno y un aumento de tamaño de las vacuolas intracelulares. La depleción de la proteína mTOR detiene el ciclo de división celular a nivel de G1. En ausencia de mTOR las células son incapaces de sintetizar CLN3, un activador de la transcripción de genes expresados en la fase G1 de la división celular.

Los inhibidores de mTOR poseen también propiedades antiproliferativas sobre músculo liso y células endoteliales. En el trasplante cardíaco es muy habitual que se produzca vasculopatía del injerto, un engrosamiento arterial en el rechazo crónico, manifestándose como una aceleración de la aterosclerosis. Debido al efecto antiproliferativo que ejercen estos fármacos sobre las células del músculo liso, constituye una terapia de interés en trasplante cardíaco con alto riesgo de desarrollo de tumores [54]. Los principales efectos adversos de EVE y SRL son la trombopenia, neutropenia, anemia, hiperlipemia e hipertrigliceridemia. [97][96].

Datos recientes indican que mutaciones genéticas pueden influir en la resistencia a rapamicinas [86]. Estas mutaciones han sido identificadas en genes de

FKBP y mTOR [120][20] así como mutaciones o deleciones que pueden afectar a proteínas reguladoras de mTOR, incluyendo RPS6KB1, EIF4EBP1, PPP2R4 y PSMD9 que puede ocasionar resistencia a rapamicina [193].

Anticuerpos antilinfocitarios

Existen tres tipos de anticuerpos antilinfocitarios:

Anticuerpos policlonales: las globulinas antilinfocíticas y antitimocíticas equinas (ATG) y de conejo, son obtenidas tras un proceso de purificación del suero de animales hiperinmunizados con timocitos o linfocitos humanos [31]. No actúan selectivamente, ya que durante el tratamiento se ofertan una gran cantidad y variedad de anticuerpos que se fijan a diversos determinantes antigénicos de los linfocitos T del paciente provocando la lisis linfocitaria indeterminada [26]. Los anticuerpos policlonales son usados para la inducción y para el tratamiento de rechazo resistente a corticoides en el trasplante cardiaco. Son pocos los estudios que comparan ambos fármacos y es predominantemente en trasplante renal, en las que las inmunoglobulinas antilinfocíticas y antitimocíticas de conejo parecen moderadamente más eficaz que las de origen equino [60][32]. ATG ha sido usada en el perioperatorio de pacientes con insuficiencia renal para retrasar el tratamiento con inhibidores de la calcineurina.

Anticuerpos monoclonales murinos: muromonab CD3, fue el primer anticuerpo CD3 aprobado para uso en trasplantes. Se indicó inicialmente para la prevención del rechazo agudo y para el tratamiento de rescate del rechazo agudo corticorresistente. Se trata de una Ig2 α dirigida contra la cadena ϵ del CD3 del TCR. Bloquea el reconocimiento antigénico conduciendo a una rápida desaparición de los linfocitos T CD3+. Se sintetiza mediante técnicas de hibridación y clonación, obteniendo al final del proceso una solución purificada de inmunoglobulinas homogéneas. Como consecuencia de la unión de OKT3 al complejo TCR-CD3 se liberan una gran cantidad de citokinas que pueden provocar una reacción sistémica grave.

Anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos: mediante técnicas de

ingeniería genética se han diseñado dos tipos de anticuerpos mixtos, murinos-humanos, que se caracterizan por su menor inmunogenicidad gracias a su reducida porción xenogénica. Basiliximab es un anticuerpo quimérico cuya región constante es humana y la región variable murina, mientras que Daclizumab es un anticuerpo humanizado, dado que únicamente las regiones determinantes de complementariedad de la región variable son de origen murino. Son más específicos que OKT3, ambos se unen a la subunidad α del receptor para la IL-2 (IL-2R), presente únicamente en los linfocitos T activados. Bloqueando la proliferación y diferenciación de los linfocitos T una vez expuestos al antígeno, paso crucial en el desarrollo del rechazo [18][98], aunque, no es suficiente para prevenir el rechazo [201]. Ambos fármacos han conseguido disminuir el número de rechazos [128][208], sin haberse evidenciado un incremento acompañante en el número de infecciones o tumores, aunque sin modificar la supervivencia del injerto ni la mortalidad [143][98], ambos fármacos se usan por los equipos de trasplantes con similares resultados.

0.2.2. Rechazo del órgano trasplantado.

La barrera inmunológica es la principal limitación para el éxito del trasplante de órganos. El código de actuación del sistema inmune del receptor consiste en reconocer péptidos del injerto presentados en moléculas HLA de células especializadas llamadas presentadoras de antígeno (APC). El rechazo agudo no es más que la respuesta del sistema inmune frente algo que reconoce como no propio y el acontecimiento primario que lo inicia es el reconocimiento de los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (CMH). En el rechazo agudo intervienen tanto la respuesta inmune innata como la adquirida. La primera predomina en la fase precoz, cuando la adhesión celular y las quimiocinas juegan un papel esencial en la emigración de los leucocitos a los órganos linfoides secundarios y en la circulación de células dendríticas y de linfocitos T activados desde los ganglios linfáticos al órgano trasplantado. En una segunda fase, la inmunidad innata y adquirida funcionan de forma sincronizada por vías no exclusivas, en las que

se incluyen la citotoxicidad dependiente de células T, células NK, el sistema de complemento, la formación de anticuerpos y la activación de granulocitos por citocinas derivadas de los linfocitos Th1 y Th2.

Cuando se trasplanta un órgano, en términos inmunológicos, se está trasplantando una enorme masa de antígenos. Pero los linfocitos T no responden o reconocen dichos antígenos por contacto directo, sino que previamente deben haber sido activados por APCs en órganos linfoides secundarios. El órgano trasplantado expresa dos tipos de aloantígenos capaces de inducir dicha respuesta: antígenos mayores y menores. Los antígenos mayores son las moléculas del MHC de clase I y II. Las variantes polimórficas de estas moléculas permiten una enorme disparidad entre individuos no relacionados de la misma especie. Dado que los linfocitos T reconocen la diferencia de composición de estas moléculas, los antígenos HLA representan el mayor obstáculo para el trasplante de órganos.

Tipos de rechazo

El rechazo del órgano trasplantado representa un problema significativo ya que puede suponer tanto la disfunción temporal como la pérdida del injerto. Los estudios en modelos experimentales de trasplante cardíaco demostraron que en el corazón, igual que en otros órganos sólidos, se produce una reacción inmune del huésped que, si no es controlada, origina la destrucción y mal funcionamiento del injerto. Se consideran cuatro tipos de rechazo:

a) rechazo hiperagudo: como complicación infrecuente que condiciona el fracaso del corazón en los primeros minutos u horas después del trasplante. Entre los factores de riesgo identificados cabe destacar la politransfusión (multíparas y politransfundidos) y el trasplante con incompatibilidad ABO. Su evolución es rápida, con un brusco deterioro de la función del injerto que, casi invariablemente, lleva a la muerte. Afortunadamente, en la actualidad es raro, debido a las precauciones que se toman en el período perioperatorio.

b) rechazo agudo celular: caracterizado por un infiltrado inflamatorio celular que, según el grado, puede producir necrosis miocárdica. Ocurre habitualmente

dentro de los primeros 3 a 6 meses de realizado el trasplante. Cuando ocurre después de los primeros 6 meses, se observa en quienes tuvieron episodios previos de rechazo moderado o severo, reciente reducción en la inmunosupresión, infección intercurrente o que no han cumplido con la pauta de inmunosupresores. El 95 % de estos rechazos agudos, si son diagnosticados precozmente y tratados, se resuelven sin secuelas. En el caso del trasplante cardíaco, el rechazo agudo conlleva la muerte en un 11 % (es la causa más frecuente de fallecimiento durante la etapa temprana), lo que implica una disminución considerable de la tasa de supervivencia a los 10 años (25 % frente al 54 %).

c) rechazo agudo vascular: puede ocurrir días o semanas después del trasplante. como episodios con compromiso hemodinámico, sin evidencias de infiltración celular en la biopsia o con baja puntuación ISHLT, en este caso presentan peores resultados que aquellos con un alto score. Estos episodios de rechazo con compromiso hemodinámico y biopsia de bajo grado, pueden ser explicados por un error de muestreo (falso negativo) o por rechazo humoral; por el contrario, pueden encontrarse biopsias de alto grado sin evidencias de rechazo clínico, lo que ha generado controversia sobre la necesidad de aumentar la inmunosupresión en estos casos.

d) rechazo crónico: se conoce como enfermedad vascular del injerto (EVI) y afecta a las arterias coronarias del corazón.

En los últimos años, la incidencia de rechazos ha disminuido notablemente con el desarrollo de nuevos inmunosupresores. Su aparición depende de las características inmunogénicas del órgano, de las características del receptor y de nuestra capacidad de diagnóstico. Con el objetivo de prevenirlo, inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, se inicia el tratamiento inmunosupresor, realizándose de forma periódica biopsias endomiocárdicas (BEM) para evaluar el posible rechazo y poder instaurar el tratamiento oportuno de forma precoz.

En nuestro centro está protocolizado que estas últimas se lleven a cabo en todos los pacientes en los días +14, +21 y +28 tras el trasplante. Posteriormente, cada 2 semanas durante 2 meses, luego cada mes durante 3 meses y finalmente

cada 2 meses hasta el final del primer año. De este modo, se detectan los casos de rechazo hiperagudo y el agudo. A pesar de todo, en España, el rechazo se observa en un 50-80 % de los enfermos en este primer año, con una media de 2-3 episodios por paciente.

Los signos y síntomas sugestivos de rechazo agudo corresponden a los de fallo cardíaco (edema, disnea, fatiga, ritmo de galope o aumento de la presión venosa central). Sin embargo, también se puede sospechar cuando aparecen otras evidencias de disfunción cardíaca (disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, disminución del voltaje en el electrocardiograma, nueva arritmia auricular) o clínica no específica como febrícula, mal estado general o cuadro gripal en ausencia de una explicación alternativa.

Procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento precoz del rechazo agudo.

La biopsia endomiocárdica (BEM) es considerada el método de elección para el diagnóstico del rechazo. Se introdujo por primera vez como método clínico para el diagnóstico del rechazo agudo del injerto cardíaco en 1974. En aquella época el tratamiento inmunosupresor estaba limitado al uso de corticosteroides, azatioprina e inmunoglobulinas antitimocito. Como consecuencia, la frecuencia de rechazos agudos era relativamente alta y constituía una causa frecuente de mortalidad postransplante. Por ese motivo se estableció realizar BEM de forma protocolizada, para detectar el rechazo en una fase precoz antes de que apareciese el compromiso hemodinámico.

Posteriormente se ha usado también como un objetivo en los ensayos clínicos con fármacos inmunosupresores donde se han establecido la realización de 10 a 15 BEM durante el primer año. Una BEM adecuada es aquella que permite tomar 4 muestras con al menos un 50 % de miocardio valorable. La gradación histológica se realiza de acuerdo a los criterios de la 1990 International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) y contempla desde 0 (sin rechazo) a 4 (rechazo severo), en la que a partir de rechazo 3A debe recibir tratamiento específico



Figura 9: Realización de cateterismo para toma de biopsias endomiocárdicas en la Unidad de Hemodinamia del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

para el rechazo (3A, 3B y 4). Este sistema es compatible con la reciente revisión del grado de rechazo celular elaborado también por la ISHLT en diciembre 2004 [184]. Fruto de los avances y del las nuevas opciones terapéuticas para prevenir y/o tratar el rechazo, se ha considerado necesaria una reevaluación de la nomenclatura en el diagnóstico del rechazo cardiaco.

El rechazo agudo humoral es una entidad clínica controvertida, con un grado variable de incidencia (en torno al 15% en el primer año) entre diferentes centros, carente de una presentación clínica característica y sin consenso acerca de si su diagnóstico es histológico o inmunológico. Se trata de un rechazo agudo mediado por anticuerpos que se origina en pacientes que han sido previamente sensibilizados (al haber recibido previamente un trasplante, transfusiones de sangre, tras múltiples embarazos o por el uso de sistemas de soporte ventricular). Histológicamente se reconoce por daño en los capilares miocárdicos mediado por el sistema de complemento (C3d, C4d y/o C1q) e inmunoglobulinas (IgG, IgM y/o IgA), así como un acumulo intravascular de macrófagos. La presencia o ausencia de anticuerpos en plasma mediadores de rechazo (AMR) puede ser representada como AMR0 o AMR1.

La BEM es una prueba cruenta que no está exenta de riesgos para el paciente. Aunque poco frecuentes, pueden ocasionar una serie de complicaciones graves

	2004	1990
Grade 0 R ^a	No rejection	No rejection
Grade 1 R, mild	Interstitial and/or perivascular infiltrate with up to 1 focus of myocyte damage	Grade 0 Grade 1, mild A—Focal B—Diffuse Grade 2 moderate (focal)
Grade 2 R, moderate	Two or more foci of infiltrate with associated myocyte damage	Grade 3, moderate A—Focal B—Diffuse Grade 4, severe
Grade 3 R, severe	Diffuse infiltrate with multifocal myocyte damage ± edema, ± hemorrhage ± vasculitis	Grade 4, severe Multifocal infiltrate with myocyte damage Diffuse infiltrate with myocyte damage Diffuse, polymorphous infiltrate with extensive myocyte damage ± edema, ± hemorrhage + vasculitis

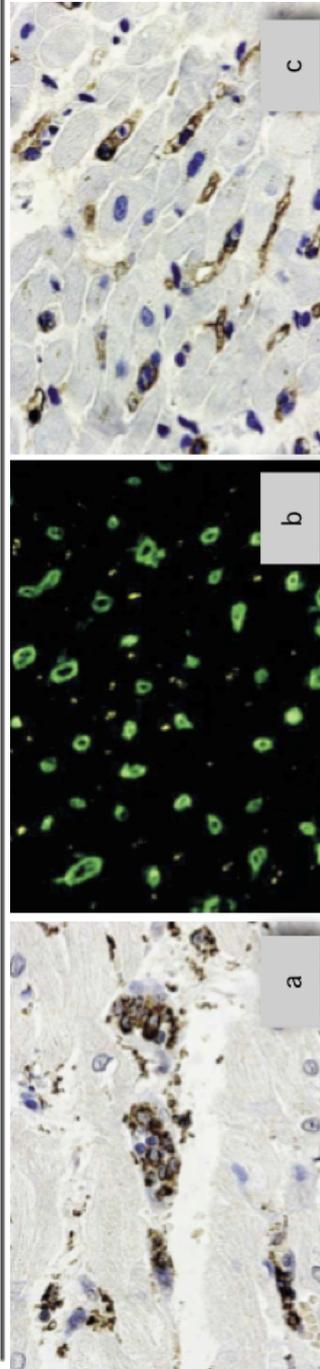


Figura 10: Clasificación histológica del grado de rechazo agudo celular del injerto cardíaco según la ISHTL.

	2004	1990
AMR 0	Negative for acute antibody-mediated rejection	
AMR 1	No histologic or immunopathologic features of AMR Positive for AMR Histologic features of AMR Positive immunofluorescence or immunoperoxidase staining for AMR (positive CD68, C4d)	Humoral rejection (positive immunofluorescence, vasculitis or severe edema in absence of cellular infiltrate) recorded as additional required information

Figura 11: Criterios de la ISHLT para el diagnóstico de rechazo agudo humoral (AMR). (a): Tinción positiva para inmunoperoxidasa para CD68, confirmando la presencia de acúmulo macrófagos en el espacio endovascular; (b): Inmunofluorescencia positiva a C4d en los capilares miocárdicos; (c): Tinción positiva para inmunoperoxidasa para C4d en los capilares miocárdicos.

(infarto de miocardio, insuficiencia tricuspídea severa, taponamiento cardíaco o neumotórax) o menos graves (fístula asintomática de la rama coronaria septal con el ventrículo derecho, síndrome de Horner, fístula arteriovenosa en el lugar de acceso).

Avances posteriores en los regímenes de fármacos inmunosupresores han permitido una menor incidencia y severidad de los rechazos agudos y la consecuente caída en las tasas de mortalidad relacionadas. Aunque un rechazo severo en los primeros 7-10 días es raro (salvo en pacientes sensibilizados), cualquier deterioro de la función cardíaca después de una recuperación inicial tras la cirugía debe considerarse como un posible rechazo agudo. Signos clínicos: palidez, aumento de la frecuencia cardíaca, dolor abdominal, galope y oliguria, son sugestivos de rechazo severo. Ante ello se debe realizar BEM.

Los pacientes que han superado el período postoperatorio precoz, normalmente son dados de alta e ingresan a un programa de seguimiento ambulatorio. En los que se marcan como objetivos la detección precozmente del rechazo, valoración de la función del injerto, evaluación general del estado de salud del receptor. El protocolo de vigilancia puede variar dependiendo del centro, pero en términos generales implica la realización de revisiones cuya periodicidad se va reduciendo en la medida que pasa el tiempo hasta llegar a una frecuencia de dos veces al año. Dentro de estas revisiones, además de la valoración clínica básica, se incluye BEM y una serie de pruebas como análisis de sangre, electrocardiograma, ecocardiograma, radiografía de tórax y cateterismo cardíaco.

0.2.3. Farmacocinética y farmacodinamia de la Ciclosporina

0.2.3.1. Características químicas de la Ciclosporina

Es un antibiótico extraído del hongo *Tolipocladium inflatum* Gams. Es insoluble en agua, pero soluble en varios solventes orgánicos y en lípidos. Está formado por 11 aminoácidos en disposición cíclica, varios de los cuales son N-

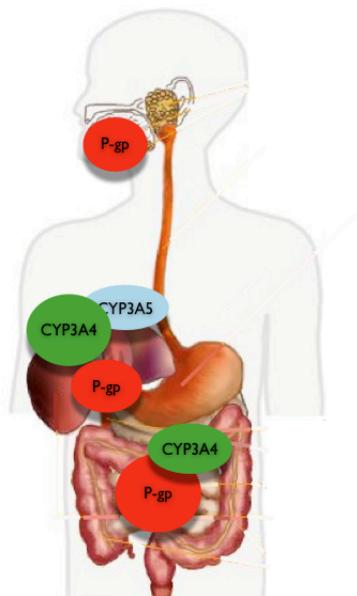


Figura 12: En el intestino, P-gp y CYP3A forman una barrera a la absorción de CsA y TAC. Una vez se produce, ambos fármacos son metabolizados en el hígado y excretados a la bilis.

metilados. La cadena lateral no saturada de la N-metil-L-treonina de la posición 1 y los aminoácidos 2, 3 y 11 son necesarios para la actividad inmunodepresora.

0.2.3.2. Farmacocinética.

La farmacocinética de los inhibidores de la calcineurina se caracteriza por una biodisponibilidad oral generalmente pobre, altamente variable e impredecible, que está en torno al 30 % (rango 4-89 %) [53][180]. Tras su absorción intestinal, es transformada en el intestino y el hígado en 15-30 metabolitos. La eliminación es principalmente biliar con un aclaramiento renal de <1 %. Además de la baja biodisponibilidad oral, se suma la gran variabilidad interindividual en el metabolismo de primer paso y en el aclaramiento sistémico. Desde hace unos años se sabe que gran parte de dicha variabilidad se debe a las diferencias de actividad en las proteínas P-gp, CYP3A4 y CYP3A5 [82].

La secuencia aminoacídica de la P-gp está codificada por el gen MDR1

(ABCB1) localizado en el cromosoma 7q21.1. Esta glicoproteína pertenece a la familia de transportadores de membrana ABC (subfamilia B). La actividad de P-gp es dependiente de ATP y consiste en hacer de bomba para una gran diversidad de sustancias tanto endógenas como exógenas (incluidos los inhibidores de la calcineurina, sirolimus y corticosteroides), de modo que los transporta desde el citoplasma al espacio extracelular [55][165][223]. En estados fisiológicos, P-gp se expresa de forma constitutiva en sólo algunos tejidos como el hígado (en la superficie canalicular de los hepatocitos), el riñón (en el borde en cepillo de las células de túbulo proximal), el páncreas y en la superficie apical de los enterocitos del intestino delgado y colon [66].

Esta selectividad sugiere que la proteína funciona como barrera protectora, eliminando de forma activa metabolitos potencialmente tóxicos y xenobióticos hacia el exterior del organismo mediante su excreción biliar, urinaria o fecal. P-gp también se expresa en el testículo, en la placenta (trofoblasto), en la superficie luminal del endotelio de los capilares cerebrales y en el plexo coroideo, donde contribuye a mantener las barreras hematotesticular, placentaria y hematocéfálica. Además, la P-gp se expresa en varios leucocitos, incluyendo los linfocitos T y B y las células dendríticas [107][157].

La familia enzimática CYP la constituyen más de 50 isoenzimas que son responsables del metabolismo oxidativo de muchos compuestos endógenos y exógenos [55]. La subfamilia CYP3A, que representa la mayoría de las proteínas CYP en el hígado humano, metaboliza más del 50 % todos los fármacos utilizados en la actualidad [109][99][12]. Está constituida por la isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43[109][99][215].

CYP3A4 y CYP3A5 tienen un perfil de especificidad por sustratos muy similar y, en base a la cantidad existente, suponen las formas más importantes de esta subfamilia. CYP3A4 está constitutivamente expresada en el hígado, yeyuno, colon, riñón y páncreas. Existe una gran variabilidad interindividual en la actividad enzimática que puede llegar a ser de hasta 40 veces [148]. El grado de expresión de CYP3A5 en hígado, riñón e intestino delgado, es globalmente

menor y de mayor variabilidad interindividual que CYP3A4 [89]. El significado funcional de los otros dos miembros de la subfamilia, CYP3A7 y CYP3A43, no se conoce aún con detalle. Parece que CYP3A7 tendría un papel importante sólo en la etapa fetal y CYP3A43 representa menos del 1% de la actividad de la subfamilia CYP3A, por lo que su contribución al metabolismo oxidativo sería mínimo [215].

Diversos estudios han establecido la importancia de P-gp y CYP3A en la disposición de los fármacos inhibidores de la calcineurina. En primer lugar, P-gp limita la absorción de estos fármacos mediante su transporte activo desde el interior del enterocito hacia la luz intestinal. Se ha demostrado que una baja expresión o actividad de P-gp en el intestino delgado implica un incremento en las concentraciones plasmáticas del fármaco en pacientes trasplantados de intestino [127], hígado [74][65] y riñón [122]. Además, diversos estudios han demostrado que el diferente grado de metabolización a nivel intestinal y hepática guarda relación con la variabilidad interindividual observada de los niveles plasmáticos de dichos fármacos [223]. El que la CsA se metabolice casi por completo en el hígado por el citocromo P-450 (CYP3A), explica la posibilidad de que se produzcan interacciones farmacológicas. Dada la frecuencia con que estos pacientes requieren tratamiento concomitante, las interacciones representan un problema clínico importante, debiendo intensificar la vigilancia del paciente y la monitorización de las concentraciones de CsA para evitar consecuencias tóxicas o de rechazo. En la siguiente tabla se muestran las interacciones más relevantes.

0.2.3.3. Farmacodinamia.

La CsA actúa como un profármaco que se activa al unirse a una proteína o receptor intracelular llamado genéricamente inmunofilina. Su unión inhibe la proliferación del linfocito T de la fase G0 a G1. El complejo fármaco-inmunofilina en el citoplasma de la célula se une a la calcineurina e inhibe su actividad fosfatasa. Ello bloquea las señales calcio dependientes que intervienen en la actividad del linfocito T. Su mayor receptor intracelular o inmunofilina es la

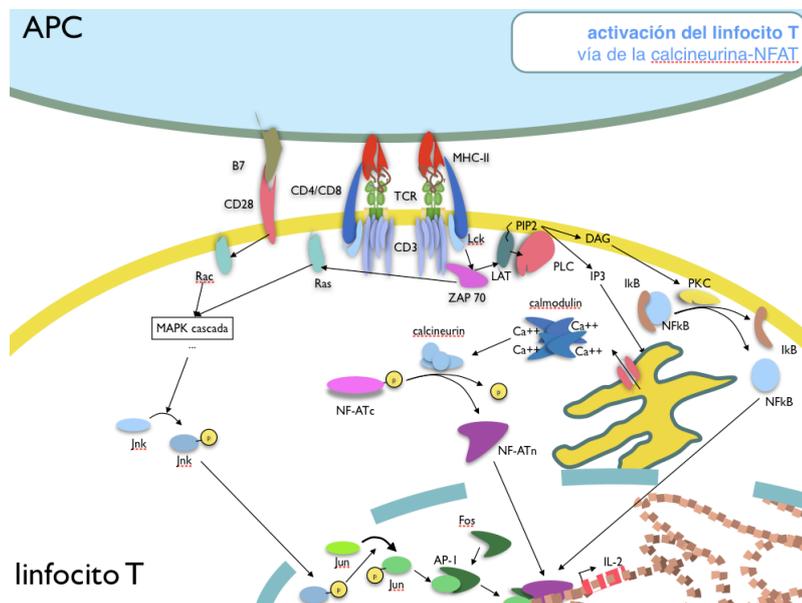


Figura 13: Activación del linfocito T. La señal originada en la superficie de la célula se transduce mediante una cascada de activación de proteínas a través de fosforilaciones/defosforilaciones y la acción de segundos mensajeros como el calcio, liberado al citosol desde el retículo endoplásmico. La activación de la calcineurina por la calmodulina unida a dicho calcio permite la activación de NF-AT. Éste se transloca al núcleo donde induce la transcripción de varios genes relacionados con la respuesta proinflamatoria, como la interleuquina 2.

ciclofilina, que es una enzima llamada peptidil-propil-isomerasa que cataliza la isomerización cis-trans de los puentes peptidil-propil de las proteínas.

Mecanismo de acción de la ciclosporina:

1. Inhibe la calcineurina:

- Ello impide la defosforilación de NFAT y su translocación al núcleo para iniciar la transcripción de citocinas, entre ellas la IL-2.

- Inhibe el factor de transcripción jun.

2. Bloquea la translocación de NF- κ B al núcleo. El NF- κ B se encuentra en el citoplasma del linfocito T inactivo asociado a su inhibidor I κ B. Cuando el linfocito se activa, el factor de transcripción NF- κ B se fosforila y se disocia de su inhibidor, lo que le permite su translocación al núcleo para activar la transcripción de citocinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, INF- γ , TNF- α y GM-CSF. La

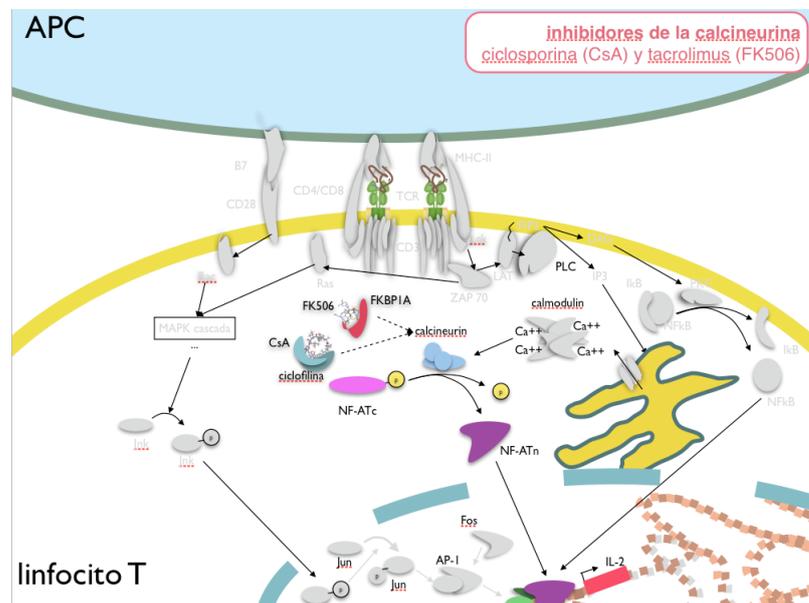


Figura 14: Ciclosporina (CsA) y Tacrolimus (FK506) son dos de los principales fármacos utilizados como inmunosupresores en el trasplante de órgano sólido. Tras unirse de forma específica a proteínas citosólicas actúan bloqueando la activación del linfocito T.

CsA bloquea la disociación $\text{NF-}\kappa\text{B} + \text{I}\kappa\text{B}$ porque inhibe kinasas que activan la disociación. Además este proceso lleva implícito el bloqueo de la expresión de IL-2R. No afecta la transcripción de IL-10.

3. Inhibe la apoptosis que sigue a la activación de los linfocitos T por:

- Inhibición de los factores de transcripción (NUR 77 y MEF 2) implicados en la apoptosis.

- Aumento de la síntesis de Bcl-2 (Un protooncogen fundamental en la progresión del ciclo de la célula).

4. Actúa sobre las señales dependientes de AMPc. Disminuye la actividad del AMPc dependiente de la proteína quinasa A y del AMPc sensible a proteínas de unión (CREB). Estas acciones pueden modular sus propiedades inmunosupresoras y sus efectos diabético y nefrotóxico.

5. Actúa sobre los receptores de los esteroides. Los receptores de esteroides no activados forman complejos con HSP. Las HSP están implicadas en actividades tales como el plegamiento de proteínas, acompañamiento molecular, carga de

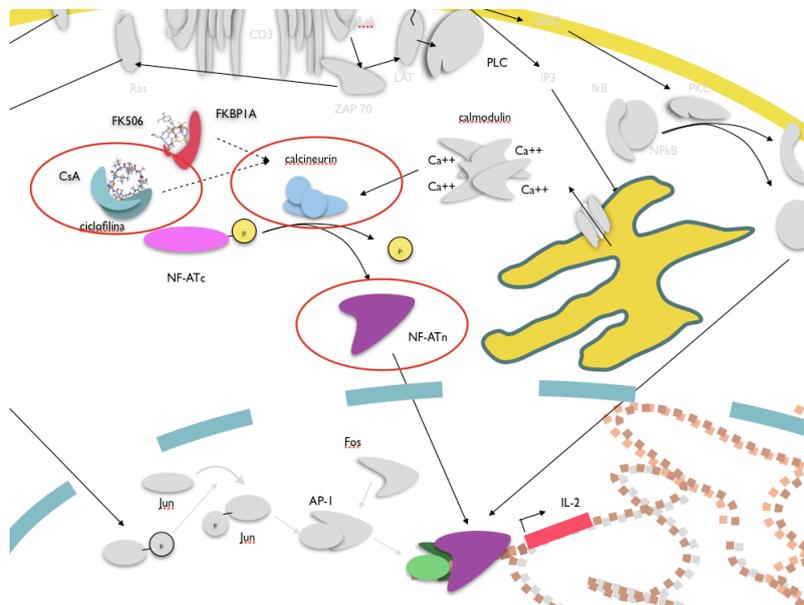


Figura 15: Ciclosporina tras unirse de forma específica a ciclofilina actúa bloqueando la acción que la calcineurina celular activada por calcio ejerce sobre las proteínas de la familia NFAT.

péptidos en las moléculas del CMH y en la translocación de proteínas al núcleo. La CsA se une al complejo formado por HPS90 y la ciclofilina 40 y ello activa a los receptores de los glucocorticoides.

6. Inhibe la bomba multidrug resistance o fenómeno MDR. Los mecanismos moleculares implicados son varios, pero el más importante es el que desempeña la glicoproteína P. Esta proteína está codificada por el gen *MDR1* que está relacionado con otros genes que codifican proteínas de transporte iónico. La glicoproteína P actúa como una bomba de flujo que expulsa sustancias hidrofóbicas del citoplasma celular. La CsA interfiere su función y expresión por inhibición competitiva, lo que produce un acumulo intracelular de metabolitos del fármaco.

7. La CsA aumenta la síntesis de TGF- β en linfocitos T y en las células endoteliales y renales.

0.2.4. Estudios farmacogenéticos en pacientes trasplantados cardíacos

Estudios sobre farmacogenética y farmacocinética

La influencia que tienen ciertos polimorfismos genéticos en la farmacocinética de CsA en pacientes trasplantados cardíacos está aún por dilucidar. La mayoría de estudios publicados son en pacientes trasplantados de riñón, aunque también se han publicado algunos trabajos en trasplante hepático y cardiaco.

En personas sanas, se ha observado que tanto el AUC como el aclaramiento oral de CsA se ven afectados por el polimorfismo CYP3A5*3. Resultados previos habían demostrado un efecto significativo del polimorfismo del intrón 3 de CYP3A5 sobre las concentraciones sanguíneas de CsA (datos similares a los encontrados previamente en pacientes trasplantados de riñón), mostrando que los portadores del alelo CYP3A5*3 requerían dosis menores para alcanzar los niveles terapéuticos que aquellos que tenían el alelo CYP3A5*1 [133]. Sin embargo, estos hallazgos no se han podido replicarse en otros estudios. De este modo, Hesselink y cols (2003) no encontraron diferencias significativas en la variabilidad farmacocinética de CsA (C₀, C₀/dosis) en relación a los polimorfismos CYP3A4*1B/*3, CYP3A5*3/*6 y MDR1 C3435T en 110 pacientes de raza blanca, negra y asiática trasplantados de riñón en fase estable (entre 3 a 12 meses tras la cirugía) [83].

El papel de los polimorfismos de MDR1 en la disposición de CsA es también una cuestión discutida. Por un lado muchos estudios, llevados a cabo en diferentes poblaciones de pacientes trasplantados, no han mostrado que exista un efecto diferente en función de los genotipos de C3435T o G2677(T/A) sobre los parámetros farmacocinéticos, incluso cuando se realizó un análisis por haplotipos [124]. Otro estudio, en un subgrupo de pacientes chinos trasplantados de corazón mostró que la mediana del AUC_{0-4h} era un 11 % menor en los portadores del genotipo CC respecto al TT al analizar C3435T [15]. Estos resultados también se vieron en pacientes trasplantados de hígado. Esto sugiere que los

portadores del alelo T tienen una menor actividad intestinal de P-gp [25].

Balram y cols. (2003) investigaron la relación de frecuencias de los genotipos de MDR1 C3435T en 290 voluntarios sanos de varias poblaciones asiáticas (chinos, malayos e indúes). En el mismo trabajo publicaron los resultados derivados del análisis de dichos genotipos en relación con el área bajo la curva abreviada (AUC0-4h), realizada a 10 pacientes chinos trasplantados de corazón en fase estable. Observaron que sólo la distribución de frecuencias genotípicas observada en la población indú era significativamente diferente a la malaya, y la población asiática, en su conjunto, diferente a la raza caucásica y la africana. Estos autores tampoco pudieron demostrar diferente comportamiento en la AUC0-4h de CsA en función del genotipo [15].

Chowbay y cols (2003) analizaron la relación de frecuencias de los genotipos de los polimorfismos de CYP3A4 (CYP3A4*1B, CYP3A4*4, CYP3A4*5, CYP3A4*6) y de MDR1 (C1236T, G2677T/A y C3435T) en 275 voluntarios sanos de varias poblaciones asiáticas (chinos, malayos e indúes). En este mismo estudio analizaron la relación de los haplotipos más frecuentes de los polimorfismos de MDR1 con varios parámetros farmacocinéticos (AUC0-4h, AUC0-12h, C_{max} y C_{min}) en 14 pacientes chinos trasplantados de corazón en fase estable. Encontraron que las variables polimórficas de CYP3A4 eran prácticamente ausentes en esta población y que el haplotipo TT-TT-TT frente a CC-GG-CC de los tres polimorfismos de MDR1 analizados se asociaba a mayores valores en los parámetros farmacocinéticos analizados [40].

Barnard y cols (2006) estudiaron el efecto de los polimorfismos MDR1 C3435T y G2677T/G, en 170 pacientes trasplantados de corazón sobre los niveles de CsA a los 3 y 12 meses y el tiempo libre de rechazo significativo ($>0 = 3A$) en el primer año. Observaron que los pacientes con genotipo TT de cualquiera de los dos genotipos tenían mayores valores medios de CsA ajustada por peso, así como un tiempo libre de rechazo mayor en el primer año [16].

Se han propuesto varias hipótesis para intentar explicar la disparidad de resultados. En primer lugar, los estudios se realizaron en poblaciones con diferente

origen étnico, lo que conlleva una variabilidad ambiental, como los hábitos alimentarios, o el efecto no explorado de otros factores genéticos y que también podrían influir en las diferencias farmacocinéticas encontradas. En segundo lugar, los estudios se realizaron en pacientes sometidos a diferente tipo de trasplante (renal, cardíaco, hepático), en momentos diferentes tras el trasplante y con diferente medicación concomitante (como los bloqueantes de los canales de calcio o los esteroides). En tercer lugar, se usaron diferentes parámetros farmacocinéticos (C0, C2, AUC, CL/F) y diferentes técnicas para medir las concentraciones sanguíneas del fármaco (HPLC-MS vs inmunoensayo). Y finalmente, puede que algunos estudios no tuvieran el suficiente poder estadístico, para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos.

0.2.5. Estrategias de biología computacional en la búsqueda de nuevas dianas para estudios farmacogenéticos

0.2.5.1. Variaciones genéticas

Aunque dos individuos no relacionados conservan una identidad del 99,9 % en la secuencia del ADN nuclear, el 0,1 % restante es importante ya que contiene las variantes genéticas que influyen en el diferente riesgo de desarrollar una enfermedad o en la respuesta a un medicamento. La variabilidad genética es un mecanismo natural del proceso selectivo que permite la variabilidad fenotípica de las especies. La aparición de variaciones en su secuencia puede aparecer en cualquier punto del genoma, aunque se ha observado que la probabilidad de que ocurra es variable de unas zonas a otras. Independientemente de si se produce en regiones génicas (codificantes o no) o intergénicas (regiones reguladoras), dicha modificación puede ocasionar tanto una alteración en la expresión de los genes como en la funcionalidad de sus productos.

Las variaciones génicas observadas en el genoma humano pasan desde grandes reorganizaciones génicas visibles microscópicamente a variaciones que afectan a un solo nucleótido. Sin embargo, los tipos de variaciones que se observa

con más frecuencia son los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) y las variaciones en el número de copias (CNV) de regiones genómicas.

SNP

Los SNPs son mutaciones génicas que conllevan el cambio de un nucleótido por otro en la secuencia del ADN. Se asume que dichos cambios son bialélicos, es decir, que sólo dos de los cuatro nucleótidos pueden encontrarse en dicha posición, y que el alelo menos frecuente está presente en más del 1% de la población.

Los efectos sobre la función celular que tienen los SNP dependen de la naturaleza de la variación y la región del genoma donde se produce. Diversos estudios sugieren que el 95% de los SNPs caen en regiones no codificantes del genoma. Cuando los SNPs se encuentran en las proximidades o en el interior de un gen, el efecto que pueden tener sobre la función del mismo es difícil de determinar. Pueden ocasionar una alteración en la función del ADN (modificación de la región promotora de un gen), del ARN (alteración del proceso de *splicing* alternativo, de la estructura secundaria del ARNm o la creación/destrucción de dianas de microARNs) o de las proteínas que codifica dicho gen (alteración de la secuencia de la proteína).

Cuando el SNP se encuentra en la región codificante de un gen se distinguen tres tipos de variaciones:

- 1) Silenciosa (*synonymous mutation*): si no origina cambio en la secuencia de aminoácidos;
- 2) No sinónima (*non-synonymous mutation*): si el cambio en el nucleótido del codón de ARNm origina un cambio en el aminoácido correspondiente;
- 3) Inserciones/delecciones (*frameshift mutation*): si se produce un desplazamiento en el marco de lectura dando lugar a la síntesis de una proteína defectuosa, generalmente con la aparición de inserciones o delecciones en la misma.

Una de las principales bases de datos de SNP es dbSNP alojada en el NCBI¹⁰.

¹⁰<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>

Actualmente contiene información validada sobre más de 10 millones de SNPs que han sido identificados en diferentes poblaciones humanas. En ella se puede consultar mediante una clave de identificación única (denominada dbSNP ID, más conocido como rs#) la ficha para cada SNP, donde se encuentra, entre otras, información acerca de su posición en el genoma, el cambio de nucleótidos originado, la naturaleza de dicho cambio y las frecuencias alélicas asociadas a cada nucleótido.

El modo de indentificar la presencia de variaciones genéticas en una especie es mediante el análisis de comparación de secuencias entre individuos de la misma especie. Precisamente el objetivo del proyecto HapMap, iniciado en 2002 en colaboración con científicos de Japón, Reino Unido, Canadá, China, Nigeria y Estados Unidos de América, ha sido desarrollar un mapa de los SNPs que hay en el genoma humano¹¹. Para ello se han secuenciado y comparado los genomas completos de 270 personas de estos países. De este modo se han podido localizar los SNPs y establecer sus frecuencias alélicas para cada una de estas poblaciones. Con esta información, existen varios métodos para determinar el genotipo de cada SNP, que incluyen PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*), RT-PCR (*real time-polymerase chain reaction*), pirosecuenciación, *primer extension analysis*, *oligonucleotide ligation assay*, *Taqman genotyping assay de ABI*, Molecular Inversion Probe assay de Affymetrix y *Golden Gate assay* de Illumina.

El método de PCR-RFLP se basa en la amplificación mediante PCR de una región del genoma que incluya el SNP que se quiere genotipar y el análisis del patrón de bandas obtenido al realizar una electroforesis en gel de la digestión mediante una enzima de restricción del producto obtenido en el paso anterior. Para ello son imprescindibles 2 requisitos: 1) que el producto de la PCR contenga, al menos, una diana para la enzima de restricción que se utilizará antes de realizar la electroforesis; 2) que la presencia de uno u otro alelo en el ADN analizado determine un cambio en el patrón de bandas tras la digestión con la

¹¹<http://www.hapmap.org>

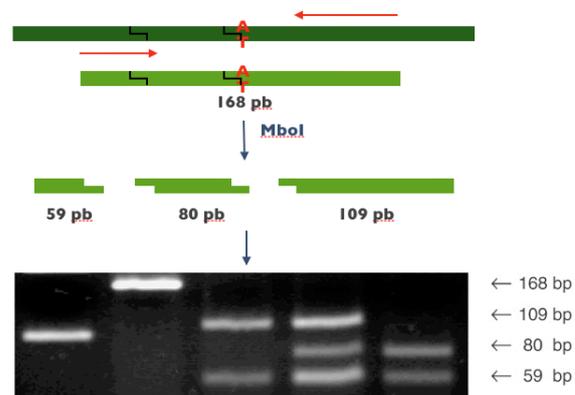


Figura 16: Esquema del proceso de genotipado mediante PCR-RFLP.

enzima de restricción (es decir, que, al menos una de las dianas de la enzima se modifique en función de si está presente un alelo u otro).

CNV

Recientemente se ha descrito en la especie humana la existencia de un gran número de variaciones submicroscópicas en el número de copias (inserciones, deleciones, duplicaciones y variantes complejas multisitio) de ciertos segmentos de ADN de Kb a Mb de tamaño[159]. A este tipo de variaciones se le denomina variaciones en el número de copias (CNV) y se diferencia de la 'grandes reorganizaciones cromosómicas' por el menor tamaño medio de los segmentos afectados. Las CNV pueden afectar también la expresión génica, de modo que constituyen otro mecanismo importante de variación fenotípica.

0.2.5.1 Redes de interacción proteína-proteína

Conceptos básicos: la teoría de Grafos

Los genes y sus productos interactúan en diferentes niveles [90]. A nivel genómico, los factores de transcripción pueden activar o inhibir la transcripción de genes, lo que origina ARNm. Debido a que estos factores de transcripción son en sí mismo producto de otros genes, el efecto último es que unos genes

regulan la expresión de otros como parte de una red de interacción reguladora de la expresión génica en una célula. De forma similar, las proteínas pueden participar en diversas interacciones postraduccionales que originen modificaciones funcionales de otras proteínas o la formación de complejos multiproteicos con una nueva función. A la totalidad de estas relaciones se le denomina red de interacción proteína-proteína. Un sistema de elementos que interaccionan o se regulan entre sí puede ser representado mediante un objeto matemático denominado grafo.

En matemáticas y ciencias de la computación, la Teoría de Grafos estudia las propiedades de los grafos. Los elementos del sistema que se quieren estudiar quedan representados en un grafo de forma simplificada mediante puntos (nodos) que quedan conectados por líneas (aristas). Las redes de interacciones entre proteínas también pueden representarse mediante grafos. En este caso, las proteínas estarán representadas por los nodos y las interacciones físicas que se producen entre ellas por las aristas. El grafo que representa la red de interacciones proteína-proteína de una célula se denomina interactoma. Tiene una estructura muy compleja, por lo que se hacen necesarios tratamientos computacionales para su análisis. Por todo ello es necesario que tengamos en consideración la Teoría de Grafos y algunas características propias de las redes de interacción de proteínas [126].

Parámetros para describir una red: - Los nodos de un grafo se pueden caracterizar por el número de aristas que tienen (o lo que es lo mismo, el número de otros nodos que conectan con éste)[3]. Esta propiedad se denomina grado del nodo. En las redes dirigidas se pueden distinguir para cada nodo un grado de salida y otro de entrada, según sean aristas que apuntan al nodo o que salen de él. En las redes no dirigidas, el grado k de un nodo n es el número de aristas conectadas al mismo.

- El análisis de la distribución de los grados de todos los nodos de una red permite describir la diversidad de grados existentes en una red. La **distribución**

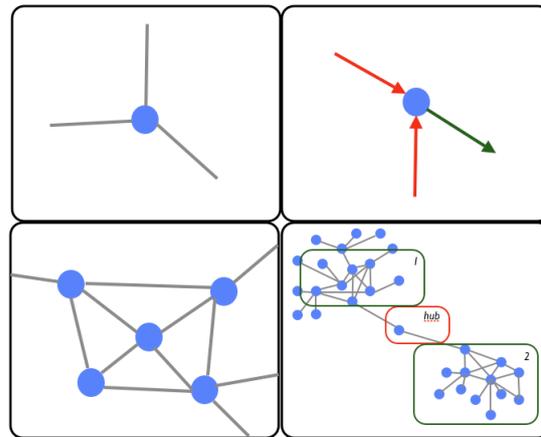


Figura 17: Grafos constituídos por nodos (azul) y aristas en una red dirigida (aristas de llegada: rojas y de salida: verdes) y en otra no dirigida. Se representa un cliqué (inferior izquierda) y dos módulos conectados por un hub (inferior derecha). En este último grafo se puede apreciar cómo la mayoría de nodos tienen un bajo grado de conectividad (periferia) cercanos a los nodos con un alto grado (constituyendo los módulos).

de grados de los nodos $P(x)$ representa la fracción de nodos que tienen un grado x y se obtienen contando el número de nodos $N(x)$ que tienen $k=1,2,3,4, \dots, k_i$ aristas y dividiéndolo todo por el número de nodos N . Los mapas de interacción proteína-proteína siguen una ley definida por la siguiente fórmula $P(x)=Ax^{-\gamma}$ donde A es una constante que asegura que el valor máximo de $P(x)$ sea 1 y el grado exponencial γ está normalmente en el rango de $2 < \gamma < 3$. Cuando se analiza esta función en diferentes redes de interacción proteína-proteína, se observa que las redes estudiadas poseen una gran heterogeneidad de grados de nodos, no existiendo ningún nodo característico en la red que pueda utilizarse como representativo del resto de nodos. Debido a la ausencia de un nodo representativo del conjunto (o típico de escala) se conoce a este tipo de redes como libres de escala. De este modo, la representación de la distribución de los grados de una red permite distinguir entre una topología de red aleatoria y otra libre de escala¹².

- La cohesión de los nodos vecinos de un nodo n se cuantifica habitualmente mediante el **coeficiente de clustering** C_i , donde k_n es el número de vecinos

¹²Scale-free networks

de n y e_n es el número de pares de nodos conectados entre todos los vecinos de n . Es una razón N/M donde N es el número de las aristas entre los vecinos de n y M es el máximo número de aristas que podrían existir entre los vecinos de n , de tal modo que el valor de C_n siempre está entre 0 y 1¹³[213]. En otras palabras, el *coeficiente de clustering* cuantifica lo cercano que está un conjunto de nodos vecinos de ser un *cliqué*¹⁴. Varias redes, incluidas las de interacción de proteínas y de metabolitos muestran en promedio altos coeficientes de *clustering*, lo que indica un alto nivel de redundancia y cohesión [211][220]. La distribución de coeficientes de clustering promedios proporciona la media de coeficientes de clustering para todos los nodos n con k vecinos siendo $k=2, \dots$. Varias medidas experimentales indican que se produce un descenso en $C(x)$ que sigue la fórmula $C(x)=B \cdot x^{-\beta}$ donde B es una constante y β está entre 1 y 2. Esto sugiere que los nodos de bajo grado tienden a tener nodos vecinos muy cohesionados entre sí y viceversa [158][220].

- Dos nodos están conectados en un grafo si una secuencia de nodos adyacentes los une (una **trayectoria**). La **longitud del camino más corto** entre dos nodos n y m es $L(n,m)$. La **distribución de las longitudes de los caminos más cortos** representa la frecuencia de parejas de nodos (n,m) con $L(n,m)=k_i$ para $k_i=0,1,2,3, \dots$. Esta propiedad caracteriza a casi todas las redes y está en relación con el concepto de robustez de la Biología de Sistemas [3]. El **diámetro de la red** es el valor máximo de los caminos más cortos entre dos nodos. El análisis tanto de la distribución de las longitudes de los caminos más cortos como del diámetro de la red pueden proporcionar propiedades de “pequeño-mundo” de la red analizada. En la mayoría de las redes existe una trayectoria relativamente corta entre dos nodos cualesquiera y su longitud guarda relación en orden logarítmico con el tamaño de la red.

-La **conectividad de un nodo** es el número de nodos vecinos. La conectividad de vecindario de un nodo n se define como la conectividad media de todos

¹³ $C_n = 2en / kn(kn - 1)$

¹⁴Un cliqué es una región del grafo (o subgrafo) en la que todos los nodos están conectados entre sí.

los vecinos de n . La distribución de la conectividad del vecindario proporciona el promedio de las conectividades de vecindario de todos los nodos n con k_i grados (vecinos), siendo $k_i = 0, 1, 2, \dots, i$

Interpretación desde la Biología de Sistemas de las propiedades de los grafos

Modularidad Del estudio de redes de interacción de proteínas se ha establecido una visión del funcionamiento celular organizado por módulos [51]. En esta visión modular, las proteínas se asocian de forma coordinada en distintos niveles de organización según requerimientos funcionales y se ha comprobado que determinan los mecanismos implicados en algunas enfermedades complejas [114][28]. Con los datos experimentales de interacción de proteínas y la Teoría de Grafos se han revelado asociaciones entre proteínas que trabajan de forma cooperativa para realizar una función [106, 105, 103, 104]. Esta unidad discreta funcional separable de otras unidades es lo que se conoce como módulos. Este módulo puede interaccionar con otros módulos. Se han empleado diversos métodos para identificar módulos funcionales en base a su localización física, la función de sus componentes o la topología de la red. El problema es que la modularidad no siempre supone subredes claramente delimitadas, sino que suelen producirse solapamientos y cruces entre ellas. En las redes modulares jerárquicas suele existir una distribución de grados heterogénea, así como una relación inversa entre el grado y el coeficiente de clustering [71][64].

"Hubs": robustez y fragilidad En las redes libre de escala, como son las redes de interacción proteína-proteína, la mayoría de los nodos son de bajo grado, pero también existen nodos que tienen un alto grado. Estos últimos, llamados "hubs", son fundamentales para conectar los diferentes módulos de una red. Debido a la heterogeneidad de las redes libres de escala, si eliminásemos al azar algún nodo de la red, no supondría una pérdida importante en la conectividad de dicha red (robustez). Sin embargo, si eliminásemos un "hubs", se produciría

la rotura de la red en diferentes "clusters"/módulos aislados (fragilidad). De este modo, la probabilidad de que un gen sea esencial (una alteración funcional origina un daño a la célula) guarda relación con el valor del grado que tiene la correspondiente proteína en una red de interacción proteína-proteína [94][166]. Así pues, la célula es vulnerable a la pérdida de "hubs" [69][63].

Redundancia Cualquier respuesta a una perturbación requiere que la información acerca de dicha perturbación se extienda a través de la red para asegurar una respuesta rápida. Por lo tanto, la longitud de las trayectoria más cortas de una red (su propiedad a pequeña escala) es una característica muy importante que asegura una rápida y eficiente reacción ante perturbaciones externas. Otra propiedad global importante en las trayectorias es la redundancia de trayectorias. Ésta define como la posibilidad de que existan diferentes trayectorias entre dos nodos. La redundancia de trayectorias permite el funcionamiento robusto del sistema [151]. La frecuencia de participación de nodos en trayectorias que conectan diferentes componentes se conoce como centralización. El estudio de la centralización de los nodos puede ser otra forma de identificar "hubs" importantes.

0.2.5.2 *Text mining y Literature mining*

El objetivo de la investigación en Biología está cambiando rápidamente desde el análisis de genes y proteínas individuales a los Sistemas Biológicos completos [57]. Para el investigador medio, ponerse a realizar una tarea de "literature mining" significa la búsqueda de una/s palabra/s clave en PubMed. Sin embargo, los métodos para extraer información biomédica de la literatura científica han mejorado considerablemente y las herramientas y estrategias que han aparecido recientemente en este campo pronto serán ampliamente usadas en muchos laboratorios para anotar y analizar de forma automática la gran cantidad de datos que se obtienen en los estudios experimentales a gran escala [92]. Debido al enorme cuerpo de material científico disponible, literature mining se ha convertido

también en una forma útil de generación de nuevas hipótesis y descubrimientos científicos [8][217]. Las herramientas existentes para realizar literature mining se basan en métodos que permiten identificar de forma automática las publicaciones relevantes en torno a una serie de términos/expresiones clave (proceso denominado recuperación de la información). Otros métodos utilizan el listado de publicaciones seleccionadas para identificar los elementos de interés biológico incluidos en el texto (reconocimiento de las entidades), como pueden ser los genes y las proteínas. Por último, existen otros métodos que permiten identificar la naturaleza y el sentido de las relaciones que vinculan dichas entidades (extracción de la información).

Recuperación de la información: encontrando los textos científicos

PubMed¹⁵ es una herramienta ampliamente usada desde hace años para la recuperación automatizada de información. Se trata de un sistema ad hoc que selecciona publicaciones a partir de segmentos de texto (artículos completos, abstracts, párrafos o frases) que contienen información relacionada con un tema determinado. Para ello utiliza una metodología basada en un *modelo booleano* o un modelo vectorial. El *modelo booleano* permite al usuario recuperar documentos que contienen ciertas combinaciones de términos relacionados con operaciones lógicas. El modelo vectorial representa cada documento como un vector de términos con diferentes pesos basados en la frecuencia de aparición en el texto. Estos vectores-documentos pueden ser comparados con el vector consultado en base a la importancia relativa de cada término. Este modelo es el que utiliza el sistema de búsqueda de artículos ‘relacionados’ de Pubmed [160][91]. La salida de una búsqueda con estas herramientas es un listado de documentos que el usuario puede consultar para realizar una revisión y análisis manual de la información en ellos contenida [189]. Algunas herramientas de recuperación de la información más avanzadas como MedMiner¹⁶ [195] y Textpresso¹⁷[140]

¹⁵<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

¹⁶<http://discover.nci.nih.gov/textmining/main.jsp>

¹⁷<http://www.textpresso.org/>

también utilizan métodos de reconocimiento de entidades para clasificar los documentos extraídos según las diferentes entidades que contienen [84].

Recuperación de la información

E-BioSci

EBIMed¹⁸Google Scholar¹⁹GoPubMed²⁰PubFinder²¹

MedMiner

PubFinder

PubMed

Textpresso

XplorMed²²

Reconocimiento de las entidades: identificando las moléculas El objetivo de los métodos para el reconocimiento de entidades es identificar aquellos términos o expresiones que hacen referencia a genes o proteínas en los textos científicos. Esta tarea habitualmente está dividida en dos. En primer lugar, es necesario reconocer las palabras que hacen referencia a entidades y, en segundo lugar, se procede a identificar de forma única como genes o proteínas las entidades en cuestión. Aunque puede parecer una labor sencilla, probablemente el proceso de reconocimiento de entidades sea lo más complicado en *text mining*. Constituye un requisito previo tanto para la extracción de información como para los métodos avanzados de recuperación de información. Para ello pueden utilizarse colecciones de genes y proteínas etiquetadas a partir de la literatura (*literature corpora*) o diccionarios de términos (alias y claves) para la identificación de genes y proteínas. Los principales problemas son la tasa de falsos positivos (casi siempre por confusión con otros términos lingüísticos en inglés o con términos que hacen referencia a procedimientos metodológico y técnicas) [38][117][56], así como por la *ambigüedad* de los distintos términos que hacen

referencia a una misma entidad [131][72]. Aunque el proceso de reconocimiento de entidades generalmente forma parte de las herramientas de recuperación y de extracción de la información, también existen herramientas como iHOP²³ (*Information Hyperlinked over proteins*) [84][85], una herramienta web que permite al usuario buscar oraciones de abstracts de Medline en base a entidades proteicas.

Extracción de la información: estableciendo la relaciones Los métodos de extracción de información tienen como finalidad identificar las relaciones existentes entre las entidades de un texto científico. Para ello se utilizan dos estrategias diferentes: la concurrencia y el análisis del lenguaje natural (*natural-language processing*). La concurrencia es la forma más sencilla de identificar entidades que concurren en diferentes textos científicos [49][2]. La premisa es que si dos entidades concurren de forma repetida en diferentes textos científicos, es probable que dichas entidades estén relacionadas [50, 156, 43]. Sin embargo, esta estrategia no permite conocer la naturaleza ni la dirección de dicha relación. Se trata de un método muy sensible, pero menos preciso que el análisis del lenguaje natural [182, 93, 204]. El análisis del lenguaje natural combina el análisis sintáctico y semántico para establecer la naturaleza y dirección de las relaciones entre entidades. El texto científico es sometido primero a la fragmentación en unidades gramaticales (*tokenización*) para posteriormente identificar los diferentes componentes de las frases y realizar su etiquetado (nombre, verbo, adjetivo, adverbio, etc). De este modo, para cada frase se construye un árbol que represente la relación de todos sus elementos sintácticos. Mediante el uso de literature corpora y de diccionarios, se asignan a cada entidad del árbol sintáctico las etiquetas semánticas adecuadas. Finalmente, a través un sistema de reglas se extrae información acerca de la naturaleza y la dirección de las relaciones existentes entre las entidades del árbol sintáctico [142, 43, 49]. Diferentes aplicaciones informáticas (denominadas *parsers*) permiten el análisis sintáctico

²³<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>

e interpretación semántica a partir de literature corpora como GENIA²⁴ [101] o PennBioIE²⁵ [56, 167].

Reconocimiento de las entidades

iProLINK²⁶JournalMine²⁷PreBIND²⁸PubGene²⁹

Este proceso de text mining permite crear hipótesis científicas y descubrir nuevas relaciones a partir de textos científicos usando estrategias basadas en literature mining [50, 46, 58, 200]. Podría parecer imposible, a simple vista, para una computadora realizar nuevos descubrimientos solamente en base a la información existente en la literatura científica, ya que los métodos de extracción de información sólo pueden extraer hallazgos ya publicados. El truco está en usar hallazgos de diferentes publicaciones (A lleva a B y B lleva a C) para inferir nuevas relaciones indirectas (A lleva a C) [190, 22]. Como la literatura es tan extensa, el investigador sólo puede leer una pequeña fracción, casi siempre relacionada con un área o unas pocas áreas científicas de su interés. De este modo es muy difícil que el investigador pueda identificar por sí solo este tipo de relaciones indirectas, especialmente si corresponden a dos áreas muy diferentes o si el número de artículos publicados sobre dicho tema sobrepasa la capacidad para su análisis [164, 73, 216].

0.2.5.3 Predicción de los efectos deletéreos de una sustitución nucleotídica sobre la proteína

La mayoría de las variantes genéticas se consideran neutrales aunque sustituciones de una sola base en la región génica o en su zona promotora pueden afectar la función o la expresión de su producto, la proteína. Una variación no sinónima o sin sentido es un cambio de una sola base en una región codificante

²⁴<http://www-tsujii.is.s.u-tokyo.ac.jp/GENIA/home/wiki.cgi>

²⁵http://bioie ldc.upenn.edu/publications/latest_release/

que causa un cambio en un aminoácido en la proteína correspondiente. Si una variación no sinónima altera la función de una proteína, dicho cambio puede tener una consecuencia drástica en el fenotipo.

La mayoría de las variaciones génicas son deletereas y son habitualmente eliminadas por la selección natural. Sin embargo, las mutaciones neutrales pueden permanecer en la población y hacerse fijas y, de este modo, contribuir a la diferenciación de las especies. La importancia de las sustituciones no sinónimas en humanos se ilustra en dos bases de datos que contienen variaciones génicas causantes de enfermedades como son Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)³⁰[70] y Human Gene Mutation Database (HGMD)³¹ [181]. En ambas bases de datos, los cambios no sinónimos suponen aproximadamente la mitad de todos los cambios génicos que se conocen como causa de enfermedad. Se estima que la población humana tiene 67.000-200.000 SNP no sinónimos (nsSNP) en común y que cada persona sea heterocigota para 24.000-40.000 de ellos. Consumiría mucho tiempo, esfuerzo y recursos caracterizar experimentalmente el impacto de cada nsSNP en la función de las proteínas correspondientes. Basado en que el cambio en un aminoácido puede tener un gran impacto en la salud, cualquier método que predijese si la sustitución de un aminoácido puede afectar la función de una proteína podría ser de utilidad para los investigadores que podrían así priorizar sobre qué nsSNP realizar estudios experimentales complementarios.

Se ha observado que las mutaciones que originan enfermedad es más probable que se sitúen en regiones altamente conservadas desde el punto de vista evolutivo, lo que apoya que el método de predicción debería estar basado en la homología de secuencias [134, 185, 135]. También se ha observado que los aminoácidos que originan enfermedad tienen características estructurales comunes que los distinguen de aquellos que aparecen en las sustituciones neutras, lo que sugiere que los aspectos estructurales deben tenerse en cuenta también [209]. Desde que se establecieron estas premisas, se han desarrollado una serie de apli-

³⁰<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

³¹<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

Aplicación	Interfaz	Características	Algoritmo
SIFT	Entrada: Secuencia de proteínas y AAS o alineamiento de secuencias de proteínas y AAS o identificador dbSNP (rs#) o identificador de proteína. Salida: Puntuación en rango de 0 (daño) a 1 (neutral).	Valor predictivo positivo: 60% FP: 20% FN: 31% dbSNP: 25% deletéreos	Utiliza homología de secuencias para calcular la puntuación en base a matrices de puntuación específicas e posición con Dirichlet priors
PolyPhen	Entrada: Secuencia de proteínas y AAS o identificador dbSNP (rs#) o identificador de proteína o identificador HGvBASE Salida: Puntuación en rango de 0 (neutral) a cualquier cifra mayor de 0 (cuanto mayor, más probable efecto deletéreo).	Valor predictivo positivo: 80% FP: 9% FN: 31% dbSNP: 32% deletéreos	Utiliza homología de secuencias, análisis estructural y la anotación de SWISS-PROT
SNPs3D	Entrada: Identificador dbSNP (rs#) o identificador de proteína o <i>literature mining</i> o Gene Ontology Salida: Se muestra la puntuación del análisis de homología de secuencias y la puntuación estructural de forma separada, siendo potencialmente deletéreas puntuaciones < 0.	<i>Puntuación basada en secuencia:</i> Valor predictivo positivo: 71% FP: 10% FN: 20% <i>Puntuación basada en estructura:</i> Valor predictivo positivo: 14% FP: 20% FN: 31% dbSNP: 25% deletéreos	El método basado en Máquinas Vectoriales (SVM) utiliza 5 parámetros para la predicción por homología de secuencias y 15 parámetros para la predicción por análisis estructural
PANTHER PSEC	Entrada: Secuencia de proteínas y AAS Salida: Puntuación en rango negativo (deletéreo), 0 (neutral) o positivo (aumento de función).	Valor predictivo positivo: 40% FP: NA FN: 60% dbSNP: 9% deletéreos	Utiliza homología de secuencias calculando las puntuaciones en base a familias de modelos ocultos de Markov (HMM) de PANTHER
PMUT	Entrada: Identificador de proteína o secuencia de proteínas o alineamiento múltiple de secuencias de proteínas. Salida: Puntuación en rango de 0 (neutral) a 1 (efecto deletéreo).	FP: 17% FN: 21% Cuando se incluyen información estructural: FP: 10% FN: 12%	El método basado en una o dos redes neuronales utiliza parámetros de análisis de secuencias y estructural procedentes de bases de datos internas.
TopoSNP	Entrada: Identificador de proteína o secuencia de proteínas Salida: Se muestra de forma independiente el resultado del análisis de conservación de secuencia y la localización estructural.	FP: NA FN: 12% dbSNP: 68% deletéreos	Utiliza alineamientos basados en Pfam y localiza la mutación en la superficie o en un pocket de la estructura de la proteína.

Figura 18: Aplicaciones y servicios web para la predicción de alteración de la función proteica de polimorfismos genéticos.

caciones y servicios web basados en diversos métodos de predicción que realizan el análisis de secuencias y/o estructuras.

Dichos métodos utilizan información de la secuencia y/o estructural. La predicción es posible porque las mutaciones que afectan a la función de las proteínas tienden a ocurrir en lugares evolutivamente conservados y ocultos en la estructura de la proteína. Estas observaciones proceden de diferentes estudios previos que analizaron los aminoácidos causantes de enfermedades genéticas en individuos determinados. Estos estudios asumían que estas sustituciones afectaban la función de la proteína y de ese modo se producía la enfermedad. También asumían que la mayoría de los nsSNPs en el ser humano o las sustituciones observadas entre el ser humano y especies estrechamente relacionadas son funcionalmente neutrales.

Cuando Wang et al. [212] modelaron mutaciones causantes de enfermedad en el interior de las correspondientes proteínas silvestres, encontraron que en el

83 % de casos se producía una alteración de la estabilidad proteica. Al aplicar el criterio de estabilidad y otros diferentes criterios estructurales, fueron capaces de detectar el 90 % de las mutaciones causantes de enfermedad. En contraste, sólo el 30 % de los nsSNP neutrales fueron detectados con el mismo conjunto de reglas, lo que sugirió que éstas podrían ser utilizadas para distinguir entre mutaciones causantes de enfermedad y variaciones genéticas de carácter neutro. Mediante el uso de criterios de secuencia y estructurales, Sunyaev et al. [188] pudieron detectar el 70 % de las mutaciones causantes de enfermedad y sólo el 17 % de la sustituciones neutrales.

Basados en estas observaciones, se han desarrollado diferentes métodos de predicción que utilizan información de la secuencia aminoacídica, información estructural y/o de la anotación en las bases de datos para dichas proteínas. Los algoritmos pueden ser *Vector Support Machine*, Redes Neuronales o *Hidden Markov Models* (HMM). Los métodos que aceptan una secuencia de aminoácidos realizan una búsqueda de secuencia homólogas en una base de datos. Posteriormente se efectúa un alineamiento múltiple con la secuencia problema y todas las secuencias homólogas encontradas, mostrando las posiciones más conservadas evolutivamente, infiriendo que dichas posiciones son importantes para la función de la proteína. Entonces, se genera una matriz de sustituciones que permite puntuar la sustitución de cada aminoácido en cada posición, lo que se traduce en probabilidad de que dicha sustitución suponga una alteración funcional en la proteína. Si el aminoácido problema no está presente en las secuencia homólogas la predicción se establece en base al grado de tolerancia fisicoquímica según las propiedades presentes en el resto de aminoácidos presentes en el alineamiento. Por ejemplo, si un alineamiento muestra tirosinas y triptófanos en una región determinada en la proteína, se esperaría que la sustitución de cualquiera de ellos por otro aminoácido también aromático como la fenilalanina sería bien tolerada. La probabilidad de observar un aminoácido particular en una posición puede estimarse desde un modelo apropiado de conservación proteica y las sustituciones que son poco probables de ser observadas en un lugar

determinado se espera que reduzcan la estabilidad proteica o su función. Los métodos de predicción basados en el análisis de la estructura proteica toman como entrada la secuencia aminoacídica y encuentran el mejor resultado frente a una base de datos estructural. Entonces, se examina el efecto de la sustitución del aminoácido sobre parámetros como accesibilidad del solvente, densidad de carbonos beta, el factor cristalográfico B y la diferencia de energía libre de la estructura nueva y la antigua. Basado en dicho análisis, estos métodos permiten establecer unas reglas para llegar a la predicción.

Por último, cualquiera de los métodos anteriores pueden incorporar anotaciones para mejorar la predicción. Las fichas de cada proteína que hay recogidas en la base de datos Swiss-Prot contienen información sobre la posición de los aminoácidos que forman parte del centro activo de las proteínas, los que están implicados en la unión al ligando, los que forman puentes disulfuro o los relacionados directamente con otros tipos de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo si un aminoácido forma parte del sitio de unión a un ligando, esta información puede incorporarse al valor de puntuación resultante del análisis de la secuencia y estructura.

0.3. Hipótesis

Se ha comprobado que polimorfismos en los genes que codifican la P-glicoproteína y las isoenzimas del CYP3A guardan relación con la farmacocinética de CsA ya que se asocian a variaciones de sus concentraciones sanguíneas basales y de sus parámetros cinéticos. Podría ser que el análisis de la presencia de dichos SNPs en estos genes permitiese relacionar esta variabilidad en el comportamiento farmacocinético y el riesgo de rechazo a largo plazo. Hasta la fecha se han publicado resultados de numerosos estudios farmacogenéticos relacionados con la farmacocinética (MDR1, CYP3A4, CYP3A5) de los inhibidores de la calcineurina, sin embargo no existe ningún trabajo publicado que analice la influencia de SNP de genes cuyas proteínas pueden estar implicadas en la farmacodinamia de dichos fármacos. La Biología Computacional aborda el tratamiento y el análisis de grandes cantidades de datos biológicos mediante el uso de procedimientos, métodos y sistemas basados en las tecnologías de la informática. Dado que no existen aún evidencias experimentales, podrían utilizarse métodos basados en aplicaciones de Biología Computacional para intentar seleccionar una serie de SNPs de genes que codifican proteínas relacionadas con las rutas metabólicas implicadas en los mecanismos de acción de la CsA y que pudieran predecir una posible afectación funcional/estructural.

0.4. Objetivos

1.-Objetivo principal: Determinar el papel de los polimorfismos de nucleótido único MDR1 3435G>A, CYP3A4 -290A>G (CYP3A4*1B/*1) y CYP3A5 6986A>G (CYP3A5*1/*3) en la variabilidad interindividual en el comportamiento farmacocinético y en la tasa de rechazo agudo durante el primer año, en pacientes adultos sometidos a un primer trasplante cardíaco.

2.-Objetivos secundarios:

2.1.- Analizar si existen diferencias en los parámetros clínicos, farmacocinéticos y farmacogenéticos en función de la existencia o no de rechazo agudo tras un mes, tres meses y un año del trasplante.

2.2.- Realizar un análisis de los factores que condicionan el tiempo libre de rechazo y elaborar un modelo estadístico que, teniendo en cuenta los factores clínicos, farmacocinéticos y farmacogenéticos analizados, permita predecir las posibilidades de rechazo tras un mes, tres meses y un año del trasplante.

2.3.-Aplicar una estrategia de Biología Computacional para seleccionar SNPs en genes que codifican proteínas relacionadas con las rutas implicadas en la farmacodinamia de CsA analizando después la influencia que tiene cada SNP sobre la aparición de rechazo agudo precoz en nuestra población.

0.5. Diseño y metodología

0.5.1. Características de los pacientes y protocolo de trasplante

Estudio clínico de tipo descriptivo retrospectivo. Como candidatos para entrar en el estudio se consideraron todos los pacientes en el programa de trasplante cardíaco del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba desde enero de 2000 a mayo de 2007 con los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión:

- (a) Pacientes sometidos a un primer trasplante ortotópico de corazón.
- (b) Adultos (mayores de 16 años).
- (c) CsA como tratamiento inmunosupresor.
- (d) Pacientes sin complicaciones mayores durante o después del procedimiento quirúrgico³².

2.-Criterios de exclusión:

- (a) Fallo multiorgánico.
- (b) Trasplante multiorgánico.
- (c) Retirada de la medicación inmunosupresora.
- (d) Pacientes que murieron dentro de los 7 días postrasplante.

Se registraron los siguientes datos sociodemográficos, antropométricos, clínicos y biológicos de la historia clínica de cada paciente, con especial atención a los eventos clínicos y a la medicación concomitante³³ que recibieron durante la primera semana tras la cirugía.

1. Datos sociodemográficos del receptor:

³²Se consideraron complicaciones menores que no se consideraron criterio de exclusión, aunque sí de obligado registro:

- i. Bajo gasto cardíaco.
- ii. Hemorragia y/o transfusión.
- iii. Reintervención.
- iv. Ventilación mecánica prolongada.
- v. Medicación por sonda nasogástrica.
- vi. Medicación por vía endovenosa.

³³Especialmente medicamentos que pueden interaccionar con los inhibidores de la calcineurina como bloqueantes de los canales de calcio (diltiazem, nicardipino, verapamilo), antiepilépticos (fenitoína y carbamazepina), antimicóticos (fluconazol y ketoconazol) o antibióticos macrólidos (eritromicina y claritromicina) y quinolonas (ciprofloxacino).

(a) Fecha de nacimiento

(b) Género

(c) Raza o etnia

2. Datos antropométricos del receptor:

(a) Peso (kg)

(b) Talla (cm)

3. Antecedentes medicoquirúrgicos del receptor:

(a) Antecedentes medico-quirúrgicos³⁴.

(b) Factores de riesgo cardiovascular³⁵.

(c) Hábito tabáquico³⁶.

4. Enfermedad cardiovascular del receptor:

(a) Enfermedad que motivó el trasplante.

(b) Grado de disnea según la NYHA³⁷.

(c) Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) (%).

(d) Antecedentes de cirugía cardiovascular previa, enfermedad vascular periférica, asistencia circulatoria con balón de contrapulsación aórtica o portador de desfibrilador automático implantable (DAI)

(e) Presencia de disfunción renal³⁸.

(f) Presencia de anticuerpos anticitotóxicos.

(g) Tratamiento previo al trasplante con fármacos ionotrópos.

5. Datos del donante:

(a) Edad.

(b) Género.

(c) Peso (Kg).

(d) Grupo sanguíneo del sistema AB0.

(e) Talla (cm).

³⁴Infección o neoplasia

³⁵Especialmente antecedentes de hiperuricemia, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o diabetes mellitus

³⁶No fumador o exfumador de >10 años; b) Exfumador de 1-10 años; c) Fumador en el último año

³⁷Grado I (sin disnea), II (disnea con grandes esfuerzos), III (disnea con moderados-leves esfuerzos) ó IV (disnea de reposo)

³⁸Creatinina plasmática mayor a 2 mg/dl

- (f) Causa de muerte.
 - (g) Uso de aminas (dopamina, adrenalina, noradrenalina) en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).
 - (h) Días en UCI.
6. Datos del trasplante:
- (a) Fecha del trasplante.
 - (b) Código del trasplante (electivo o urgente).
 - (c) Tiempo de isquemia fría (minutos).
 - (d) Tiempo de circulación extracorpórea (CEC) (minutos).
 - (e) Complicaciones intraoperatorias.
7. Datos postrasplante:
- (a) Administración o no de tratamiento de inducción (ATG, BAS).
 - (b) Esquema terapéutico con inmunosupresores (MMF, AZA, SIR, EVE, y corticoides)³⁹.
 - (c) Registro de medicación concomitante no inmunosupresora en la primera semana postrasplante ⁴⁰.
 - (d) Diagnóstico de infecciones oportunistas.
 - (e) Valor máximo de creatinina durante el primer mes.
 - (f) Registro de complicaciones (neurológicas, digestivas, óseas y renales).
 - (g) Diagnóstico de novo de hiperuricemia, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o diabetes mellitus tras el trasplante.

0.5.2. Tratamiento inmunosupresor

Todos los pacientes recibieron tratamiento con CsA junto a corticoides, MMF o AZA y EVE o SRL, asociado o no a tratamiento inductor con BAS o ATGAM. La CsA se comenzó en las primeras 24h siguientes al trasplante a dosis de 4mg/kg/d (dividida en dos dosis). Después, la dosis fue ajustada para alcanzar

³⁹Se recogieron las dosis y concentración (en los fármacos susceptibles de monitorización) de estos fármacos en la primera semana

⁴⁰Especialmente la que suponía riesgo mayor de interaccionar con CsA

un rango terapéutico recomendado para la C0 de 200-400 ng/ml el mes 1, 200-300 ng/ml los meses 2 y 3, 150-250 ng/ml desde el mes 4 al 6, y 100-200 ng/ml desde el mes 6 al 12.

La pauta de corticoides fue de 500-1000 mg de metilprednisolona IV intraoperatorios, seguidos de 125 mg IV x 3 dosis en las primeras 24 h postoperatorias. Posteriormente se continuó con deflazacort P.O. a dosis de 0,2-0,3 mg/kg/d el primer mes, de 0,15-0,2 mg/kg/d hasta el tercer mes, de 0,1-0,2 mg/kg/d hasta el sexto mes y de 0,05 mg/kg/d hasta el fin del primer año postrasplante. La azatioprina (AZA) se inició con una dosis de 1,5 mg/kg/d, que posteriormente fue ajustada en función de la existencia de toxicidad medular, que era evaluada mediante realización de análisis periódico del hemograma. Cuando se administró MMF, se inició con una dosis de 1g dos veces al día cada 12 horas, siendo ajustada mediante monitorización periódica para mantener una concentración mínima en sangre de ácido micofenólico (MPA) entre 2,5-4,5 µg/mL. Los pacientes en tratamiento con EVE recibieron, tan pronto como fue posible tras el trasplante, una dosis inicial de 0,75 mg, dos veces al día. Después, la dosis fue ajustada mediante monitorización periódica para alcanzar un rango terapéutico recomendado de 3-8 ng/mL. En el caso de SIR la dosis de inducción fue de 6 mg, seguida de 2 mg una vez al día. La dosis se individualizó para obtener niveles valle en sangre total de 4 a 12 ng/mL.

La dosis total estándar de basiliximab fue de 40 mg, administrada vía IV en dos dosis de 20 mg, la primera durante las dos horas previas al trasplante y la segunda 4 días después. A los pacientes en los que se usó ATG, se administró a unas dosis de 10-15 mg/kg/d IV cada 8h durante 3-14 días.

El tratamiento habitual del rechazo agudo significativo consistió en 4 dosis diarias de 250mg de metilprednisolona vía IV durante 3 días. Cuando se produjeron más de 3 episodios de rechazo significativo se añadía al continuaba este tratamiento con 1 mg/kg de prednisona oral, que luego lentamente se disminuiría hasta dejar una dosis de mantenimiento de 0'05 mg/Kg/d. En pacientes con inestabilidad hemodinámica o episodios de rechazo agudo refractarios a los

glucocorticoides, se inició tratamiento de rescate con globulina antitimocito o inmunoglobulinas mono/policlonales.

0.5.3. Seguimiento clínico y farmacoterapéutico

Después del alta hospitalaria, los pacientes se revisaron en las consultas externas del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Reina Sofía. Las visitas se programaron mensualmente durante los primeros 6 meses y cada 3 meses hasta el final del primer año. En las mismas se evaluaron los signos y síntomas del paciente, realizando una exploración física general y valorando los resultados del análisis del hemograma, de la función hepática, de la función renal, de los niveles en sangre de fármacos inmunosupresores y de las exploraciones ecocardiográficas. Con dichos datos se valoraba la modificación del tratamiento o, en el caso de que existiera sospecha clínica de rechazo agudo, la indicación de una nueva BEM que se sumaba a las establecidas por protocolo.

0.5.4. Genotipado de los polimorfismos genéticos de nucleótido único

0.5.4.1. Aislamiento de ADN

El ADN se extrajo a partir de 10 mL de sangre recogida en tubos de EDTA (1mg/dL) como anticoagulante. Posteriormente se centrifugaron (2500 rpm, 20°C, 15 min) en una centrífuga Beckman modelo J-6 (BeckmanTM Coulter España S.A, España) para separar la capa de leucocitos. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación. La extracción de DNA genómico se hizo a través del kit *Purificación DNA genómico* (Dominion MBLTM, Córdoba, España). El protocolo incluye los siguientes pasos: lisis, precipitación de proteínas, precipitación alcohólica del DNA, lavado e hidratación. Se obtuvo un rendimiento de 3-6 µg de DNA/200µL de sangre total con una pureza aproximada de 1,8 en la relación de absorbancia UV 260nm/280nm. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría UV/V con *NanoDrop*

1000 (Termo™ Scientific, Boston, EEUU). Además se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% para verificar la calidad del DNA.

0.5.4.2. Genotipado de MDR1 (ABCB1) 3435G>A

La determinación del genotipo del SNP 3435G>A (rs1045642) de MDR1 (ABCB1) se realizó mediante RFLP utilizando para la PCR 300 ng de ADN genómico, 0,2 µL de *Taq polimerasa* 5 U/µL (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 µL de PCR Buffer 10x sin Mg²⁺ (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 µL de MgCl₂ 25 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 µL de dNTPs 2 mM (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 µL (15 pmol/µL) de cada cebador (Fw: 5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GGC AAA-3' y Rev: 5'-GGT AAC AAC TAA CCC AAA CAG GA-3') (Isogen Life Bioscience B.V, Maarsse, Holanda), todo ello en un volumen final de 20 µL de H₂O. La PCR se realizó con el termociclador FTGENE2D (Techne Duxford, Cambridge, UK), de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturizado a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturización (94°C, 35 s), otra de alineamiento (56°C, 35 s) y finalmente una de elongación (72°C, 40 s), con una extensión final de 7 min a 72°C. A continuación, 10 µL del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 10 U de la enzima de restricción *Mbo I* y 2 µL 10x Buffer R (Fermentas, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 µL durante 16h a 37°C. Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturizante de agarosa al 2%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta Gel Printer Plus (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A, Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos TT (390pb), CT (390pb+230pb+160pb) y CC (230pb+160pb).

0.5.4.3. Genotipado de CYP3A4 -290A>G

La determinación del genotipo del SNP -290A>G (rs11539969) de la región promotora de CYP3A4 se realizó mediante RFLP utilizando para la PCR 300

ng de ADN genómico, 0,2 μL de *Taq polimerasa* 5 U/ μL (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 μL de PCR Buffer 10X sin Mg^{2+} (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de MgCl_2 25 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de dNTPs 2 mM (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μL (15 pmol/ μL) de cada cebador (Fw: 5'- GGA ATG AGG ACA GCC ATA GAG ACA AGG GGA -3' y Rev: 5'- CCT TTC AGC TCT GTG TTG CTC TTT GCT G-3') (Isogen Life Bioscience B.V., Maarssen, Holanda), todo ello en un volumen final de 20 μL de H_2O . La PCR se realizó con el termociclador FTGENE2D (Techne Duxford, Cambridge, UK), de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturalizado a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturalización (94°C, 35 s), otra de alineamiento (59°C, 35 s) y finalmente una de elongación (72°C, 40 s), con una extensión final de 7 min a 72°C. A continuación, 10 μL del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 5U de la enzima de restricción *Mbo II* y 2 μL 10x Buffer B (Fermentas, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 μL , durante 16h a 37°C. Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturalizante de agarosa al 4%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta Gel Printer Plus (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos GG (210pb + 175pb), GA (210pb + 175 pb + 169 pb + 41pb) y AA (175pb + 169pb + 41pb).

0.5.4.4. Genotipado de CYP3A5 6986A>G

La determinación del genotipo del SNP 6986A>G (rs776746) en el intrón 3 de CYP3A5 se realizó mediante RFLP utilizando para la PCR 300ng de ADN genómico, 0,2 μL de *Taq polimerasa* 5 U/ μL (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 μL de PCR Buffer 10X sin Mg^{2+} (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de MgCl_2 25 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de dNTPs 2 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 μL de Buffer Mbl-Y Enhacer 10X (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μL (15 pmol/ μL) de cada cebador (Fw:

5'- CAA TTT TTC ACT GAC CTC ATA TTC T -3' y Rev: 5'- TGC GTT CCG AAG TAT ACT ACT ACC CAT TAC ACC AGG TTT GTC CCT TCT TTA T-3') (Isogen Life Bioscience B.V., Maarssen, Holanda), todo ello en un volumen final de 20 μ L de H₂O. En el diseño de los cebadores se realizaron una serie de modificaciones en la secuencia de modo que en Fw se cambió un nucleótido para eliminar el sitio de reconocimiento natural de *Ssp I* y en Rev se generaba un sitio de corte para dicha enzima si R=A. La PCR se realizó con el termociclador FTGENE2D (Techne Duxford, Cambridge, UK), de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturalizado a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturalización (94°C, 35 s), otra de alineamiento (52°C, 35 s) y finalmente una de elongación (72°C, 40 s), seguida de la extensión final de 7 min a 72°C. A continuación, 10 μ L del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 10 U de la enzima de restricción *SspI* y 2 μ L 10X Buffer G (Fermentas, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 μ L, durante 16h a 37°C. Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturalizante de agarosa al 2%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta Gel Printer Plus (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos AA (167pb + 50pb), AG (217pb + 167pb + 50pb) y GG (217 pb).

0.5.4.5. Genotipado de PPIA 4C>A

La determinación del genotipo del SNP 4C>A (rs11539969) de PPIA, se realizó mediante RFLP utilizando para la PCR 300ng de ADN genómico, 0,2 μ L de Taq polimerasa 5 U/. μ L (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 μ L de PCR Buffer 10X sin Mg²⁺ (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μ L de MgCl₂ 25 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μ L de dNTPs 2 mM (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μ L (15 pmol/ μ L) de cada cebador (Fw: 5'-AAG TCG CAG ACC CGA TTG-3' y Rev: 5'-ACT TTC TGG GCC CCA TTC-3') (Isogen Life Bioscience B.V., Maarssen, Holanda), todo ello en un volumen final

de 20 μL de H_2O . La PCR se realizó con el termociclador FTGENE2D (Techne Duxford, Cambridge, UK), de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturalizado a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturalización (94°C , 35 s), otra de alineamiento (52°C , 35 s) y finalmente una de elongación (72°C , 40 s), seguida de la extensión final de 7 min a 72°C . A continuación, 10 μL del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 10 U de la enzima de restricción *Dra III* y 2 μL 10X Buffer G (Fermentas, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 μL , durante 16h a 37°C . Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturalizante de agarosa al 2%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta Gel Printer Plus (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos CC (250 pb), CA (250 pb + 152pb + 98pb) y AA (152pb + 98pb).

0.5.4.6. Genotipado de NFATC1 751G>C

La determinación del genotipo del SNP 751G>C (rs754093) de NFATC1 se realizó mediante RFLP utilizando para la PCR 300ng de ADN genómico, 0,2 μL de *Taq polimerasa* 5 U/ μL (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 μL de PCR Buffer 10X sin Mg^{2+} (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de MgCl_2 25 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de dNTPs 2 mM (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μL (15 pmol/ μL) de cada cebador (Fw: 5'-TTT TTC CTT CTC ACA GTT CCA AT-3' y Rev: 5-GAG AAA GGT CGT GGA GCT TG-3) (Isogen Life Bioscience B.V., Maarsse, Holanda), todo ello en un volumen final de 20 μL de H_2O . La PCR se realizó con el termociclador FTGENE2D (Techne Duxford, Cambridge, UK), de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturalizado a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturalización (94°C , 35 s), otra de alineamiento (62°C , 35 s) y finalmente una de elongación (72°C , 40 s), seguida de la extensión final de 7 min a 72°C . A continuación, 10 μL del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 10 U de la enzima

de restricción *Ava II* y 2 μL 10x Buffer R (Fermentas, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 μL , durante 16h a 37°C. Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturizante de agarosa al 2%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta Gel Printer Plus (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos GG (70pb + 66pb + 10pb), GT (171pb + 105pb + 70pb + 66pb) y TT (171pb + 70pb).

0.5.4.7. Genotipado de PRKCZ 268G>C

La determinación del genotipo del SNP PRKCZ 268G>C (rs9629827) se realizó mediante RFLP utilizando para la PCR 300 ng de ADN genómico, 0,2 μL de *Taq polimerasa* 5 U/ μL (Dominion MBL, Córdoba, España), 2 μL de PCR Buffer 10X sin Mg^{2+} (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de MgCl_2 25 mM (Dominion MBL, Córdoba, España), 1,6 μL de dNTPs 2 mM (Dominion MBL, Córdoba, España) y 1 μL (15 pmol/ μL) de cada cebador (Fw: 5'-ACT CGG TGA TGG CTG TGT G-3' y Rev: 5'-GTA CGC TTT GCA TGG CAC T-3') (Isogen Life Bioscience B.V., Maarssen, Holanda), todo ello en un volumen final de 20 μL de H_2O . La PCR se realizó con el termociclador FTGENE2D (Techne Duxford, Cambridge, UK), de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturizado a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturización (94°C, 35 s), otra de alineamiento (58°C, 35 s) y finalmente una de elongación (72°C, 40 s), seguida de la extensión final de 7 min a 72°C. A continuación, 10 μL del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 10 U de la enzima de restricción *Taq I* y 2 μL 10x Buffer *Taq I* (Fermentas, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 μL , durante 16h a 65°C. Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturizante de agarosa al 2%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta Gel Printer Plus (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos GG (269pb), GC (269pb + 172pb + 97pb) y CC (172pb + 97pb).

0.5.5. Análisis farmacocinético

0.5.5.1. Extracción de muestras

La determinación se realizó en sangre total, utilizando EDTA como anticoagulante. Para la determinación de la concentración mínima (C0), la extracción se realizó dentro de la hora previa a la dosis matinal de CsA. Para la determinación de la concentración C2, la extracción se realizó 2 horas después de la dosis de la mañana de CsA. Se registraron los niveles C0 y C2 de los días 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, y de los meses 3, 6, 9 y 12 postrasplante, además de las medias ponderadas de cada periodo. Para el cálculo del AUC 0-12h, los tiempos de extracción fueron 0'5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas tras la dosis matutina de CsA. Se realizaron una vez que el fármaco alcanzó el estado de equilibrio estacionario (una vez pasados 3 días sin precisar ajuste de dosis) en las 2 primeras semanas post-trasplante, sin sobrepasar el primer mes.

0.5.5.2. Determinación analítica de los fármacos

La concentración de CsA en sangre se determinó por inmunoensayo de fluorescencia polarizada FPIA-AxSYM (Abbott Diagnostic, Abbott Park, IL, USA). La concentración plasmática de MMF se determinaron mediante enzimoimmunoensayo (EMIT, Dade Behring Inc., Cupertino, CA, USA). Se realizó un inmunoensayo de fluorescencia polarizada FPIA-TDX/FLX (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) para determinar la concentración plasmática de EVE. La concentración en sangre de SRL se determinó por enzima inmunoensayo de micropartículas MEIA/IMX (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).

0.5.5.3. Parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos que se consideraron para el análisis fueron: C0 (ng/mL)=concentración pre-dosis y C2 (ng/mL)=concentración a las 2 horas de la dosis.

AUC_{0-12h} (ng.h/mL)=área de concentración bajo la curva entre las 0 y 12

horas de la dosis⁴¹.

C_{ss} (ng/mL)= concentración media en estado de equilibrio (calculada como AUC_{0-12h} /intervalo de dosificación).

C_{max} (ng/mL)=concentración máxima observada.

T_{max} (h)=tiempo en alcanzar la máxima concentración observada.

C_{min} (ng./mL)=media de la concentración plasmática al comienzo y al final del intervalo (C_0 y C_{12}).

0.5.6. Diagnóstico histológico de rechazo agudo

Como variable principal se evaluó la incidencia de episodios de rechazo agudo postrasplante. Para ello se realizó de forma protocolizada y/o cuando existía alta sospecha clínica de rechazo agudo una biopsia endomiocárdica (BEM) los días +14, +21 y +28 posttrasplante. Posteriormente cada 2 semanas durante 2 meses, luego cada mes durante 3 meses y, finalmente, cada 2 meses hasta el final del primer año. La sospecha clínica de rechazo agudo se estableció cuando se comprobó en la ecocardiografía una fracción de eyección menor al 50 %, hipokinnesia septal, derrame pericárdico y/o una medida de presión arterial media menor a 65 mmHg asociada a náuseas, debilidad y/o dolor torácico o abdominal. El rechazo agudo significativo se definió histológicamente como aquel que tiene un grado 3A o mayor según los criterios de la ISHLT [21].

0.5.7. Herramientas de Biología Computacional

Utilizando la información existente en Biomolecular Interaction Network Database (BIND)⁴² se confeccionó una red de interacción proteína-proteína (PPI) de 2 niveles, que tenía como núcleo las familias de proteínas con relación más estrecha con la farmacodinamia de CsA. Se utilizó Information Hyperlinked over Proteins (iHOP)⁴³, en base a referencias bibliográficas, para la extracción automática de nuevas interacciones y de asociación de otras proteínas con nuestra red

⁴¹El cálculo del AUC, se realizó por la regla trapezoidal (análisis no compartimental)

⁴²<http://www.bind.ca/>

⁴³<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>

inicial de PPI. Se utilizó el plugin NetworkAnalyzer de la aplicación Cytoscape 2.6.0⁴⁴ para analizar la topología de dicha red e identificar las principales proteínas conectoras (hubs). Con estas últimas y el sistema BioMart⁴⁵, se elaboró una lista de SNPs candidatos localizados en región codificante, no sinónimos y con una frecuencia alélica en HapMap mayor de 0.2 para raza caucásica. La aplicación PolyPhen⁴⁶ se utilizó para realizar predicciones sobre posible afectación funcional de cada SNP seleccionado sobre la correspondiente proteína. Para el genotipado de los polimorfismos se utilizaron dos aplicaciones web: NEBCutter⁴⁷ para identificar la enzimas de restricción con dianas en el sitio polimórfico y Primer3⁴⁸ para el diseño de los cebadores utilizados en la PCR.

0.5.8. Aspectos éticos

El estudio se ha realizado respetando los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina (1997), en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos (1997), así como cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. El proyecto fue sometido a evaluación por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía. Todos los pacientes fueron informados acerca del estudio y se les solicitó el consentimiento informado escrito antes de entrar en el mismo.

0.5.9. Procesamiento de los datos y análisis estadístico

La variable principal del estudio fue la incidencia de rechazo agudo significativo en el primer mes, tercer mes y tras un año de la fecha del trasplante. Otras variables estudiadas recogían los datos demográficos y antropométricos,

⁴⁴<http://www.cytoscape.org/>

⁴⁵<http://www.biomart.org/>

⁴⁶<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

⁴⁷<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

⁴⁸<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

antecedentes clínicos y la situación de la enfermedad cardíaca de la población, los aspectos más relevantes sobre el donante y el periodo peritrasplante (cirugía y tiempo en UCI, las principales complicaciones relacionadas con la medicación inmunosupresora, los parámetros cinéticos de CsA y los genotipos para los diferentes SNPs seleccionados. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) para los donantes y los receptores mediante la fórmula peso/talla² (kg/m²), así como el tiempo libre de rechazo al mes, a los tres meses y al año y el tiempo en alcanzar los rangos terapéuticos recomendados en el primer mes para C0 (tC0) y C2 (tC2). Se normalizaron por la dosis (D) y el peso correspondientes a cada paciente los valores de C0 (C0/D, C0/D /peso) y C2 (C2/D, C2/D/peso) y AUC_{0-12h} (AUC_{0-12h}/D, AUC_{0-12h}/D/peso). Los nombres de todas las variables y sus respectivos valores para los 67 pacientes se almacenaron en un archivo de texto con formato tabulado por comas (.csv).

Los parámetros estadísticos utilizados para describir la centralidad y dispersión de los datos fueron la frecuencia relativa (frecuencia absoluta) seguidas del (valor mínimo y máximo) para las variables categóricas y la media aritmética ± desviación estándar de la media (valor mínimo y máximo) para las variables cuantitativas. Para analizar diferencias estadísticamente significativas entre dos o más grupos de variables categóricas se utilizó el test de χ^2 y para las variables cuantitativas se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de uno o más factores seguido del test HSD de Tukey para comparaciones múltiples. Previamente se realizaron análisis para ver si dichas variables cumplían las hipótesis de normalidad (mediante gráficas QQ y el Test de normalidad de Shapiro-Wilk), de semejanza de las varianzas u homocedasticidad (mediante el test de Barlett) y de independencia o no colinealidad. Cuando no cumplían estos criterios, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Aquellas variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas se incluyeron en un modelo de regresión lineal logística que permitiera predecir de la aparición o no de rechazo significativo en el periodo estudiado. Se realizó un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para analizar diferencias en el tiempo libre de rechazo agudo

en función de las concentraciones medias de CsA en la primera semana y en función del genotipo de cada uno de los polimorfismos. Se construyó una curva ROC para determinar la concentración de CsA que permitiese discriminar con mayor sensibilidad y especificidad el grupo de pacientes con mayor frecuencia de riesgo de rechazo agudo. Para comprobar si las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó un análisis de bondad de ajuste mediante un test de χ^2 con el paquete HardyWeinberg implementado para R⁴⁹. Los contrastes de hipótesis se realizaron asumiendo un error tipo II de 0,8. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas, permitiendo rechazar la hipótesis de trabajo, si el valor de p era igual o menor de 0,05 (error tipo I).

Los valores de las diferentes variables se procesaron y analizaron con diversos paquetes de CRAN⁵⁰ para R (GNU, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA), un lenguaje y entorno de software libre para el análisis estadístico y gráfico⁵¹. Para las búsqueda bibliográfica en MEDLINE se utilizó Entrez de PubMed, los gestores bibliográficos Papers[®] 1.8 (Mekentos[™], Aalsmeer, The Netherlands) y Bibdesk v. 1.3.17⁵² (GNU, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA) y el editor de texto L^AT_EX 1.5.5⁵³ (GNU, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA).

⁴⁹<http://pbil.univ-lyon1.fr/library/genetics/html/HWE.test.html>

⁵⁰<http://cran.es.r-project.org/>

⁵¹<http://www.r-project.org/index.html>

⁵²<http://bibdesk.sourceforge.net/>

⁵³<ftp.lyx.org>

0.6. Resultados

0.6.1. Características de la población estudiada.

0.6.1.1. Características demográficas y clínicas

Se incluyeron en el estudio un total de 67 pacientes de origen caucásico (51 hombres y 16 mujeres) que tenían una edad media de 46 ± 12 años (16-68) cuando fueron sometidos a un trasplante cardiaco ortotópico en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba) (**tabla 1**). Todos habían sido seguidos en la consulta externa del Servicio de Cardiología, al menos, un año postrasplante. El peso medio fue de $72,21 \pm 14$ Kg y el índice de masa corporal (IMC) medio de $24,84 \pm 4,60$ Kg/m². Tan sólo el 26,8 % de los pacientes nunca había fumado o eran exfumadores desde hacía más 10 años y un 6,1 % eran fumadores hasta la fecha del trasplante. Los factores de riesgo cardiovascular más frecuentes fueron la hipercolesterolemia (28,3 %), la hipertensión arterial (20,8 %), la diabetes mellitus (16,4 %) y la hipertrigliceridemia (4,5 %). La presencia de anticuerpos citotóxicos se demostró en 7 casos, mientras que 4 pacientes habían tenido una neoplasia previa y 4 una infección meses antes del trasplante.

0.6.1.2. Enfermedad cardíaca del receptor

La patología más frecuente que motivó la indicación de trasplante fue la miocardiopatía dilatada idiopática (46,3 %) seguida por la cardiopatía dilatada isquémica (28,4 %) (**tabla 2**). La mayoría de los pacientes llegaban al trasplante en una situación avanzada de la insuficiencia cardíaca, correspondiente a un grado NYHA superior a III (88 %) y un valor de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) de $24,9 \% \pm 12,2$. La hipertensión pulmonar y la enfermedad arterial periférica estaban presentes en el 15 % y 2,9 % de los casos, respectivamente. En el periodo de permanencia en lista de espera, el 25,4 % de los pacientes había recibido tratamiento con amiodarona, un 8,9 % había sido sometido a cirugía cardiovascular, el 13,4 % necesitaron de un sistema de soporte cardiovascular (DAI) y el 5,9 % el uso de balón de contrapulsación aórtico. Por

último, el 31,4% de los pacientes estaban en tratamiento con ionotropos días antes del trasplante.

0.6.1.3. Características de los donantes

En la **tabla 3** se puede ver que los donantes fueron en su mayoría hombres (85%) jóvenes (31 ± 11 años) que habían fallecido tras permanecer en UCI de 0 a 10 días ($3,11 \pm 2,78$) después de sufrir un traumatismo craneoencefálico por accidente de tráfico (38,9%) o una hemorragia cerebral espontánea (20,9%). El peso osciló entre 50-95 Kg con valores correspondientes de IMC de $25,69 \pm 3,70$ Kg/m². El grupo sanguíneo ABO más frecuente fue el O (46,2%). Un 64,3% de los donantes recibieron en la UCI tratamiento con ionotropos (noradrenalina, dobutamina o dopamina).

0.6.1.4. Cirugía y tratamiento inmunosupresor

El tiempo de isquemia fría del injerto fue $209,2 \pm 54,3$ min y el tiempo de circulación extracorpórea del receptor fue $114,6 \pm 27,9$ min. En 10 casos el trasplante se realizó de forma urgente (codigo "0"). Se utilizó tratamiento de inducción con anticuerpos antilinfocitarios en 33 casos (28 BAS y 5 ATG). En el periodo postrasplante todos los pacientes estuvieron en tratamiento con corticoides y CsA asociados a otros fármacos inmunosupresores en diferentes combinaciones, siendo el esquema más utilizado el de CsA+MPA (**tabla 4**).

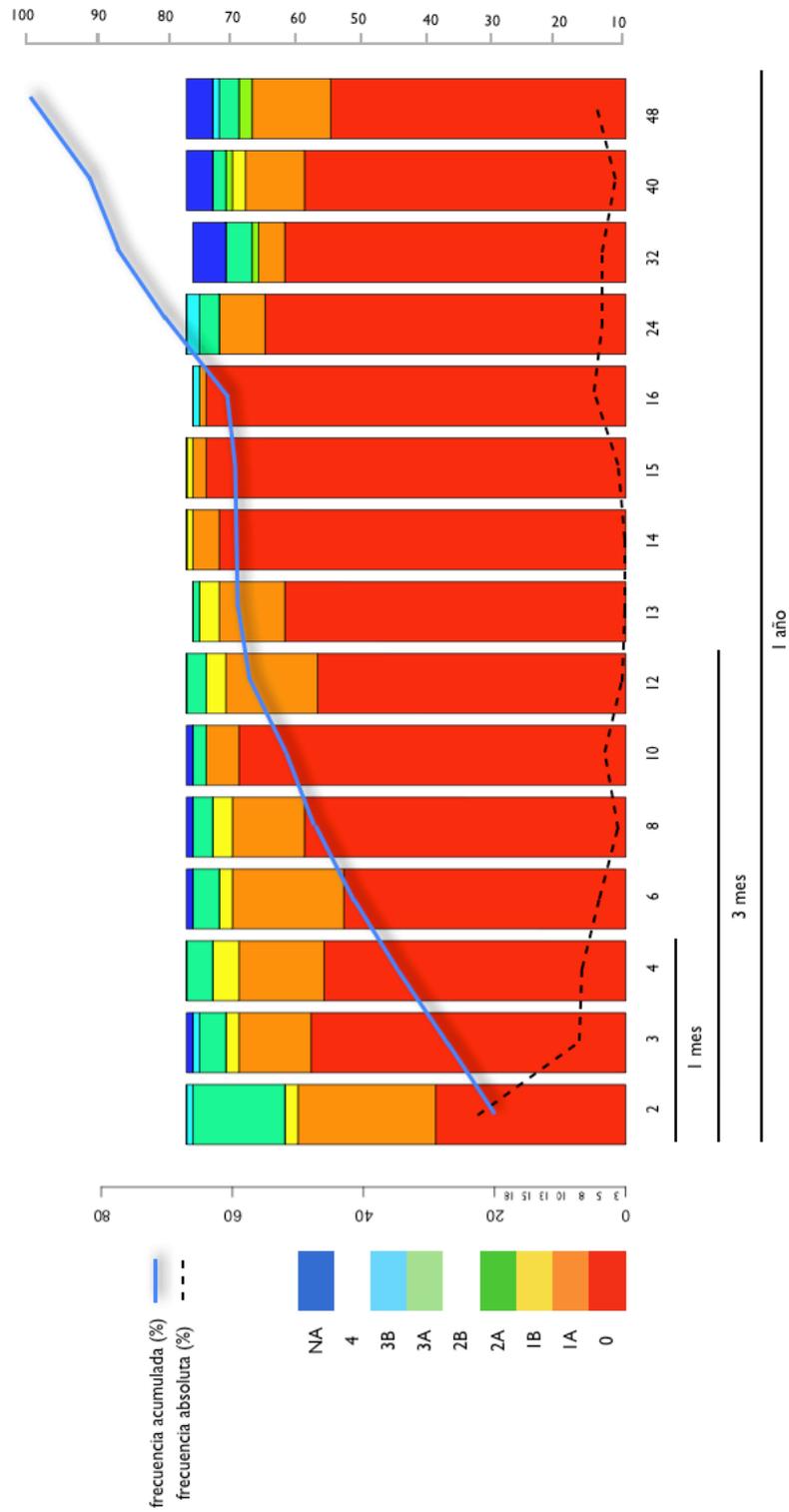
0.6.1.5. Complicaciones no inmunológicas postrasplante

Como se puede ver en la **tabla 5** infecciones fueron las complicaciones postrasplante más frecuentes, siendo 43 pacientes (64,1%) los que presentaron algún episodio de infección (bacteriana, viral o fúngica) en el primer mes. La hipercolesterolemia fue la enfermedad metabólica que con mayor frecuencia apareció de novo en los pacientes trasplantados (37,3%) durante el año de seguimiento. Otras complicaciones fueron el desarrollo de hipertensión arterial (37,3%), complicaciones neurológicas (19,4%), renales (19,4%) y digestivas (11,9%).

0.6.2. Características de la población estudiada en función de la presencia o no de rechazo significativo.

0.6.2.1. Frecuencia de rechazo significativo en la población de estudio

En el primer año postrasplante se realizaron 656 BEM, de las cuales, 53 se llevaron a cabo fuera del protocolo establecido ante la sospecha clínica de rechazo agudo. La incidencia de rechazo agudo significativo fue de 31,3% (21) al mes, 40,3% (27) a los tres meses y 55,2% (37) al año del trasplante. De los 37 pacientes que habían presentado algún rechazo significativo en el primer año postrasplante, 8 pacientes (21,6%) sufrieron dos episodios y 4 pacientes (10,8%) tres episodios de rechazo en este periodo. La gráfica siguiente muestra la distribución de frecuencias relativas en cada mes para los diferentes grados histológicos (histogramas), así como la frecuencia relativa de rechazo significativo (3A+3B+4 del ISHTL) en cada mes (línea discontinua) y su valor acumulado (línea continua) en el primer año postrasplante.



0.6.2.2. Rechazo significativo en el primer mes postrasplante

En la **tabla 1** se muestran las características demográficas y clínicas de la población en función de la presencia o no de rechazo $\geq 3A$ ISHTL en el primer mes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el género, la edad ni en los parámetros antropométricos entre los pacientes que sufrieron algún rechazo significativo en este periodo en comparación con los que no lo presentaron. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos de pacientes cuando se analizaron los factores de riesgo cardiovascular, la presencia de anticuerpos citotóxicos y los antecedentes de tumores o infecciones previas al trasplante.

Las variables relacionadas con la cardiopatía previa al trasplante se muestran en la **tabla 2**. Los valores de la FEVI (%) en los receptores antes del trasplante fue significativamente menor en el grupo de pacientes que había presentado al menos un rechazo $\geq 3A$ durante el primer mes en comparación con los que no lo presentaron ($p=0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al analizar el tipo de cardiopatía y los antecedentes de hipertensión pulmonar, enfermedad arterial periférica y de cirugía cardiovascular, así como el uso de amiodarona, DAI, balón de contrapulsación aórtico o inotropos previo al trasplante.

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características de los donantes ni en las variables relacionadas con la cirugía y el esquema de tratamiento inmunosupresor al comparar los pacientes que sufrieron algún rechazo significativo en el primer mes con los que no lo presentaron (**tablas 3 y 4**).

Por último, se observó que las complicaciones neurológicas fueron mucho más frecuentes en el grupo de pacientes libres de rechazo agudo significativos en el primer mes en comparación con los que sí lo presentaron en este periodo ($p=0,038$). El resto de complicaciones postrasplante tuvieron una distribución similar entre ambos grupos (**tabla 5**).

0.6.2.3. Rechazo significativo en los primeros tres meses postrasplante

Aunque , como ocurría también en el primer mes, se mantiene la tendencia de una mayor edad media en el grupo que sufrió rechazo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar las características demográficas y clínicas del receptor, la cirugía, el esquema inmunosupresor utilizado ni las complicaciones postrasplante, en función de la presencia o no de rechazo significativo (**tablas 6, 7, 9 y 10**). Tan sólo la frecuencia de donantes portadores del grupo sanguíneo A fue significativamente mayor entre los pacientes libres de rechazo agudo durante los tres primeros meses postrasplante en comparación con el grupo de pacientes que sufrieron algún rechazo en este periodo ($p=0,023$) (**tabla 8**).

0.6.2.4. Rechazo significativo en el primer año postrasplante

Las **tablas 10-15** muestran las características de la población estudiada en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer año. Se observó que la edad media del donante era significativamente menor en el grupo de pacientes libres de rechazo en el primer año del trasplante cardíaco ($p=0,037$) (**tabla 13**). Por otro lado, la hemorragia cerebral fue la principal causa de muerte del donante en el grupo de pacientes que presentaron algún rechazo significativo durante el primer año postrasplante en comparación con el otro grupo libre de rechazo en este periodo, en el que la causa más frecuente de muerte de los donantes fue el traumatismo craneoencefálico por accidente de tráfico ($p=0,026$) (**tabla 13**). El diagnóstico de novo de hipercolesterolemia fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que presentaron un rechazo agudo significativo ($p=0,049$), resultado acorde con las tendencias observadas al mes y a los tres meses postrasplante (**tabla 15**). No se observaron diferencias significativas para el resto de variables analizadas en este periodo.

Tabla 1.-Características demográficas de la población en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer mes.

		TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1 ^{er} mes (n=21)	BEM <3A ISTHL 1 ^{er} mes (n=46)	P
Características antropométricas	género	76,1%(51)	77,3%(17)	73,4%(34)	1 ¹
	hombre	22,9%(16)	26,7%(4)	26,6%(12)	
	mujer	46±12(16-68)	48±12(26-68)	44,9±12(16-54)	0.3001
	edad (años)	72,21±14,41(44-123)	75,71±11,79(51-97)	70,5±15,48(44-123)	0.1408
	peso (Kg)	24,84±4,60(14,9-37,1)	25,73±4,44(17,4-34,8)	24,40±4,95(14,9-37,1)	0.2744
Antecedentes personales	IMC (Kg.m-2)				
	Tabaquismo	No fumador o exfumador >10 años	31,9%(6)	26%(12)	0.2133
		Exfumador hace 1-10 años	13,6%(3)	19,5%(9)	
	Fumador en el último año	9,1%(2)	4,3%(2)		
	NA's	49,2%(33)	45,4%(10)	50,2%(23)	
	Hipertensión arterial	SÍ/NO/ NA's	22,7%(5)/66,2%(14)/9,1%(2)	19,5%(9)/71,8%(33)/8,7%(4)	0.9102
	Diabetes mellitus	SÍ/NO/ NA's	16,4%(11)/76,1%(51)/7,5%(5)	13,3%(5)/80%(36)/8,7%(4)	0.2236
	Hipercolesterolemia	SÍ/NO/ NA's	28,3%(19)/68,8%(46)/2,9%(2)	21,7%(10)/73,9%(34)/4,3%(2)	0.1517
	Hipertiglicidemia	SÍ/NO/ NA's	4,5%(3)/41,8%(29)/53,7%(36)	9,5%(2)/42,9%(9)/47,6%(10)	0.3752
	Hiperuricemia	SÍ/NO/ NA's	17,9%(12)/77,6%(52)/4,5%(3)	14,2%(3)/81,1%(17)/4,7%(1)	0.872
	Anticuerpos citotóxicos (+)	SÍ/NO/ NA's	11,9%(7)/79,1%(54)/9%(6)	8,7%(4)/80,4%(37)/10,8%(5)	0.5968
	Neoplasia	SÍ/NO/ NA's	6%(4)/89,5%(60)/4,5%(3)	8,6%(4)/87,1%(40)/4,3%(2)	0.3787
	Infección	SÍ/NO/ NA's	6%(4)/88%(59)/6%(4)	4,3%(2)/89,2%(41)/6,5%(3)	0.6904

1 Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

Tabla 2.-Características de la enfermedad cardíaca del receptor en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer mes.

Enfermedad cardiovascular	cardiopatía	Miocardopatía dilatada idiopática	Cardiopatía dilatada isquémica	Cardiopatía isquémica	Miocardopatía hipertrófica	Miocardopatía restrictiva	Valvulopatía	Cardiopatía congénita	grado funcional (NYHA)	FEVI (%)	hipertensión pulmonar	enfermedad arterial periférica	uso de amiodarona	cirugía cardiovascular	DAI	balón de contrapulsación	inotropos	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1er mes (n=21)	BEM <3A ISTHL 1er mes (n=46)	p
																		46,3%(31)	47,8%(10)	46%(21)	
																		28,4%(19)	33,4%(7)	26%(12)	
																		7,5%(5)	9,4%(2)	6,5%(3)	
																		2,9%(2)	4,7%(1)	2,1%(1)	0.2212
																		7,5%(5)	0	10,8%(5)	
																		2,9%(2)	0	4,3%(2)	
																		7,5%(3)	4,7%(1)	4,3%(2)	
																		0	0	0	
																		7,5%(5)	4,7%(1)	8,7%(4)	
																		47,7%(32)	57,2%(12)	43,5%(20)	0.7443
																		40,3%(27)	33,4%(7)	43,5%(20)	
																		4,5%(3)	4,7%(1)	4,3%(2)	
																		24,9±12,2(10-65)	21,4±6,5(10-38)	26,4±13,65(10-65)	0.051
																		15%(10)/76,1%(51)/8,9%(6)	19%(4)/76,3%(16)/4,7%(1)	17,4%(8)/76%(35)/10,8%(5)	0.7386
																		2,9%(2)/92,6%(62)/4,5%(3)	9,4%(2)/85,9%(18)/4,7%(1)	0/95,7%(44)/4,3%(2)	0.1033
																		25,4%(17)/65,7%(44)/8,9%(6)	33,4%(7)/57,2%(12)/9,4%(2)	21,8%(10)/69,5%(32)/8,7%(4)	0.573
																		8,9%(6)/82,2%(56)/8,9%(6)	4,7%(1)/90,6%(19)/4,7%(1)	10,8%(5)/80,4%(37)/10,8%(5)	0.5017
																		13,4%(9)/77,7%(53)/8,9%(6)	14,1%(3)/85,9%(18)/0	13,2%(6)/76,2%(35)/8,6%(4)	0.370
																		5,9%(4)/82,2%(56)/11,9%(7)	9,4%(2)/81,2%(17)/9,4%(2)	4,3%(2)/84,9(39)/10,8%(5)	0.7056
																		31,4%(21)/65,7%(44)/2,9%(2)	33,4%(7)/66,6%(14)/0	30,4%(14)/65,3%(30)/4,3%(2)	0.6199

Tabla 3.-Características del donante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer mes.

Donante	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1er mes (n=21)	BEM <3A ISTHL 1er mes (n=46)	P
género				
hombre	85%(57)	90,4%(19)	82,7%(38)	
mujer	7,5%(5)	9,6%(2)	6,5%(3)	0.2778
NA's	7,5%(5)	0	10,8%(5)	
edad (años)	31±11(13-58)	32,6±12(13-54)	31,9±11,1(14-58)	0.6874
peso (Kg)	78,02±10,74(50-95)	76,10±10,25(50-95)	79,05±10,98(52-95)	0.3048
IMC (Kg.m-2)	25,69±3,70(17-40)	25,60±3,74(17-33)	25,7±3,72(19-40)	0.8897
sistema ABO				
O	46,2%(31)	61,9%(13)	39,2%(18)	
A	34,3%(23)	23,8%(5)	39,2%(18)	
B	10,5%(7)	14,3%(3)	8,6%(4)	0.1232
AB	0	0	0	
NA's	6,2%(6)	0	13%(6)	
causa de muerte				
Hemorragia cerebral	20,9%(14)	23,9%(5)	19,5%(9)	
Infarto cerebral isquémico	11,9%(8)	14,3%(3)	10,8%(5)	
Otras cerebrovasculares	5,9%(4)	4,7%(1)	6,5%(3)	0.9806
TCE tráfico	38,9%(26)	33,4%(7)	41,6%(19)	
Otras	11,9%(8)	14,3%(3)	10,8%(5)	
NA's	10,44%(7)	9,4%(2)	10,8%(5)	
inotropos				
Si	64,3%(43)	61,9%(13)	65,3%(30)	
NO	26,8%(18)	33,4%(7)	23,9%(11)	0.5765
NA's	8,9%(6)	4,7%(1)	10,8%(5)	
días en UCI	3,11±2,78(0-10)	3,45±3,10(0-10)	2,95±2,69(0-9)	0.5345

Tabla 4.-Características del trasplante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer mes.

	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1er mes (n=21)	BEM <3A ISTHL 1er mes (n=46)	P
Cirugía				
Año de trasplante				
2000	13,4%(9)	21,6%(5)	8,6%(4)	
2001	4,5%(3)	4,7%(1)	4,3%(2)	
2002	13,4%(9)	13,5%(2)	15,2%(7)	
2003	13,4%(9)	13,5%(3)	13%(6)	0.5708
2004	18,1%(12)	13,5%(5)	15,2%(7)	
2005	14,9%(10)	18,9%(2)	17,4%(8)	
2006	8,9%(6)	5,4%(2)	8,6%(4)	
2007	13,4%(9)	4,7%(1)	17,4%(8)	
Código de Cirugía				
ELECTIVA	85%(57)	86,5%(18)	84,7%(39)	0.787
URGENTE	15%(10)	13,5%(3)	15,3%(7)	0.830
Tiempo de isquemia	209,2±54,3(80-360)	213,7±48,3(120-360)	207,2±57,3(80-320)	
Tiempo de circulación extracorpórea	114,6±27,9(45-205)	109,2±33,4(45-205)	117,5±24,8(75-195)	0.1524
Inmunosupresores				
Inducción				
BAS	34,3%(23)	19%(4)	41,3%(19)	
ATG	7,4%(5)	9,5%(2)	6,5%(3)	0.2133
NO	56,8%(38)	66,8%(14)	52,2%(24)	
NA's	1,5%(1)	4,7%(1)	0	
CsA	4,5%(3)	9,5%(2)	2,1%(1)	
CsA+MIPA	67,2%(45)	66,8%(14)	67,3%(31)	0.1247
CsA+AZA	13,4%(9)	9,5%(2)	15,2%(7)	
CsA+EVE	13,4%(9)	9,5%(2)	15,2%(7)	
CsA+SRL	1,5%(1)	4,7%(1)	0	

Tabla 5.- Complicaciones postrasplante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer mes.

		TOTAL (n=67)	BEM \geq 3A ISTHL 1er mes (n=21)	BEM <3A ISTHL 1er mes (n=46)	P
Infeciosas	SÍ/NO/ NA's	64,1%(43)/35,9%(24)/0	76,2%(16)/23,8%(15)/0	58,6%(27)/41,3%(19)/0	0.704
Oncológicas	SÍ/NO/ NA's	1,5%(1)/76,1%(51)/22,4%(15)	4,7%(1)/76,3%(16)/19%(4)	0,76%(35)/24%(11)	0.3099
Metabólicas	hipercolesterolemia nueva/previa/NO	37,3%(25)/28,3%(19)/34,4%(23)	38%(8)/42,8%(9)/19,2%(4)	37%(17)/22%(10)/41%(19)	0.1134
	hipertrigliceridemia nueva/previa/NO	2,9%(2)/ 4,5%(3)/92,6%(62)	4,7%(1)/9,5%(2)/85,8%(18)	2,1%(1)/2,1%(1)/95,8%(44)	0.3301
	hiperuricemia nueva/previa/NO	10,4%(7)/17,9%(12)/71,7%(48)	4,7%(1)/14,2%(3)/81,1%(18)	8,6%(4)/19,5%(9)/71,9%(33)	0.6549
	diabetes mellitus nueva/previa/NO	11,9%(8)/16,4%(11)/71,7%(48)	9,5%(2)/28,5%(6)/62%(19)	13%(6)/10,8%(5)/76,2%(35)	0.3636
Cardiovasculares	hipertensión arterial nueva/previa/NO	37,3%(25)/20,8%(14)/41,9%(28)	33,4%(7)/23,8%(5)/42,8%(9)	39%(18)/19,5%(9)/41,5%(19)	0.877
Neurológicas	SÍ/NO/ NA's	19,4%(13)/65,7%(44)/14,9%(10)	4,7%(1)/65,8%(18)/9,5%(2)	26%(12)/56%(26)/18%(10)	0.038
Digestivas	SÍ/NO/ NA's	11,9%(8)/71,7%(48)/16,4%(11)	14,2%(3)/76,3%(16)/9,5%(2)	10,8%(5)/69,7%(32)/19,5%(9)	0.5727
Óseas	SÍ/NO/ NA's	8,9%(6)/74,7%(50)/16,4%(11)	19%(4)/71,5%(15)/9,5%(2)	4,3%(2)/76,2%(35)/19,5%(9)	0.1105
Renales	nueva/previa/NO	19,4%(13)/4,5%(3)/76,1%(51)	19%(4)/4,7%(1)/76,3%(16)	19,5%(9)/4,2%(2)/76,3%(35)	0.8296

Tabla 6.-Características demográficas de la población en función de la presencia o no de rechazo significativo en el tercer mes.

		TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 3 ^{er} mes (n=27)	BEM <3A ISTHL 3 ^{er} mes (n=40)	P
Características antropométricas	género	76,1%(51) hombre	74%(20)	77,5%(31)	0,9757 ¹
		22,9%(16) mujer	26%(7)	22,5%(9)	
	edad (años)	46±12(16-68)	47±11,4(26-68)	44,8±12,4(16-55)	0,3372
	peso (Kg)	72,21±14,41(44-123)	74,80±13,59(48-97)	70,44±14,87(44-123)	0,2302
	IMC (Kg.m-2)	24,84±4,60(14,9-37,1)	25,41±4,59(17,4-34,8)	24,41±4,63(14,9-37,1)	0,3995
Antecedentes personales	Tabaquismo	No fumador o exfumador > 10 años	31,9%(7)	26%(11)	0,3598
		Exfumador hace 1-10 años	13,6%(4)	19,5%(8)	
		Fumador en el último año	9,1%(3)	4,3%(1)	
		NA's	45,4%(10)	50,2%(23)	
	Hipertensión arterial	SI/NO/ NA's	25,9%(7)/66,7%(18)/7,4%(2)	17,5%(7)/72,5%(29)/10%(4)	0,6884
	Diabetes mellitus	SI/NO/ NA's	16,4%(11)/76,1%(51)/7,5%(5)	10%(4)/80%(32)/10%(4)	0,1701
	Hipercolesterolemia	SI/NO/ NA's	28,3%(19)/68,8%(46)/2,9%(2)	22,5%(9)/72,5%(29)/5%(2)	0,251
	Hipertrigliceridemia	SI/NO/ NA's	4,5%(3)/41,8%(28)/53,7%(36)	11,1%(3)/40,7%(11)/48,2%(13)	0,094
	Hiperuricemia	SI/NO/ NA's	17,9%(12)/77,6%(52)/4,5%(3)	14,8%(4)/77,8%(22)/7,4%(1)	0,094
	Anticuerpos citotóxicos (+)	SI/NO/ NA's	11,9%(7)/79,1%(54)/9%(6)	14,2%(3)/81,1%(17)/4,7%(1)	0,5968
	Neoplasia	SI/NO/ NA's	6%(4)/89,5%(60)/4,5%(3)	10%(4)/85,5%(34)/5%(2)	0,2242
	Infección	SI/NO/ NA's	6%(4)/88%(59)/6%(4)	5%(2)/87,5%(35)/7,5%(3)	0,7599

¹ Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

Tabla 7.-Características de la enfermedad cardíaca del receptor en función de la presencia o no de rechazo significativo en el tercer mes.

Enfermedad cardiovascular	cardiopatía	Miocardiopatía dilatada idiopática Cardiopatía dilatada isquémica Cardiopatía isquémica Miocardiopatía hipertrofica Miocardiopatía restrictiva Valvulopatía Cardiopatía congénita	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 3er mes (n=27)	BEM <3A ISTHL 3er mes (n=40)	P
			46,3%(31)	44,5%(13)	47,5%(18)	
			28,4%(19)	29,6%(8)	27,5%(11)	
			7,5%(5)	11,1%(3)	5%(2)	
			2,9%(2)	3,7%(1)	2,5%(1)	0.9323
			7,5%(5)	3,7%(1)	10%(4)	
			2,9%(2)	3,7%(1)	2,5%(1)	
			7,5%(3)	3,7%(1)	5%(2)	
			0	0	0	
			7,5%(5)	7,4%(2)	7,5%(3)	
			47,7%(32)	48,2%(13)	48,5%(19)	0.9957
			40,3%(27)	40,7%(11)	40%(16)	
			4,5%(3)	3,7%(1)	5%(2)	
			24,9±12,2(10-65)	23,3±10,5(10-68)	26±13,18(10-65)	0.3886
			15%(10)/76,1%(51)/8,9%(6)	22,2%(6)/74,1%(20)/3,7%(1)	10%(4)/77,5%(31)/12,5%(5)	0.2197
			2,9%(2)/92,6%(62)/4,5%(3)	6,4%(2)/89,9%(24)/3,7%(1)	0/95%(38)/5%(2)	0.2135
			25,4%(17)/63,9%(44)/10,7%(6)	33,4%(9)/59,2%(16)/7,4%(2)	20%(8)/70%(28)/10%(4)	0.4645
			8,9%(6)/80,4%(56)/10,7%(7)	6,4%(2)/89,9%(24)/3,7%(1)	10%(4)/75%(32)/15%(6)	0.3287
			13,4%(9)/77,7%(63)/3%(2)	14,8%(4)/85,2%(23)/0	12,5%(5)/82,5%(33)/5%(2)	0.4896
			5,9%(4)/82,2%(56)/11,9%(7)	9,4%(2)/81,2%(22)/9,4%(3)	4,3%(2)/84,9(34)/10,8%(4)	0.9051
			31,4%(21)/65,7%(44)/2,9%(2)	33,4%(9)/66,6%(18)/0	30%(12)/65%(26)/5%(2)	0.4931

Tabla 8.-Características del donante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el tercer mes.

Donante	género	edad (años)	peso (Kg)	IMC (Kg.m-2)	sistema ABO	causa de muerte	inotropos	días en UCI	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 3er mes (n=27)	BEM <3A ISTHL 3er mes (n=40)	p
	hombre								65%(57)	92,6%(25)	80%(32)	
	mujer								7,5%(5)	7,4%(2)	7,5%(3)	0.1592
	NA's								7,5%(5)	0	12,5%(5)	
									31±11(13-58)	33,7±12,9(13-45)	30,3±9,9(14-52)	0.2548
									78,02±10,74(50-95)	77,62±10,05(50-95)	78,32±13,38(52-95)	0.7995
									25,69±3,70(17-40)	25,72±3,44(17-33)	25,68±3,92(19-40)	0.9641
					O				46,2%(31)	63%(17)	42,5%(14)	
					A				34,3%(23)	22,2%(6)	39,2%(17)	0.023
					B				10,5%(7)	14,8%(4)	7,5%(3)	
					AB				0	0	0	
					NA's				6,2%(6)	0	15%(6)	
					NA's	Hemorragia cerebral			20,9%(14)	25,9%(7)	17,5%(7)	
					NA's	Infarto cerebral isquémico			11,9%(8)	11,1%(3)	12,5%(5)	
					NA's	Otras cerebrovasculares			5,9%(4)	3,7%(1)	7,5%(3)	0.608
					NA's	TCE tráfico			38,9%(26)	29,7%(8)	45%(18)	
					NA's	Otras			11,9%(8)	18,5%(5)	7,5%(3)	
					NA's	NA's			10,44%(7)	11,1%(3)	10%(4)	
					Si				64,3%(43)	62,9%(17)	65%(26)	
					NO				26,8%(18)	33,4%(9)	22,5%(9)	0.3487
					NA's				8,9%(6)	3,7%(1)	12,5%(5)	
					NA's				3,11±2,78(0-10)	3,15±2,97(0-10)	3,08±2,68(0-9)	0.9762

Tabla 9.-Características del trasplante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el tercer mes.

	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 3er mes (n=27)	BEM <3A ISTHL 3er mes (n=40)	P
Cirugía				
Año de trasplante				
2000	13,4%(9)	23,6%(6)	7,5%(3)	
2001	4,5%(3)	3,7%(1)	5%(2)	
2002	13,4%(9)	13,5%(4)	15,2%(5)	
2003	13,4%(9)	11,1%(3)	15%(6)	
2004	18,1%(12)	18,5%(5)	17,5%(7)	0.7494
2005	14,9%(10)	14,8%(4)	15%(6)	
2006	8,9%(6)	7,4%(2)	10%(4)	
2007	13,4%(9)	7,4%(2)	17,5%(7)	
Código de Cirugía				
ELECTIVA	85%(57)	81,5%(22)	87,5%(35)	0.7424
URGENTE	15%(10)	18,5%(5)	12,5%(5)	
Tiempo de isquemia	209,2±54,3(80-360)	218,4±52,8(120-360)	202,7±55,2(80-285)	0.6046
Tiempo de circulación extracorpórea	114,6±27,9(45-205)	110,6±35,3(45-205)	117,5±21,1(75-165)	0.081
Inmunosupresores				
Inducción				
Basiliximab	34,3%(23)	22,2%(6)	42,5%(17)	
ATGAM®	7,4%(5)	11,1%(3)	5%(2)	
NO	56,8%(38)	63%(17)	52,5%(21)	0.2096
NA's	1,5%(1)	3,7%(1)	0	
CsA	4,5%(3)	7,4%(2)	2,5%(1)	
CsA+MPA	67,2%(45)	59,3%(16)	72,5%(29)	
CsA+AZA	13,4%(9)	14,8%(4)	12,5%(5)	0.5751
CsA+EVE	13,4%(9)	14,8%(4)	12,5%(5)	
CsA+SRL	1,5%(1)	3,7%(1)	0	

Tabla 10.- Complicaciones postrasplante en función de la presencia o no de rechazo significativo en los primeros 3 meses.

		TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 3er mes (n=27)	BEM <3A ISTHL 3er mes (n=40)	P
Infeciosas	SÍ/NO/ NA's	64,1%(43)/35,9%(24)/0	77,8%(21)/22,3%(6)/0	55%(22)/45%(18)/0	0,099
Oncológicas	SÍ/NO/ NA's	1,5%(1)/76,1%(51)/22,4%(15)	37%(1)/44,5%(21)/18,5%(5)	0,75%(30)/25%(10)	0,4065
Metabólicas	hipercolesterolemia hipertrigliceridemia	nueva/previa/NO nueva/previa/NO	40,7%(11)/37,1%(10)/22,2%(6) 3,7%(1)/11,1%(3)/85,2%(23)	35%(14)/22,5%(9)/42,5%(17) 2,5%(1)/0/97,5%(39)	0,1945 0,091
	hiperuricemia	nueva/previa/NO	7,4%(2)/14,8%(4)/77,8%(21)	12,5%(5)/7,5%(3)/80%(32)	0,5391
	diabetes mellitus	nueva/previa/NO	3,7%(1)/25,9%(7)/70,4%(19)	17,5%(7)/10%(4)/72,5%(30)	0,077
Cardiovasculares	hipertensión arterial	nueva/previa/NO	29,6%(8)/25,9%(7)/44,5%(22)	42,5%(17)/17,5%(7)/40%(16)	0,1302
Neurológicas	SÍ/NO/ NA's	19,4%(13)/65,7%(44)/14,9%(10)	8,4%(2)/80,4%(22)/11,2%(3)	22,5%(9)/60%(24)/17,5%(7)	0,1525
Digestivas	SÍ/NO/ NA's	11,9%(8)/71,7%(48)/16,4%(11)	11,2%(3)/76,3%(21)/9,5%(3)	10,8%(5)/69,7%(27)/19,5%(8)	0,5947
Óseas	SÍ/NO/ NA's	8,9%(6)/74,7%(50)/16,4%(11)	14,8%(4)/75,5%(20)/9,5%(3)	5%(2)/80%(30)/19,5%(8)	0,2849
Renales	nueva/previa/NO	19,4%(13)/4,5%(3)/76,1%(51)	22,2%(6)/3,7%(1)/74,1%(20)	17,5%(7)/5%(2)/77,5%(31)	0,8735

Tabla 11.-Características demográficas de la población en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer año.

		TOTAL (n=67)	BEM \geq 3A ISTHL 1año (n=37)	BEM <3A ISTHL 1año (n=30)	P
Características antropométricas	género	76,1%(51) hombre	72,9%(27)	80%(24)	0.7019 ¹
		22,9%(16) mujer	27,1%(10)	20%(6)	
	edad (años)	46±12(16-68)	47±11(26-68)	44±13(16-60)	0.2313
	peso (Kg)	72,21±14,41(44-123)	72,69±13,51(48-97)	71,60±15,73(44-123)	0.7708
	IMC (Kg.m-2)	24,84±4,60(14,9-37,1)	24,99±4,41(17,4-34,8)	24,63±4,95(14,9-37,1)	0.7730
Antecedentes personales	Tabaquismo	No fumador o exfumador >10 años	26,8%(18)	26,6%(8)	0.6592
		Exfumador hace 1-10 años	17,9%(12)	23,4%(7)	
		Fumador en el último año	6,1%(4)	3,3%(1)	
		NA's	49,2%(33)	46,6%(14)	
	Hipertensión arterial	SÍ/NO/ NA's	20,8%(14)/70,2%(47)/9%(6)	16,6%(5)/73,4%(22)/10%(3)	0.7372
	Diabetes mellitus	SÍ/NO/ NA's	16,4%(11)/76,1%(51)/7,5%(5)	10%(3)/80%(24)/10%(3)	0.3793
	Hipercolesterolemia	SÍ/NO/ NA's	28,3%(19)/68,8%(46)/2,9%(2)	32,4%(12)/64,9%(24)/2,7%(1)	0.7122
	Hipertrigliceridemia	SÍ/NO/ NA's	4,5%(3)/41,8%(28)/53,7%(36)	8,1%(3)/40,5%(15)/51,4%(19)	0.2794
	Hiperuricemia	SÍ/NO/ NA's	17,9%(12)/77,6%(52)/4,5%(3)	23,3%(7)/73,4%(22)/3,3%(1)	0.5546
	Anticuerpos citotóxicos (+)	SÍ/NO/ NA's	11,9%(7)/79,1%(54)/9%(6)	6,6%(2)/83,4%(25)/10%(3)	0.6505
	Neoplasia	SÍ/NO/ NA's	6%(4)/89,5%(60)/4,5%(3)	10%(3)/86,7%(26)/3,3%(1)	0.430
	Infección	SÍ/NO/ NA's	6%(4)/88%(59)/6%(4)	3,3%(1)/90,1%(27)/6,6%(2)	0.7047

¹ Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

Tabla 12.-Características de la enfermedad cardíaca del receptor en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer año.

Enfermedad cardiovascular		cardiopatía		TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1año (n=37)	BEM <3A ISTHL 1año (n=30)	P
		Miocardopatía dilatada idiopática		46,3%(31)	48,7%(18)	42,2%(13)	
		Cardiopatía dilatada isquémica		28,4%(19)	29,7%(11)	27,2%(8)	
		Cardiopatía isquémica		7,5%(5)	8,1%(3)	6,8%(2)	
		Miocardopatía hipertrofica		2,9%(2)	2,7%(1)	3,4%(1)	0.9719
		Miocardopatía restrictiva		7,5%(5)	5,4%(2)	10,2%(3)	
		Valvulopatía		2,9%(2)	2,7%(1)	3,4%(1)	
		Cardiopatía congénita		7,5%(5)	2,7%(1)	6,8%(2)	
	grado funcional (NYHA)	I		0	0	0	
		II		7,5%(5)	8,1%(3)	6,6%(2)	
		III		47,7%(32)	48,7%(18)	46,8%(14)	0.8867
		IV		40,3%(27)	40,5%(15)	40%(12)	
		NA's		4,5%(3)	2,7%(1)	6,6%(2)	
	FEVI (%)			24,9±12,2(10-65)	24,1±10,5(10-62)	25,9±14,1(10-65)	0.9373
	hipertensión pulmonar	SI/NO/ NA's		15%(10)/76,1%(51)/8,9%(6)	21,6%(8)/73%(27)/5,4%(2)	6,8%(2)/82,4%(24)/10,8%(4)	0.1531
	enfermedad arterial periférica	SI/NO/ NA's		2,9%(2)/92,6%(62)/4,5%(3)	5,4%(2)/89,2%(33)/5,4%(2)	0/96,6%(29)/3,4%(1)	0.3905
	uso de amiodarona	SI/NO/ NA's		25,4%(17)/65,7%(44)/8,9%(6)	29,7%(11)/62,2%(23)/8,1%(3)	20,4%(6)/69,4%(21)/10,2%(3)	0.6573
	cirugía cardiovascular	SI/NO/ NA's		8,9%(6)/82,2%(56)/8,9%(6)	10,8%(4)/83,8%(31)/5,4%(2)	6,8%(2)/83%(25)/10,2%(3)	0.6748
	DAI	SI/NO/ NA's		13,4%(9)/77,7%(53)/8,9%(6)	13,5%(5)/86,5%(32)/0	13,6%(4)/79,6%(24)/6,8%(2)	0.2794
	balón de contrapulsación	SI/NO/ NA's		5,9%(4)/82,2%(56)/11,9%(7)	5,4%(2)/81,8%(30)/13,5%(5)	6,8%(2)/(26)/6,8%(2)	0.6540
	inotropos	SI/NO/ NA's		31,4%(21)/65,7%(44)/2,9%(2)	35,1%(13)/62,2%(23)/2,7%(1)	27,2%(8)/(21)/3,4%(1)	0.7573

Tabla 13.-Características del donante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer año.

Donante	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1año (n=37)	BEM <3A ISTHL 1año (n=30)	p
género				
hombre	85%(57)	81%(33)	80%(24)	
mujer	7,5%(5)	8,1%(3)	6,6%(2)	0.2567
NA's	7,5%(5)	2,8%(1)	13,4%(4)	
edad (años)	31±11(13-58)	33,9±11,8(13-58)^a	28,8±10,2(14-52)^a	0.037
peso (Kg)	78,02±10,74(50-95)	78,8±10,94(50-98)	76,92±10,57(52-95)	0.5065
IMC (Kg.m-2)	25,69±3,70(17-40)	25,91±3,31(17-33)	25,4±4,22(19-40)	0.6177
sistema ABO				
O	46,2%(31)	56,7%(21)	33,3%(10)	
A	34,3%(23)	29,7%(11)	40%(12)	
B	10,5%(7)	10,8%(4)	10%(3)	0.1072
AB	0	0	0	
NA's	6,2%(6)	2,8%(1)	16,7%(5)	
causa de muerte				
Hemorragia cerebral	20,9%(14)	35,1%(13)	3,4%(1)	
Infarto cerebral isquémico	11,9%(8)	13,5%(5)	10%(3)	
Otras cerebrovasculares	5,9%(4)	2,8%(1)	10%(3)	0.0261
TCE tráfico	38,9%(26)	27%(10)	53,3%(16)	
Otras	11,9%(8)	10,8%(4)	13,3%(4)	
NA's	10,44%(7)	10,8%(4)	10%(3)	
Si	64,3%(43)	64,8%(24)	63,3%(19)	
NO	26,8%(18)	29,7%(11)	23,3%(7)	0.4914
NA's	8,9%(6)	5,5%(2)	13,4%(4)	
días en UCI	3,11±2,78(0-10)	3,11±2,80(0-10)	3,11±2,81(0-9)	0.9988

Tabla 14.-Características del trasplante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer año.

	TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1año (n=37)	BEM <3A ISTHL 1año (n=30)	P
Cirugía				
Año de trasplante				
2000	13,4%(9)	21,6%(8)	3,3%(1)	
2001	4,5%(3)	2,7%(1)	6,6%(2)	
2002	13,4%(9)	13,5%(5)	13,2%(4)	
2003	13,4%(9)	13,5%(5)	13,2%(4)	
2004	18,1%(12)	13,5%(5)	23,3%(7)	0.3267
2005	14,9%(10)	18,9%(7)	10%(3)	
2006	8,9%(6)	5,4%(2)	13,3%(4)	
2007	13,4%(9)	10,8%(4)	16,6%(5)	
Código de Cirugía				
ELECTIVA	85%(57)	81%(30)	90%(27)	0.5003
URGENTE	15%(10)	19%(7)	10%(3)	
Tiempo de isquemia	209,2±54,3(80-360)	215,9±50,7(120-360)	200,1±58,4(80-285)	0.677
Tiempo de circulación extracorpórea	114,6±27,9(45-205)	111,2±31,4(45-205)	118,5±23,2(45-205)	0.1324
Inmunosupresores				
Inducción				
Basiliximab	34,3%(23)	27%(10)	43,3%(13)	
ATGAM®	7,4%(5)	10,8%(4)	3,4%(1)	
NO	56,8%(38)	59,4%(22)	53,3%(16)	0.2705
NA's	1,5%(1)	2,8%(1)	0	
CsA	4,5%(3)	8,1%(3)	0	
CsA+MPA	67,2%(45)	62,1%(23)	73,2%(22)	
CsA+AZA	13,4%(9)	16,2%(6)	10%(3)	0.3484
CsA+EVE	13,4%(9)	10,8%(4)	16,6%(5)	
CsA+SRL	1,5%(1)	2,7%(1)	0	

Tabla 15.- Complicaciones postrasplante en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer año.

		TOTAL (n=67)	BEM ≥3A ISTHL 1 año (n=37)	BEM <3A ISTHL 1 año (n=30)	p
Infeciosas	SÍ/NO/ NA 's	64,1%(43)/35,9%(24)/0	72,9%(27)/27,1%(10)/0	53,3%(14)/46,7%(16)/0	0.1582
Oncológicas	SÍ/NO/ NA 's	1,5%(1)/76,1%(51)/22,4%(15)	2,7%(1)/81,1%(30)/16,2%(6)	0/70%(21)/30%(9)	0.2888
Metabólicas	hipercolesterolemia hipertrigliceridemia	nueva/previa/NO nueva/previa/NO	37,3%(25)/28,3%(19)/34,4%(23) 2,9%(2)/ 4,5%(3)/92,6%(62)	45,9%(17)/32,4%(12)/21,7%(8) 3,4%(1)/0/96,6%(29)	0.049 0.2788
	hiperuricemia	nueva/previa/NO	8,1%(3)/13,5%(5)/78,4%(29)	13,3%(4)/23,4%(7)/63,3%(19)	0.3969
	diabetes mellitus	nueva/previa/NO	5,4%(2)/21,6%(8)/73%(27)	20%(6)/10%(3)/70%(21)	0.1142
Cardiovasculares	hipertensión arterial	nueva/previa/NO	35,1%(13)/24,3%(9)/40,6%(15)	40%(12)/16,7%(5)/43,3%(13)	0.7405
Neurológicas	SÍ/NO/ NA 's	16,4%(11)/68,7%(46)/14,9%(10)	10,8%(4)/78,4%(29)/10,8%(4)	23,3%(7)/56,7%(17)/20%(6)	0.1606
Digestivas	SÍ/NO/ NA 's	11,9%(8)/71,7%(48)/16,4%(11)	16,2%(6)/73%(27)/10,8%(4)	6,7%(2)/70%(21)/23,3%(7)	0.2383
Óseas	SÍ/NO/ NA 's	8,9%(6)/74,7%(50)/16,4%(11)	13,5%(5)/75,7%(28)/10,8%(4)	3,4%(1)/73,2%(22)/23,4%(7)	0.1727
Renales	nueva/previa/NO	19,4%(13)/4,5%(3)/76,1%(51)	21,6%(8)/2,7%(1)/75,6%(28)	16,6%(5)/6,7%(2)/76,7%(23)	0.6726

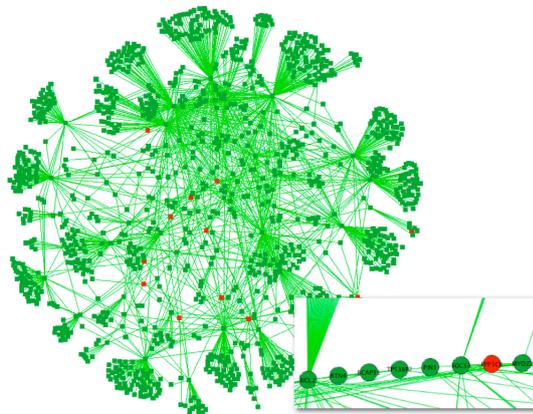


Figura 19: Representación de la red de interacción proteína-proteína estudiada.

0.6.3. Genotipos de los SNPs seleccionados

0.6.3.1. Nuevas dianas para genotipar

Se confeccionó una red de interacción proteína-proteína a partir de una lista inicial de proteínas relacionadas con el mecanismo de acción de la CsA: 1) la familia de ciclofilinas (PPIA, PPIB, PPIC, PPID, PPIE); 2) las isoformas de las subunidades de la calcineurina (PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, PPP3R1, PPP3R2), y 3) las isoformas de NFAT (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, NFATc2IP). La red creada estaba compuesta por 1328 nodos y 1871 aristas. El diámetro de la red era de 8 y el coeficiente de *clustering* medio de 0,048. La **figura 19** muestra la representación gráfica de la red mediante la aplicación Cytoscape.

A continuación se detallan las principales características topológicas que definen nuestra red:

a) *Distribución de grados*: En la **figura 20** se representa la distribución de los grados de nuestra red. Se puede observar que muestra una topología característica de red sin escala, propia de las redes biológicas.

b) *Conectividad del vecindario*: En la **figura 21** se representa la distribución de la conectividad de vecindario de nuestra red. Se puede ver cómo este parámetro es una función que decrece si aumenta k , prevaleciendo las aristas

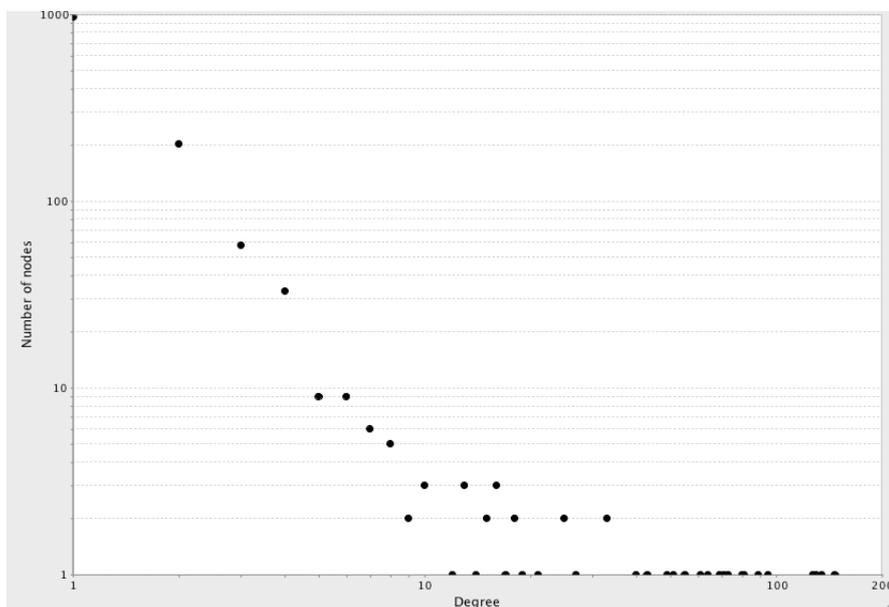


Figura 20: Distribución de los grados de los nodos de la red de interacción proteína-proteína analizada.

que conectan nodos poco conectados y otros altamente conectados.

c) *Caminos más cortos*: La distribución de caminos más cortos de nuestra red se puede ver en la **figura 22**. Se aprecia cómo este parámetro es una función que decrece si aumenta o disminuye k , prevaleciendo las aristas que conectan nodos poco conectados y otros altamente conectados.

d) *Coefficientes de clustering*: En la **figura 23** se puede observar la función de distribución de los valores de *clustering* de la red de interacción proteína-proteína analizada.

Para identificar nuestras proteínas candidatas seleccionamos, a partir de la red anterior, una subred no dirigida compuesta por 76 nodos y 83 aristas y que contenía todas nuestras proteínas iniciales relacionadas con la farmacodinamia de la CsA. En la **figura 24** se representa esta subred, donde se pueden apreciar, en amarillo, los nodos iniciales utilizados para construir la red y, en rojo, los nodos identificados como *hubs* entre dos módulos funcionales (A y B).

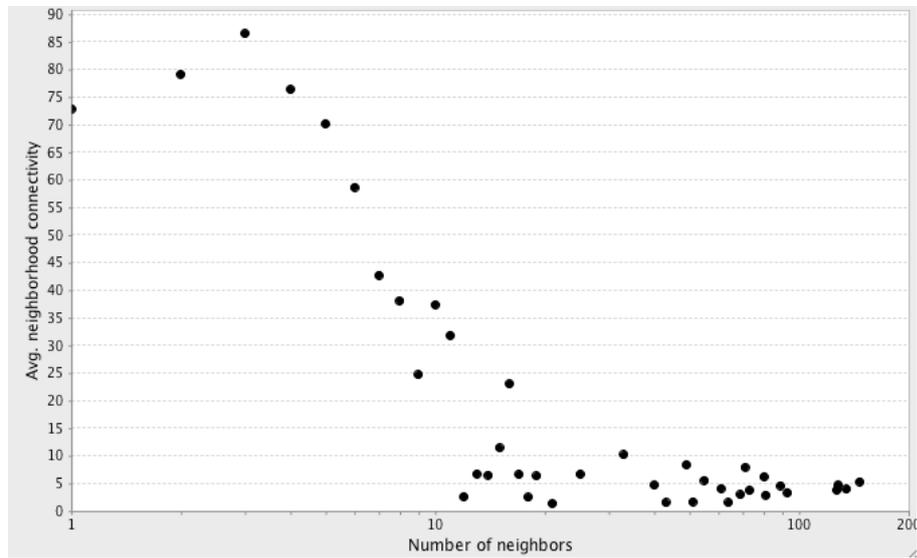


Figura 21: Distribución de la conectividad del vecindario de los nodos de la red de interacción proteína-proteína analizada.

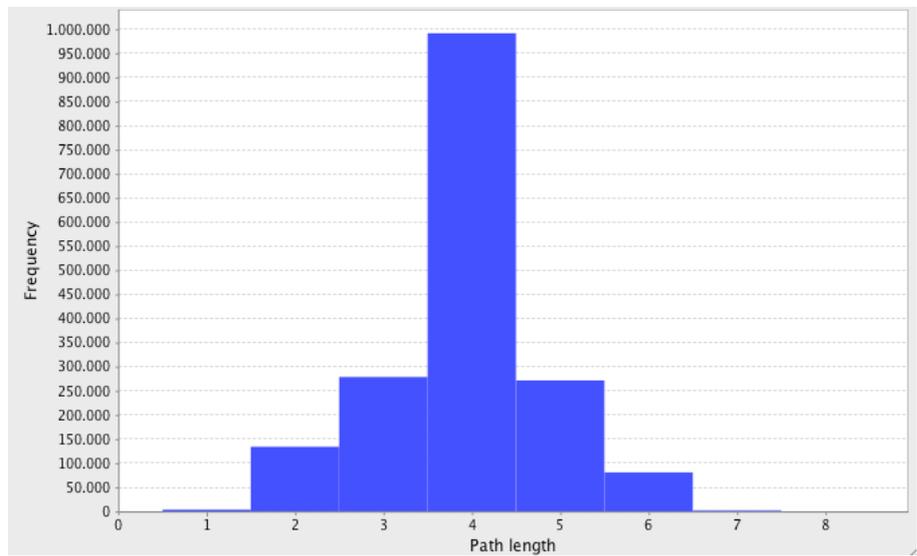


Figura 22: Distribución de los caminos más cortos de la red de interacción proteína-proteína analizada.

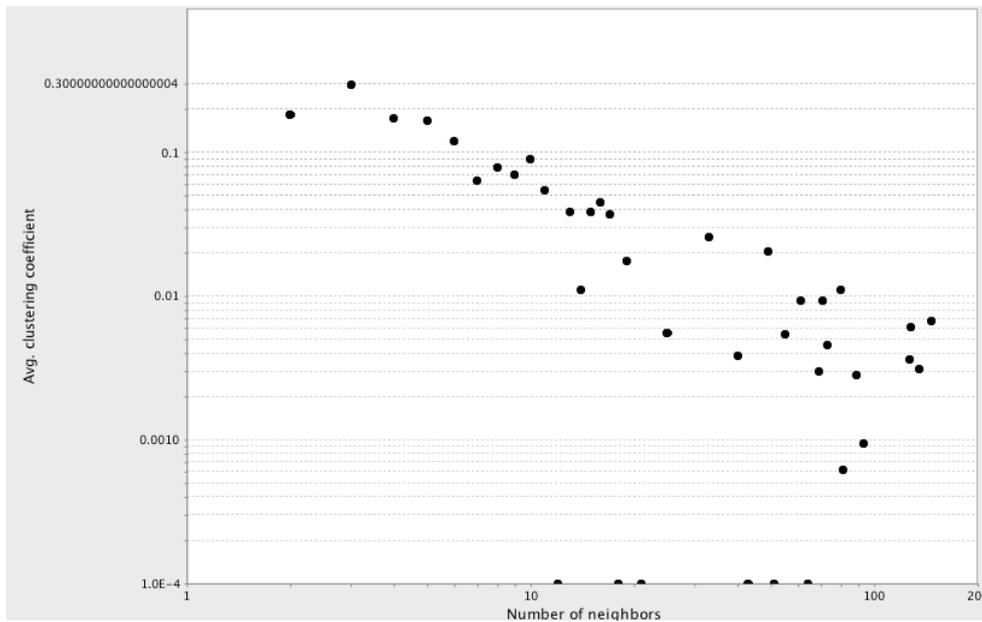


Figura 23: Distribución de *clustering* de agrupamiento de la red de interacción proteína-proteína analizada.

0.6.3.2. Frecuencias alélicas

Las frecuencias genotípicas de cada SNP analizado fueron: CC(23), CT(31) y TT(13) para MDR1 3435G>A; AA(*I/*I) (62), AG(*I/*IB) (5) y GG(*IB/*IB) (0) para CYP3A4 -290A>G (CYP3A4*1/*1B); GG(59), GA(8) y AA(0) para CYP3A5 6986A>G (CYP3A5*1/*3); y TT(30), TG(24) y GG(12) para NFATC1 751G>T. Se observó en nuestra población que los diferentes genotipos se encontraban en equilibrio de *Hardy-Weinberg*: MDR1 3435G>A ($\chi^2=0,192$, $p=0,661$, $D=-0,87$), CYP3A4 -290A>G (CYP3A4*1/*1B) ($\chi^2=0,1$, $p=0,751$, $D=0,93$), CYP3A5 6986A>G (CYP3A5*1/*3) ($\chi^2=0,27$, $p=0,603$, $D=-0,23$) y NFATC1 ($\chi^2=3,030$, $p=0,081$, $D=-3,27$)⁵⁴.

Las frecuencias alélicas de PRKCZ 268G>C y PPIA 4C>A no eran conocidas en la base de datos de HapMap al inicio del estudio y en nuestra población fue de 1 para ambos casos, por lo que no se pudieron incluir en los posteriores análisis estadísticos para analizar su contribución a la variabilidad interindi-

⁵⁴Según los análisis de bondad de ajuste efectuados mediante un test de χ^2

vidual en el comportamiento farmacocinético de la CsA y su efecto sobre la incidencia de rechazo agudo, al ser todos los pacientes homocigotos para el alelo mayor.

0.6.4. Análisis por genotipos de la presencia de rechazo agudo significativo

La **tabla 16** muestra la distribución de los genotipos en función de la existencia o no de rechazo agudo significativo en el primer mes, tercer mes y primer año después del trasplante. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos de MDR1 3435G>A, presentando mayor frecuencia rechazo agudo significativo en el primer mes postrasplante los portadores del alelo C en comparación con los portadores del alelo T ($p=0,026$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al analizar el resto de polimorfismos en relación a la frecuencia de rechazo agudo.

Tabla 16.-Distribución de las frecuencias genotípicas en función de la presencia o no de rechazo significativo en el primer, mes, tercer mes y al año.

Gen	SNP	genotipo	1 ^{er} mes			3 ^{er} mes			1 ^{er} año		
			BEM ≥3A (n=21)	BEM <3A (n=46)	P	BEM ≥3A (n=27)	BEM <3A (n=40)	P	BEM ≥3A (n=37)	BEM <3A (n=30)	P
MDR1	3435G>A	CC	12	11	0,026	13	10	0,1466	14	9	0,6939
		CT	7	24		10	21		17	14	
		TT	2	11		4	9		6	7	
CYP3A4	-290A>G	(*1B/*1B)	-	-	0,9463	-	-	0,6255	-	-	0,8071
		GG									
		(*1/*1B)	1	4		1	4		3	2	
		AG									
CYP3A5	6986A>G	(*1/*1)	20	42		26	36		34	28	
		AA									
		GG	19	40	0,9952	24	35	0,832	31	28	0,4123
NFATC1	751G>T	(*3/*3)	2	6		3	5		6	2	
		GA									
		(*3/*1)	-	-		-	-		-	-	
		AA									
NFATC1	751G>T	(*1/*1)	11	19	0,7189	12	18	0,3522	17	13	0,2411
		TT									
		TG	7	17		12	12		15	9	
NFATC1	751G>T	GG	3	9		3	9		4	8	

0.6.5. Análisis por genotipos de las principales variables farmacocinéticas de CsA

0.6.5.1. Valores de C0 y C2 en la primera semana postrasplante

La **tabla 18** muestra la distribución de los valores medios de C0 y C2 en la primera semana, ajustados por dosis y peso, así como el tiempo en alcanzar sus niveles terapéuticos recomendados en el primer mes postrasplante, en función de los diferentes genotipos analizados. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de la C0 media en la primera semana en función de los genotipos de MDR1 3435G>A ($p=0,003$). El análisis *post hoc* mostró que los portadores del genotipo TT tenían valores de la C0 media mayores en comparación con los genotipos CT ($p=0,004$) y CC ($p=0,01$). También se observan mayores valores medios de C0 /D, C2 y C2/D en la primera semana y menores tiempos hasta alcanzar el rango terapéutico recomendado para C0 y C2 en los portadores del genotipo TT en comparación con los portadores de CT y CC de MDR1 3435G>A, aunque estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas. También se pudieron comprobar diferencias significativas en los valores medios de C0/D durante la primera semana postrasplante en función de los genotipos de NFATC1 751G>T ($p=0,043$). De este modo, los portadores del genotipo GG mostraron mayores valores de C0/D/peso que los portadores de TT ($p=0,03$).

Al analizar estos parámetros cinéticos al primer, tercer, sexto, noveno y duodécimo mes postrasplante (**tabla 19**) se observaron diferencias estadísticamente significativas en función de los genotipos de MDR1 3435G>A al primer mes para los valores medios de C0 ($p=0,05$) y al año para C0 ($p=0,016$), C0/D ($p=0,003$) y C0/D/peso ($p=0,005$). En todos estos casos se observó cómo los portadores del genotipo TT presentaban valores mayores para estos parámetros en comparación con los portadores de CT (C0 1 mes, $p=0,046$; C0 12 meses, $p=0,01$; C0 /D 12 meses, $p=0,04$) y/o TT (C0 12 meses, $p=0,01$; C0/D 12 meses, $p=0,002$; C0/D/peso, $p=0,003$). No se observaron diferencias estadísticamente sig-

nificativas para los valores de C₂/D ni C₂/D/peso en relación a los genotipos de MDR1 3435G>A en estos periodos.

Cuando se analizó la influencia del polimorfismo MDR1 3435G>A sobre los valores de C₀, C₀/D y C₀/D/peso de los días +3, +5, +7, +10, +14, +21 y +28 después del trasplante, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de la C₀ media el día +5 (p=0,046) y +7 (p=0,040) postrasplante, de modo que eran mayores en los portadores del genotipo TT frente a los portadores de CT (p=0,043). Aunque se observa la misma tendencia esos días para los valores medios de C₀/D y las dosis, no fueron diferencias estadísticamente significativas (**tabla 20**).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas durante este periodo en los diferentes parámetros farmacocinéticos analizados en relación a los genotipos de CYP3A4 -290A>G (CYP3A4*1B/*3) y CYP3A5 6986A>G (CYP3A5*1/*3).

0.6.5.2. Estudio farmacocinético de CsA

La **tabla 21** muestra los resultados del análisis de diferentes parámetros farmacocinéticos (AUC_{0-12h}, AUC_{0-12h}/D, AUC_{0-12h}/D/peso, Cl/F, C_{max}, T_{max}, C_{ss}) determinados en el primer mes postrasplante en función de los genotipos de MDR1 3435G>A. Se observó que los portadores del genotipo TT tenían valores mayores de AUC_{0-12h} (p=0,05) y de C_{ss} (p=0,05) frente a los portadores de CT y CC. No se encontraron diferencias significativas al realizar el análisis en función de los genotipos de NFATC1 751G>T..

Tabla 18.-Valores medios en la primera semana de C0 y C2, y del tiempo en alcanzar niveles terapéuticos en función de los diferentes genotipos.

Gen	SNP	genotipo	C0 (ng.mL ⁻¹)	C0/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C0/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)	t C0>200 (días)	C2 (ng.mL ⁻¹)	C2/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C2/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)	t C2>1000 (días)
MDR1	3435G>A	CC (23)	136,3±58,6 ^b (58-273)	0,61±0,30 (0,21-1,39)	41,6±18,1 (16,8-84,8)	10,7±6,1 (3-28)	846,8±410,6 (222,3-1306)	2,85±0,71 (2,22-4,09)	214±58,66 (123,2-282,2)	12,4±7,3 (5-28)
		CT (31)	133,2±56,5 ^a (39-251)	0,49±0,20 (0,13-0,88)	33,2±12,3 (9,6-60,5)	10,4±5,7 (3-28)	909,2±436,7 (375,1-1782)	3,00±1,23 (1,38-5,55)	203±65,25 (108,1-367,3)	11,2±7,3 (3-30)
		TT (13)	199,3±70,8 ^{a,b} (122,2-342,8)	0,61±0,22 (0,3-1,1)	40,6±8,3 (29,4-61,6)	8,6±5 (3-21)	1075±363,6 (747,6-1781)	2,57±1,05 (1,43-5,45)	179,6±38,38 (134,2-227,6)	8,4±3,1 (5-14)
CYP3A4	-290A>G	p*	0,003	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		AA (*1/*1) (42)	147,6±67 (39,8-342,8)	0,56±0,25 (0,13-1,39)	37,8±14,8 (9,6-84,8)	10,4±5,9 (3-28)	918,9±410,5 (222,3-1782)	2,89±1,09 (1,38-5,5)	199,6±58,5 (108,1-367,3)	10,9±6,7 (3-30)
		AG (*1/*1B) (5)	140±20,6 (123-172,4)	0,48±0,20 (0,30-0,63)	34,8±7,4 (27,3-45,6)	7,8±5,7 (5-10)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CYP3A5	6986A>G	p**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		GG(*3/*3) (59)	147,7±67,9 (39-342)	0,56±0,25 (0,13-1,39)	37,8±14,2 (9,6-84,8)	10,3±5,4 (3-28)	898,8±417 (222,3-1782)	2,87±1,13 (1,38-5,55)	196,5±59,5 (108,1-367,3)	11,1±6,7 (5-30)
		GA(*3/*1) (8)	142,5±33,4 (99,2-187,9)	0,48±0,18 (0,3-0,81)	36±11,7 (25,8-62,7)	9,0±7,9 (3-28)	1246±133,4 (1094-1339)	2,76±0,64 (2,03-3,23)	222,2±33,2 (193,3-258,5)	8,5±4,6 (3-14)
NFATC1	751G>T	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		TT (30)	140,3±60,9 (56,2-311)	0,49±0,21 (0,21-1,09)	33,9±18,1 ^c (20,2-61,6)	10,3±6,1 (5-28)	1001±298,8 (486-1549)	2,74±0,85 (1,43-4,49)	197,2±18,1 (123,2-282,2)	9,6±4,1 (5-21)
		TG (24)	144,8±56,2 (39,4-273)	0,55±0,25 (0,13-1,39)	37,9±12,3 (9,6-84,8)	10,3±5,7 (3-11)	701±167,3 (479,7-942,6)	2,47±0,50 (1,74-3,06)	177,5±27,4 (147,4-201,8)	12,2±7 (5-28)
GG (12)	GG (12)	GG (12)	152±71 (66,2-251)	0,68±0,27 (0,25-1,16)	46,9±8,3 ^c (19,5-74,5)	10,2±5 (3-28)	936,5±596,3 (222,3-1782)	3,16±1,59 (1,38-5,5)	215,5±90,1 (108,1-367,3)	12,5±10,1 (3-30)
		p*	n.s.	n.s.	0,043	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ANOVA de 1 factor con test posthoc de Tukey. Los valores que comparten un superíndice son estadísticamente significativos: ^{ab}: 0,004; ^{bc}: 0,01; ^{cd}: 0,03

Tabla 19.-Distribución durante el primer año postrasplante de los valores medios de C0 y C2, ajustados por dosis y peso, en función de los diferentes genotipos de MDR1 3435G>A.

CsA	MDR1 3435G>A	mes					mes 12
		mes 1	mes 3	mes 6	mes 9	mes 12	
C0	CC	259,3±73,6 (102-411,5)	310,4±84,6 (161-490)	233,2±86,4 (71,8-374)	171,2±78,9 (36,9-355,5)	149,1±66,5 (71,1-339,9) ^c	
	CT	249,5±49,9 (158-341,2) ^a	317,3±88,1 (112-487,9)	253,4±90,3 (58,6-540,4)	180,3±90,4 (53-409,8)	145±45,2 (35,5-221) ^b	
	TT	299,3±66,3 (177-426,6) ^a	312±109,5 (166-506,9)	245,7±123 (132,6-539,5)	218,3±106,1 (102-431,8)	201,3±55,3 (111,8-287,6) ^{b,c}	
	p*	0,05	n.s.	n.s.	n.s.	0,016	
C0/D	CC	0,87±0,38 (0,46-2,11)	1,12±0,33 (0,64-1,86)	0,90±0,34 (0,45-1,65)	0,79±0,46 (0,33-2,33)	0,60±0,26 (0,36-1,36) ^e	
	CT	0,80±0,31 (0,39-1,69)	1,13±0,41 (0,62-2,50)	1,02±0,34 (0,19-1,69)	0,74±0,34 (0,17-1,57)	0,70±0,19 (0,40-1,18) ^d	
	TT	0,97±0,40 (0,46-1,86)	1,30±0,37 (0,67-1,90)	1,02±0,23 (0,72-1,39)	0,90±0,34 (0,51-1,73)	0,89±0,19 (0,56-1,15) ^{d,e}	
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,003	
C0/D/peso	CC	60,2±19,2 (34,8-122,3)	80,8±23,3 (5,4-128)	67,6±26,7 (27,5-126,4)	59,2±42,6 (24,1-214)	44,1±17,1 (21,7-93,8) ^f	
	CT	56,7±23,6 (25,7-138,4)	79,5±31,1 (43,7-185)	73,7±27,3 (9,6-141)	54±24,5 (16,1-122,4)	51,1±13,3 (25,3-83,8)	
	TT	65,1±21,4 (30,7-106,2)	90,9±35,4 (48,9-172,4)	74,5±28 (38,2-143,2)	65,3±28,2 (35,4-124,4)	63,9±18,2 (41,7-92) ^f	
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,005	
C2	CC	1098±291,1 (439-1630)	1187±293,6 (819-1619)	1081±280,7 (732,4-1644)	787,8±326,3 (446,3-1189)	961,8±195,6 (790,2-1386)	
	CT	1074±242,5 (587,8-1439)	1254±298,6(612,6-1906)	1096±295,5 (623,3-1914)	795,1±353,8 (204,3-1360)	709,7±282,3 (221,6-1150)	
	TT	1308±280,5 (903,6-1767)	1231±327,1 (804,6-1731)	1022±311,4 (662,4-1543)	932,1±421,4 (340-1720)	801,5±162,3 (449-902)	
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
C2/D	CC	3,45±1,20 (2,03-6,34)	4,40±1,01 (3,30-7,25)	3,84±1,13 (1,82-5,98)	3,27±0,91 (2,23-4,46)	3,86±0,75 (2,98-5,09)	
	CT	3,04±0,94 (1,03-5,22)	3,85±1,51 (0,72-7,89)	4,00±1,36 (1,22-7,78)	3,51±1,35 (1,13-5,67)	3,21±1,24 (0,75-5,05)	
	TT	3,39±0,78 (2,63-5,02)	4,12±1,21 (2,73-6,26)	3,92±0,55 (2,92-4,59)	3,45±1,97 (0,44-6,88)	3,49±0,85 (2,25-4,50)	
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
C2/D/peso	CC	244,2±60,1 (136,2-367,9)	318,5±64,5 (184,2-420,5)	290,5±76,9 (154,2-412,5)	243,9±97,8 (146,3-410,8)	290±54,9 (229,1-379,3)	
	CT	205,7±59,1 (76,52-308,4)	262,5±99,5 (36,7-402,5)	273,3±87,3 (90,5-396,7)	254,2±115,8 (83,5-505)	217,9±86,3 (55,51-358)	
	TT	242,7±58,6 (198,5-338)	296,4±58,6 (196,5-445,8)	279,1±58,6 (220,8-395,5)	241,7±58,6 (37,16-495,3)	253,0±58,6 (175,4-372,0)	
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

*ANOVA de 1 factor con test posthoc de Tukey. Los valores que comparten un superíndice son estadísticamente significativos: ^a: 0,046; ^b: 0,01; ^c: 0,03; ^d: 0,04; ^e: 0,002; ^f: 0,003

Tabla 20.-Distribución durante el primer mes posttrasplante de los valores medios de C0, ajustados por dosis y peso, en función de los diferentes genotipos de MDR1 3435G>A.

CsA	MDR1 3435G>A	Día +3	Día +5	Día +7	Día +10	Día +14	Día +21	Día +28
C0	CC	101±73,6 (17-235,6)	140,5±91,2 (57,2-376,3)	191,7±105,3 ^c (40,8-191,7)	264,9±84,6 (83,1-618,6)	300,6±106,7 (126,5-463,5)	320,9±96,8 (164,9-480,6)	381,5±108,4 (114,9-531,2)
	CT	103,3±49,9 (21,5-300,8)	134,4±73,2 ^a (26,4-321)	190,5±92,3 ^b (47,5-486,6)	282,2±88,1 (117,3-510,2)	331,2±133,8 (82,5-800)	320,3±115 (109,8-533,4)	323,4±112,8 (42,2-593,7)
	TT	137,8±66,3 (53,4-258)	201,1±70,8 ^a (119-335,2)	274,6±106,2 ^{b,c} (134,8-442,6)	373,8±109,5 (125,8-715,4)	361,9±114,5 (182,1-547,3)	369,2±76,5 (255,7-544,3)	345±111,7 (208,4-616,7)
C0/D	p*	n.s.	0,046	0,040	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CC	0,55±0,44 (0,06-1,88)	0,59±0,32 (0,19-1,14)	0,71±0,45 (0,27-2,26)	0,79±0,39 (0,27-1,71)	0,88±0,41 (0,36-2,14)	1,01±0,61 (0,47-3,17)	1,15±0,54 (0,34-2,98)
	CT	0,45±0,22 (0,11-0,88)	0,46±0,22 (0,13-0,91)	0,61±0,48 (0,14-1,5)	0,78±88,1 (0,16-2,77)	0,94±0,52 (0,21-2,68)	1,08±0,66 (0,25-3,05)	1,11±0,37 (0,56-2,11)
Dosis	TT	0,58±0,38 (0,21-1,72)	0,68±0,24 (0,33-1,04)	0,99±0,39 (0,31-1,60)	0,99±0,79 (0,31-1,6)	0,94±0,79 (0,36-1,26)	1,19±0,56 (0,48-2,56)	1,29±0,43 (0,84-2,23)
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CC	213,2±94,28 (50-450)	263,1±143,7 (100-600)	317,4±159,4 (75-500)	342,4±115,1 (200-600)	365,2±117,4 (200-600)	361,4±120,2 (150-600)	363,1±121,3 (150-600)
Dosis	CT	220,5±79 (100-400)	300,8±122,3 (100-700)	355±121,6 (200-700)	391±136,6 (150-800)	395,7±147,7 (150-800)	351,7±152,4 (50-700)	322,4±121,9 (25-550)
	TT	279,2±119,5 (50-450)	377,1±155,7 (150-700)	426,9±157,6 (250-800)	425±149,3 (275-475)	350±144,3 (150-600)	346,2±150,6 (175-675)	277,5±75,8 (175-400)
	p*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*ANOVA de 1 factor con test posthoc de Tukey. Los valores que comparten un superíndice son estadísticamente significativos: ^a: 0,043; ^b: 0,04; ^c: 0,05.

0.6.6. Análisis de las principales variables farmacocinéticas de CsA en función de la presencia de rechazo significativo.

Se realizó el análisis de los valores de C0 y C2, normalizados por la dosis y el peso, en función de la presencia de rechazo agudo significativo en el primer mes, tercer mes y tras un año del trasplante. Se observaron menores valores de C0/D ($p=0,04$) y C0/D/peso ($p=0,03$) el día +3 y de C2/D/peso ($p=0,04$) el día +7 entre los pacientes que no presentaron ningún episodio de rechazo agudo significativo en el primer mes postrasplante (**tabla 22**). También se comprobó cómo esta relación se invertía significativamente el día +21 y +28, encontrando valores de C0 mayores en el grupo que presentó algún episodio de rechazo agudo en comparación con los pacientes que estuvieron libres de rechazo en el primer mes (**tabla 22**).

Cuando se analizaron los parámetros cinéticos en función de la presencia de rechazo en los tres primeros meses (**tabla 23**), se comprobaron menores valores de C0/D y C0/D/peso en el día +7 ($p=0,045$ y $p=0,05$ respectivamente) y +14 ($p=0,02$ y $p=0,05$, respectivamente) en los pacientes que tuvieron algún episodio en este periodo. Por último, el análisis efectuado teniendo en cuenta la frecuencia de rechazo en el primer año sólo mostró diferencias significativas en los valores de C0/D/peso ($p=0,05$) y de C2/D ($p=0,04$) y C2/D/peso ($p=0,03$) al sexto mes del trasplante, siendo mayores en el grupo que permaneció libre de rechazo (**tabla 24**).

Tabla 22.-Distribución de los valores medios en el primer mes de C0 y C2, ajustados por dosis y peso, y del tiempo en alcanzar niveles terapéuticos en función la existencia de rechazo agudo de grado $\geq 3A$ de la ISHTL en el primer mes postrasplante.

tiempo	ISHTL 1 mes	C0 (ng.mL ⁻¹)	C0/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C0/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)	C2 (ng.mL ⁻¹)	C2/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C2/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)
día +3	≤ 2	117,3 \pm 64,5	0,57\pm0,34^c	39,1\pm21,8^d	651,2 \pm 381,8	2,66 \pm 58,6	160 \pm 1,57
	$\geq 3A$	90,6 \pm 79,8	0,38\pm0,30^c	26,5\pm18,8^d	439,6 \pm 302,8	2,16 \pm 53,7	198,6 \pm 0,6
día +5	≤ 2	152,4 \pm 79,5	0,55 \pm 0,24	37,5 \pm 15,7	1010 \pm 526,1	2,69 \pm 58,6	191 \pm 1,27
	$\geq 3A$	142,2 \pm 89	0,48 \pm 0,32	35,8 \pm 23,4	761,9 \pm 458	2,69 \pm 53,7	179 \pm 1,17
día +7	≤ 2	214,9 \pm 100,7	0,71 \pm 0,38	46,6 \pm 20,1	981,4 \pm 413,9	2,81 \pm 58,6	195,7\pm1,07^e
	$\geq 3A$	188,4 \pm 111,2	0,53 \pm 0,32	38,2 \pm 17,3	1463 \pm 194,4	3,71 \pm 53,7	166\pm1,18^e
día +10	≤ 2	297,8 \pm 137,8	0,86 \pm 0,46	58,1 \pm 30,6	1164 \pm 469,3	3,02 \pm 58,6	207,3 \pm 0,90
	$\geq 3A$	279,6 \pm 122,9	0,75 \pm 0,36	55,3 \pm 23,4	1213 \pm 426,2	3,15 \pm 53,7	222 \pm 0,63
día +14	≤ 2	326,5 \pm 136,7	1,07 \pm 0,61	74,8 \pm 40,8	1154 \pm 364,2	3,44 \pm 58,6	241,5 \pm 1,01
	$\geq 3A$	327,6 \pm 85,1	0,81 \pm 0,39	60,2 \pm 24,4	1047 \pm 362,4	2,67 \pm 53,7	192 \pm 1
día +21	≤ 2	312,2\pm102^a	1,09 \pm 0,57	75,4 \pm 39,8	1179 \pm 258,5	3,56 \pm 58,6	251,3 \pm 0,88
	$\geq 3A$	365,4\pm97,5^a	1,05 \pm 0,73	75,7 \pm 45,8	1283 \pm 478,4	3,92 \pm 53,7	275 \pm 1,83
día +28	≤ 2	325,5\pm114,9^b	1,15 \pm 0,41	78,4 \pm 28,4	1132 \pm 416	3,80 \pm 58,6	272,4 \pm 1,24
	$\geq 3A$	398,3\pm89,7^b	1,16 \pm 0,53	85,7 \pm 29,8	1189 \pm 498,2	3,89 \pm 53,7	268 \pm 1,74
mes 1	≤ 2	336,8 \pm 114,4	1,17 \pm 0,44	79,8 \pm 28,4	1363 \pm 384,7	4,16 \pm 58,6	296,8 \pm 1,59
	$\geq 3A$	364,2 \pm 155,1	0,97 \pm 0,39	74,2 \pm 31,3	1482 \pm 834,5	4,42 \pm 53,7	318 \pm 0,87

*ANOVA de 1 factor con test posthoc de Tukey. Los valores que comparten un superíndice son estadísticamente significativos: ^{ab}: 0,05; ^{ab}: 0,02; ^{cd}: 0,04; ^{cd}: 0,03; ^{cd}: 0,04

Tabla 23.- Distribución de los valores medios en el primer mes de C0 y C2, ajustados por dosis y peso, y del tiempo en alcanzar niveles terapéuticos en función la existencia de rechazo agudo de grado $\geq 3A$ de la ISHTL en el tercer mes postrasplante.

tiempo	ISHTL 3mes	C0 (ng.mL ⁻¹)	C0/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C0/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)	C2 (ng.mL ⁻¹)	C2/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C2/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)
día +3	≤ 2	121,9 \pm 65,9	0,58\pm0,36^a	40,2\pm22,9^b	647,4 \pm 402,2	2,70 \pm 1,65	157,4 \pm 58,6
	$\geq 3A$	90,16 \pm 72,8	0,41\pm0,27^a	27,6\pm17,2^b	502 \pm 276,9	2,21 \pm 0,43	193,6 \pm 95,5
día +5	≤ 2	157,4 \pm 81,7	0,56 \pm 0,25	38,5 \pm 16,4	1032 \pm 546	2,70 \pm 1,33	190 \pm 65,25
	$\geq 3A$	137,4 \pm 82,8	0,49 \pm 0,30	34,7 \pm 21,1	763 \pm 396,6	2,65 \pm 0,96	185,4 \pm 85,6
día +7	≤ 2	215,5 \pm 107,3	0,72 \pm 0,41	47 \pm 21,4	928 \pm 437,6	2,73 \pm 1,13	193,2 \pm 38,38
	$\geq 3A$	194 \pm 98,2	0,56 \pm 0,29	39,3 \pm 15,5	1173 \pm 384,3	3,52 \pm 0,92	249,5 \pm 64
día +10	≤ 2	305,3 \pm 141,3	0,88 \pm 0,47	58,6 \pm 32,1	1164 \pm 469,2	3,02 \pm 0,90	207,3 \pm 58,6
	$\geq 3A$	272 \pm 118	0,74 \pm 0,34	55,1 \pm 21,8	1213 \pm 426,2	3,15 \pm 0,63	222 \pm 67,6
día +14	≤ 2	339,6 \pm 136,4	1,12\pm0,64^c	77,6\pm42,1^d	1151 \pm 376,8	3,46 \pm 1,03	243,5 \pm 58,5
	$\geq 3A$	309,5 \pm 97,2	0,80\pm0,38^c	59,2\pm24,2^d	1071 \pm 342,7	2,77 \pm 0,97	197,7 \pm 101,5
día +21	≤ 2	338,2 \pm 104,3	1,14 \pm 0,59	78,1 \pm 41	11,72 \pm 231,9	3,56 \pm 0,85	251,1 \pm 58,6
	$\geq 3A$	345 \pm 100,8	0,99 \pm 0,66	72,1 \pm 42,9	1269 \pm 457,1	3,87 \pm 1,72	271,3 \pm 65,9
día +28	≤ 2	326,9 \pm 123	1,17 \pm 0,44	79,3 \pm 29,1	1128 \pm 427,7	3,79 \pm 1,28	269,4 \pm 58,6
	$\geq 3A$	378 \pm 88,3	1,13 \pm 0,47	82,7 \pm 29	1190 \pm 466	3,90 \pm 1,55	277,5 \pm 107,6
mes 1	≤ 2	327,8 \pm 114,8	1,16 \pm 0,46	77 \pm 26,2	1398 \pm 373	4,21 \pm 1,64	296,8 \pm 58,6
	$\geq 3A$	372 \pm 141,6	1,07 \pm 0,38	81,3 \pm 34,1	1328 \pm 747,4	3,94 \pm 0,67	318,4 \pm 85
mes 3	≤ 2	278,5 \pm 103,6	1,15 \pm 0,41	80,9 \pm 31,7	1274 \pm 330	4,72 \pm 1,32	328,9 \pm 58,6
	$\geq 3A$	286,2 \pm 125,7	1,02 \pm 0,55	73,8 \pm 29	1133 \pm 252,4	3,92 \pm 1,51	282,4 \pm 94,6

*ANOVA de 1 factor con test posthoc de Tukey. Los valores que comparten un superíndice son estadísticamente significativos: ^{1a}: 0,045; ^{1b}: 0,05; ^{1c}: 0,02;

^{1d}: 0,05;

Tabla 24.- Distribución de los valores medios en el primer mes de C0 y C2, ajustados por dosis y peso, y del tiempo en alcanzar niveles terapéuticos en función la existencia de rechazo agudo de grado $\geq 3A$ de la ISHTL en el primer año postrasplante.

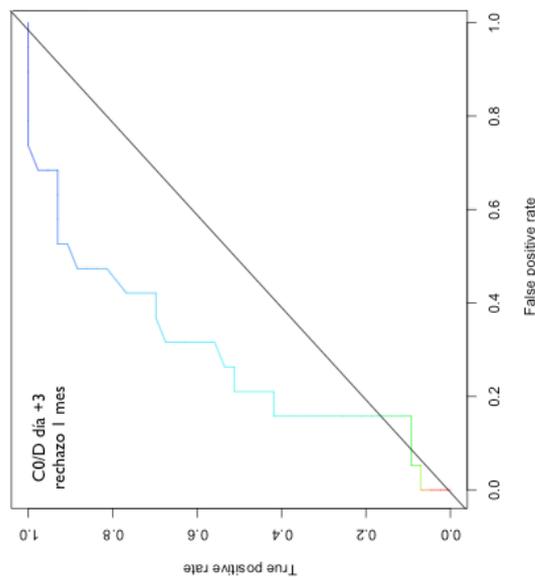
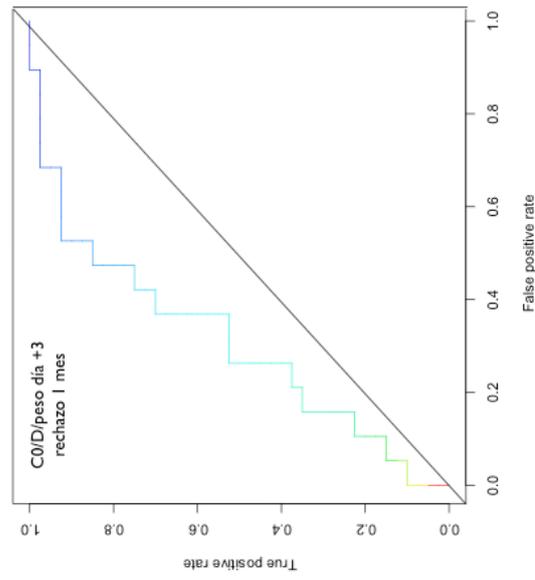
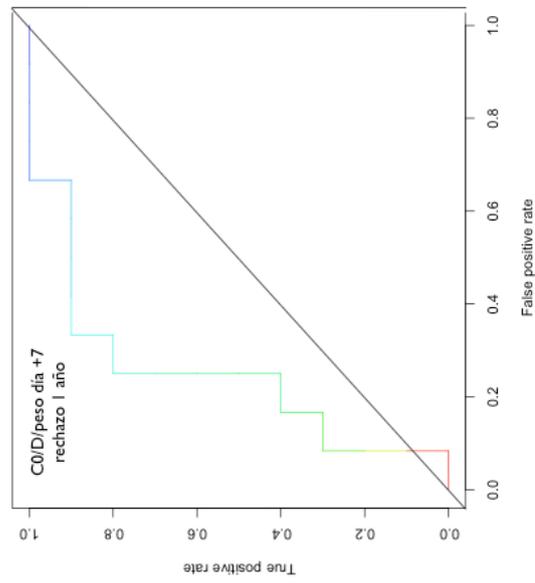
tiempo	ISHTL 1 año	C0 (ng.mL ⁻¹)	C0/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C0/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)	C2 (ng.mL ⁻¹)	C2/D (ng.mL ⁻¹ /mg)	C2/D/peso (ng.mL ⁻¹ /mg/kg)
día +3	≤ 2	118,7 \pm 48,5	0,58 \pm 0,33	41,24\pm23,2^a	547,6 \pm 264,5	2,54 \pm 1,67	140,4 \pm 86,5
	$\geq 3A$	101,2 \pm 83,6	0,46 \pm 0,34	30,2\pm19,2^a	710,6 \pm 524,7	2,68 \pm 1,01	138,4 \pm 66
día +5	≤ 2	154,9 \pm 78,5	0,56 \pm 0,25	41,2 \pm 17,2	1066 \pm 563,5	2,77 \pm 1,38	194,9 \pm 88,6
	$\geq 3A$	144,8 \pm 85,5	0,50 \pm 0,28	34,8 \pm 19,1	751,9 \pm 355,8	2,52 \pm 0,88	176,6 \pm 33,5
día +7	≤ 2	204,8 \pm 116,3	0,74 \pm 0,46	48,3 \pm 24,2	964,6 \pm 442,8	2,54 \pm 1,18	190,1 \pm 71,9
	$\geq 3A$	209,2 \pm 93,6	0,59 \pm 0,26	40,7 \pm 14,5	1148 \pm 393,6	2,45 \pm 0,82	180,6 \pm 47,8
día +10	≤ 2	301,9 \pm 152	0,87 \pm 0,51	59 \pm 36,3	1129 \pm 504,6	2,89 \pm 0,88	205,1 \pm 76,3
	$\geq 3A$	284,4 \pm 116,7	0,78 \pm 0,36	55,9 \pm 21	1243 \pm 376,7	3,27 \pm 0,71	219,8 \pm 35
día +14	≤ 2	327,7 \pm 116	1,02 \pm 0,49	75,2 \pm 42,5	1210 \pm 384,5	3,42 \pm 0,77	251,5 \pm 112,8
	$\geq 3A$	326,2 \pm 126,9	0,95 \pm 0,62	65,7 \pm 31,2	1038 \pm 327,6	3,02 \pm 1,26	204,9 \pm 62
día +21	≤ 2	304,5 \pm 102,5	1,05 \pm 0,51	75 \pm 43	1216 \pm 196	3,43 \pm 0,41	255,5 \pm 69,4
	$\geq 3A$	348 \pm 100,7	1,09 \pm 0,69	75,9 \pm 41,1	1214 \pm 415,5	3,84 \pm 1,57	262,1 \pm 87,8
día +28	≤ 2	341 \pm 130,9	1,14 \pm 0,36	79,2 \pm 29,4	1107 \pm 453,6	3,79 \pm 1,35	274 \pm 119,4
	$\geq 3A$	353 \pm 96,9	1,17 \pm 0,51	81,9 \pm 28,8	1201 \pm 418,9	3,87 \pm 1,35	268,1 \pm 49,8
mes 1	≤ 2	334,4 \pm 119,1	1,08 \pm 0,43	74,5 \pm 28	1320 \pm 342,1	3,87 \pm 1,64	273,8 \pm 78,3
	$\geq 3A$	352,1 \pm 132,7	1,16 \pm 0,44	81,9 \pm 29,7	1481 \pm 608,1	4,78 \pm 1,24	264 \pm 66,2
mes 3	≤ 2	277,3 \pm 11,7	1,14 \pm 0,41	83 \pm 35,4	1246 \pm 310,9	4,55 \pm 1,07	327,3 \pm 103,3
	$\geq 3A$	284,6 \pm 111,3	1,07 \pm 0,51	74,5 \pm 25,9	1220 \pm 323,8	4,43 \pm 1,73	303,9 \pm 77,6
mes 6	≤ 2	225,6 \pm 120,4	0,95 \pm 0,37	70,5 \pm 32,2	1032 \pm 376,8	4,04\pm0,88^b	299,3\pm106,4^c
	$\geq 3A$	221,3 \pm 74,3	0,93 \pm 0,45	68,1 \pm 40,5	822,4 \pm 311,8	3,43\pm0,6^b	242,7\pm54,4^c
mes 9	≤ 2	165,8 \pm 81,8	0,76 \pm 0,33	55,5 \pm 22,4	765 \pm 300,3	3,47 \pm 1,23	257,3 \pm 106,4
	$\geq 3A$	189 \pm 84,6	0,80 \pm 0,34	59,1 \pm 24,5	867,9 \pm 448,8	3,85 \pm 1,44	272,5 \pm 113
mes 12	≤ 2	148,6 \pm 58,3	0,71 \pm 0,25	51,5 \pm 19,6	748 \pm 286,6	3,35 \pm 1,06	234,4 \pm 69,4
	$\geq 3A$	170 \pm 56,6	0,69 \pm 0,22	50,9 \pm 15	873,6 \pm 355,1	3,74 \pm 0,97	267,5 \pm 76,2

*ANOVA de 1 factor con test posthoc de Tukey. Los valores que comparten un superíndice son estadísticamente significativos: ^{ab}: 0,05; ^{ab1}: 0,04; ^{ab2}: 0,03;

0.6.7. Curvas ROC para niveles de CsA e incidencia de rechazo.

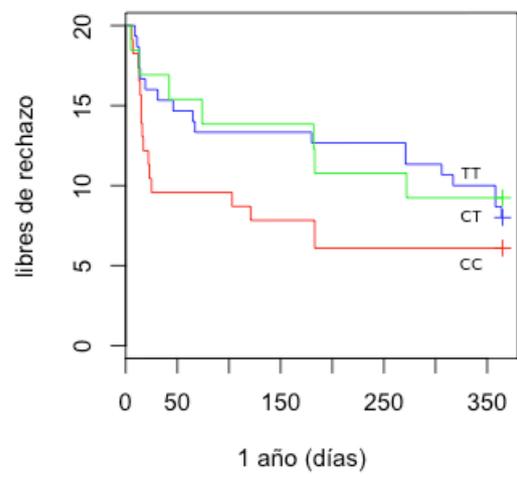
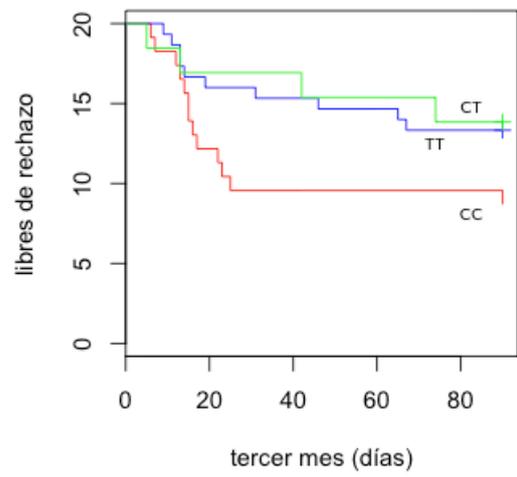
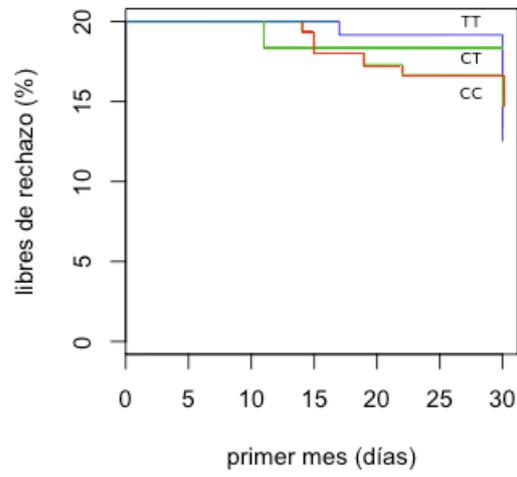
Se realizaron análisis mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*) con las variables cinéticas de la primera semana que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes que sufrió rechazo en comparación con el que no lo presentó en el primer mes (C0/D y C0/D/peso en el día +3, C2/D/peso en el día +7), tercer mes (C0/D y C0/D/peso en el día +3) y en el primer año postrasplante (C0/D/peso en el días +3).

Tan sólo tuvieron capacidad discriminativa las curvas ROC de C0/D (AUC=0,714; p=0,001; punto de corte=0,346 ng.mL⁻¹.mg⁻¹ y de C0/D/peso (AUC=0,696; p=0,003; punto de corte=23,67 ng.Kg. mL⁻¹.mg⁻¹) en el día +3 y de C2/D/peso en el día +7 (AUC=0,758; p=0,001; punto de corte=200,2 ng.Kg. mL⁻¹.mg⁻¹) para el rechazo al primer mes, como se puede apreciar en las figuras siguientes. Los índices de la restantes variables presentaron áreas bajo la curva que no diferían significativamente de 0,5.



0.6.8. Análisis actuarial de tiempo libre de rechazo.

Se analizó el tiempo libre de rechazo al primer mes, tercer mes y al año del trasplante en función de los genotipos de MDR1 C3435T y de las variables que resultaron significativas en el análisis discriminante con las curvas ROC. Para ello se recodificaron dichas variables en función de si los pacientes presentaban o no valores mayores de 0,346 ng. mL⁻¹.mg⁻¹ para C0/D y mayores de 23,67 ng.Kg. mL⁻¹.mg⁻¹ para C0/D/peso en día +3 y mayores de 202,2 ng.Kg. mL⁻¹.mg⁻¹ para C2/D/peso en el día +7. Sólo se observaron diferencias significativas para MDR1 C3435T en relación al tiempo libre de rechazo en el primer mes ($X^2=8,1$, $p=0.017$) como se puede ver en las siguientes gráficas.



0.6.9. Factores predictores de rechazo agudo precoz. Modelo de regresión logística para rechazo agudo.

Con el fin de crear un modelo que permitiese predecir el riesgo de rechazo agudo en el primer mes, se incluyeron en un análisis de regresión logística la edad y el género del receptor, el genotipo de MDR1, C0/D y C0/D/peso del día +3 y FEVI del receptor antes del trasplante. En la tabla 25 se muestran las diferentes variables y su contribución en el modelo. Las únicas variables que quedaron en el modelo final fueron el genotipo MDR1 y el género del receptor. De este modo, ser portador del genotipo TT supone un menor riesgo ($p=0,0237$) y el género mujer un mayor riesgo de presentar rechazo agudo en el primer mes postraplante ($p=0,0184$).

parámetro	Estimación (IC 95 %)	Error estándar	Z-value	p
<i>(intercept)</i>	0,696 (0,02-214,5)	2,286	0,305	0,7600
MDR1_CT	-1,467 (0,037-1,125)	0,847	-1,731	0,0835
MDR1_TT	-3,167 (0,011-0,451)	1,399	-2,262	0,0237
mujer_receptor	2,258 (1,655-7,753)	0,958	2,357	0,0184
edad_receptor	-0,032 (0,895-1,039)	0,037	-0,874	0,3823
C0/D del día +3	2,755 (0,003-5705)	4,119	0,669	0,5036
C0/D/peso del día +3	-0,042 (0,843-1,086)	0,063	-0,675	0,4994
FEVI	0,020 (0,962-1,086)	0,029	0,691	0,4894

0.7. Discusión

0.7.1. Incidencia de rechazo

En nuestra población se observa una incidencia de rechazo similar a la descrita en otros estudios[13][16]. Observamos que la mayor incidencia de rechazo significativo se producía en el primer mes, siendo máxima en las dos primeras semanas. Además, en los tres primeros meses ya se habían presentado el 70 % de todos los episodios de rechazo significativo que aparecen en el primer año de seguimiento. Estos datos apoyan los estudios que resaltan la importancia de analizar los factores relacionados con las primeras semanas tras la cirugía ya que pueden ser decisivos sobre los resultados del trasplante [13]. Uno de los factores que se ha postulado, como veremos más adelante, es el hecho de alcanzar concentraciones terapéuticas de inmunosupresores como la CsA en este periodo inicial.

0.7.2. Factores poblacionales y rechazo

Diversos trabajos han identificado factores que pueden condicionar los resultados del trasplante cardíaco sobre la incidencia de rechazo del injerto, infecciones oportunistas, de complicaciones no inmunológicas (insuficiencia renal, neoplasias) y/o la supervivencia del paciente, teniendo en cuenta su aparición tanto en una fase precoz (en el primer mes o tres primeros meses), temprana (en el primer año) como tardía (a partir del año de trasplante)[177]. En nuestro caso, consideramos que, para poder realizar un adecuado análisis farmacogenético, era imprescindible identificar aquellos factores demográficos, antropométricos y clínicos del donante y el receptor que mostrasen diferencias en relación a la incidencia de rechazo, con el fin de considerarlos como posibles cofactores en posteriores análisis.

Al comparar los pacientes que presentaron al menos un episodio de rechazo agudo significativo frente a los que estuvieron libres de rechazo significativo, sólo encontramos diferencias significativas en la FEVI del receptor antes del

trasplante y en el grupo ABO, edad y causa de muerte del donante.

La FEVI se determina mediante ecocardiograma Doppler y representa la capacidad funcional del miocardio del ventrículo izquierdo. La FEVI previa al trasplante fue menor para el grupo de pacientes presentaron algún episodio de rechazo significativo en el primer mes postrasplante. Esto podría explicarse porque habrían llegado al trasplante en muy mala situación cardiogénica ya que tener una FEVI <20% es un criterio para la indicación de trasplanta urgente [5].

Por otro lado, se ha visto que la edad del donante puede tener especial trascendencia en la evolución del trasplante. En nuestro caso, la edad del donante fue mayor en el grupo de pacientes que presentaron algún rechazo significativo tras un año del trasplante. Esto podría deberse a que el corazón de estos donantes de mayor edad podría presentar lesiones ateroscleróticas o vasculopatía coronaria que, junto a la respuesta inmune que media el rechazo agudo, condicionase una peor respuesta al tratamiento inmunosupresor [110].

En nuestra población de estudio, la hemorragia cerebral fue la causa principal de muerte entre el grupo de pacientes que presentaron algún rechazo significativo en el primer año postrasplante frente a los pacientes que no lo presentaron. Este hecho está de acuerdo con lo publicado por otros autores, que lo sitúan entre uno de los factores relacionados con la evolución del trasplante [177]. En modelos animales de hemorragia cerebral se produce el reflejo de Cushing que conlleva un incremento de la presión arterial sistémica de hasta 400/250 mmHg y taquicardia de hasta 250 lpm precedida por un corto periodo de bradicardia. Concomitante se produce un incremento del gasto cardíaco y de las resistencias vasculares periféricas. Estos cambios son reversibles tras unos 45 minutos, pero en el caso de que la muerte cerebral se haya debido a hemorragia, se prolongan durante más tiempo. Entonces se añaden cambios específicos como el aumento dramático de la presión intracraneal y la alteración en los niveles plasmáticos de triyodotironina (T3), levotiroxina (T4) y la hormona antidiurética (ADH). Podría existir una posible relación entre la edad y la causa de muerte del donante

(siendo una de las dos un simple factor de confusión), ya que la mayoría de hemorragias cerebrales se producen en los donantes de mayor edad, mientras que los traumatismos craneoencefálicos por accidentes de tráfico son más frecuentes en los donantes jóvenes.

La edad del receptor es un importante factor que ha sido relacionado con la supervivencia del paciente trasplantado [222, 155]. En nuestra población, observamos que el grupo de pacientes que sufrieron algún rechazo agudo significativo en el primer año postrasplante presentaba una edad media mayor en el momento del trasplante que el grupo que libre de rechazo, aunque estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Según datos del registro español del trasplante cardíaco y otras series, una edad del receptor mayor de 65 años en el momento del trasplante se asocia a una mayor mortalidad precoz y tardía [4, 139]. Tjang y cols. observaron mayor mortalidad al mes postrasplante, principalmente por rechazo, infección, fallo cardíaco o multiorgánico, en pacientes mayores de 55 años [205].

También se ha descrito que el género femenino del donante parece estar ligado a un mayor número de complicaciones postrasplante [206]. Existen varias hipótesis que intentan explicar este fenómeno, la primera podría ser un tamaño desigual, ya que la diferencia entre el peso del donante y del receptor no debería exceder el 20 %, pero aún manteniendo esta relación, el corazón de una mujer presenta un ventrículo izquierdo menor [177]. En nuestro estudio, la mayoría de los donantes fueron hombres y el análisis por rechazos no mostró diferencias estadísticamente significativas en la frecuencias de género. Es posible, que el escaso número de donantes de género femenino un motivo por el que no se observaran diferencias lo que haría difícil extraer conclusiones en nuestra población.

Un tiempo de isquemia del injerto mayor de 240 minutos parece estar asociado con disminución de la supervivencia a un año [199]. En nuestro estudio, el tiempo de isquemia medio estuvo por debajo de esta cifra, dentro de los márgenes de calidad. Al igual que otros autores encontramos diferencias entre la duración de la isquemia y el rechazo agudo, sin embargo esta diferencia no fue

significativa estadísticamente [138].

Los avances en los regímenes inmunosupresores han hecho posible disminuir la incidencia de rechazo y mejorar el manejo del paciente trasplantado, con progresivo aumento de la supervivencia. Las complicaciones postrasplante continúan limitando el beneficio que supone el trasplante cardíaco. Nosotros no encontramos diferencias significativas entre los distintos esquemas en relación a la incidencia de rechazo en el primer año postrasplante. En este mismo sentido, Agüero y cols, en un trabajo reciente con pacientes trasplantados cardiacos en otro centro de España, no observaron diferencias en la incidencia de rechazo entre los diferentes regímenes inmunosupresores utilizados [1].

La necesidad de mantener niveles en sangre de inmunosupresores aumenta el riesgo a sufrir infecciones. En los últimos años, se han introducido nuevos regímenes para la prevención y tratamiento de infecciones oportunistas, que han disminuido considerablemente el número de infecciones y han retrasado su presentación. Sin embargo las infecciones continúan siendo la mayor causa de reingreso en el hospital en el primer año postrasplante [198]. En nuestro trabajo las infecciones también fueron la complicación más frecuente. La incidencia de hipercolesterolemia aunque con menor que la que publican otros autores[198], la causa suele ser multifactorial, incluyendo historia de cardiopatía isquémica, tratamiento con prednisona, altas cifras de glucosa en sangre, sobrepeso. Una gran parte de los pacientes trasplantados desarrollan hipertensión arterial, neurotoxicidad, osteoporosis y tumores, siendo ésta la mayor causa de muerte tardía, fruto del tratamiento crónico con inmunosupresores.

0.7.3. Nuevas dianas obtenidas por Biología Computacional

El análisis realizado con las herramientas de Biología Computacional para buscar posible dianas que permitan el genotipado de nuevos SNPs relacionados con la farmacodinamia de la CsA mostró tres genes candidatos: PPIA, PRKCZ y NFATC1. Las principales limitaciones de este tipo de estrategia son la escasez

de polimorfismos que cumplan todos los requisitos impuestos (región codificante, no sinónimos, frecuencia alélica >0.2 , predicción de alteración funcional en la proteína, y contenido de dianas para enzimas de restricción que contengan la región variable a analizar) y la falta de información en la literatura que apoye las hipótesis establecidas sobre su implicación en el mecanismo de acción del fármaco.

PPIA (peptidylprolyl isomerase A)

⁵⁵ Es un gen que codifica una proteína citosólica conocida como ciclofilina A a la que se une la CsA. Forma parte de una de las tres familias de proteínas conocidas como peptidyl-prolyl cis/trans isomerasas (PPIasas) cuya función es la de catalizar la isomerización cis-trans de los puentes peptídicos imídicos de la prolina y acelerar así el empaquetado de la proteína. Otras PPIasas son la familia de proteínas de unión a TAC (FKBPs) y las parvulinas. La inmunosupresión producida por la CsA se produce gracias a la acción del complejo formado entre CsA-ciclofilina que actúa inhibiendo la activación de NFAT por la calcineurina. La ciclofilina A es una proteína altamente conservada que se mantiene con un nivel alto en las células de mamíferos. Colgan y cols. realizaron un estudio con ratones en el que demostraron que, a pesar de que las células mamíferas expresan múltiples ciclofilinas, PPIA es la predominante, si no la única mediadora del efecto inmunosupresor[41].

PRKCZ

Otro gen seleccionado para genotipar un polimorfismo fue PRKCZ⁵⁶ (*protein kinase C, zeta*) cuya proteína es miembro de la familia PKC serina/treonina quinasas las cuales están involucradas en una variedad de procesos celulares tales como proliferación, diferenciación y secreción. De este modo, tanto las propiedades bioquímicas como su estructura muestran que esta subespecie zeta

⁵⁵Tiene otros alias (CYPA, CYPH, MGC117158, MGC12404, MGC23397, PPIase A) y designaciones (*T cell cyclophilin; cyclosporin A-binding protein; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A; peptidylprolyl isomerase A; rotamase A*).

⁵⁶Tiene otros alias: PKC-ZETA y PKC2.

está relacionada, pero es distinta a las otras isoenzimas de PKC. A diferencia de la isoenzima clásica de la PKC dependiente de calcio, PKC zeta exhibe una actividad quinasa independiente del calcio y del diacilglicerol, siendo insensible a los clásicos inhibidores de la PKC. En cuanto a su estructura, tan sólo se parece a PKC en que muestra solo un motivo de dedo de zinc. El *splicing* alternativo produce múltiples variantes en la transcripción de este gen, dando lugar a diferentes isoformas. No hemos encontrado ningún estudio que relacione este gen con exposición a CsA ni con el rechazo en pacientes sometidos a trasplante. Existen algunos trabajos publicados sobre la asociación de PRKCZ y diabetes tipo 2[119][187].

NFATC1

NFATC⁵⁷ (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1*) es el gen que codifica para la proteína NFATc1. Esta proteína pertenece a una familia de factores de transcripción, integrada por 5 miembros, de los cuales NFATc1, NFATc2, NFATc3 y NFATc4 se expresan en el citoplasma de células en reposo mientras que NFATc5, se caracteriza por presentar una localización constitutivamente nuclear. Desde un punto de vista estructural, los distintos NFATs, son proteínas que presentan dos secuencias de gran homología entre los diferentes miembros: a) el dominio de unión a ADN (DNA binding domain 'DBD'), que presenta una homología moderada con la DBD de la familia de proteínas Rel (NF κ B); b) la región homóloga para NFAT (NFAT homology region 'NHR'), situada en el extremo amino terminal de la proteína y que constituye su dominio principal que regula su transactivación. Los NFATs expresados en el citoplasma de células en reposo se translocan al núcleo tras la activación celular, donde forman un complejo compuesto por la unidad citosólica, integrada por los propios miembros de la familia de NFAT, y la unidad nuclear, que se asocia con estos miembros y que puede estar formada por el factor de transcripción AP1, cuya

⁵⁷Tiene otros alias (MGC138448, NF-ATC, NFAT2, NFATc) y designaciones (NFAT *transcription complex cytosolic component; nuclear factor of activated T-cells, cytosolic component 1*).

interacción con NFAT ha sido bien caracterizada, aunque también se ha descrito asociación con los factores GATA4 y cMAF[146]. Funcionalmente, NFAT juega un papel fundamental en la inducción de la transcripción de algunos genes que son críticos en la respuesta inmune. NFAT se identificó en células T como un complejo inducible que se unía al elemento de respuesta a antígeno del promotor del gen de la interleucina 2 (IL-2). Hoy día se sabe que NFAT también está implicado en la regulación de la expresión de otros muchos genes, tanto dentro del sistema inmune, como fuera de él. Así, está claramente determinado su papel en la expresión de las citocinas IL2, IL4, TNF- α , GM-CSF, e IFN- γ en células T o de receptores de superficie como FasL o CD40L, existiendo también evidencias de su implicación en la regulación de la expresión de IL-3 e IL-5 en células T, de TNF- α en células B o de IL-4 e IL-5 en mastocitos[111][149]. Dado el papel central que estas citocinas desempeñan en el control y desarrollo de funciones efectoras y reguladoras del sistema inmune, es comprensible que la inhibición de NFAT y, por consiguiente, también de la expresión de los genes que regula, tenga efectos tan dramáticos en el funcionamiento del sistema inmune y conduzca a situaciones de inmunosupresión.

Ésta es una buena diana molecular para fármacos inmunosupresores tales como la CsA. No hemos encontrado ningún trabajo publicado que relacione las diferentes variables polimórficas de NFATC1 con la exposición a CsA ni con la incidencia de rechazo en pacientes trasplantados. Los trabajos publicados en humanos muestran el efecto de la CsA y NFATC1 en relación al metabolismo del hueso[219][183]. En nuestra población, la distribución alélica para el SNP 751G>T no explicó la incidencia de rechazo. Sin embargo cuando analizamos la influencia del genotipo de NFATC1 sobre los parámetros farmacocinéticos observamos cómo los pacientes portadores del genotipo GG presentan mayor exposición a la CsA y mayor frecuencia de infecciones oportunistas en comparación con los homocigotos para el alelo T. Estos hallazgos están en consonancia con un par de trabajos publicados recientemente y que proponen una novedosa estrategia para la monitorización de la CsA, basada en la cuantificación de la

expresión de los genes regulados por NFAT. De este modo, Sommerer y cols. estudiaron en el tiempo 0 y 2h post- dosis la relación entre la expresión de 18 genes regulados por NFAT como variable predictora de infecciones, controlada con parámetros clínicos y farmacocinéticos. Observaron que aquellos pacientes que presentaron menor expresión génica tenían menor número de infecciones, resultando esta correlación mejor que la establecida con las concentraciones plasmáticas del fármaco[179]. Este mismo grupo demostró que la monitorización de los productos génicos que regula NFAT puede ser una nueva herramienta para predecir el riesgo de rechazo, de modo que un incremento en la expresión residual del gen NFAT puede indicar un rechazo agudo[178].

0.7.4. Frecuencias alélicas

Se conoce que existe una gran variabilidad interracial en las frecuencias alélicas de los polimorfismos de genes implicados en la farmacocinética. Estas diferencias podrían justificar algunas de las discrepancias en los estudios publicados hasta la fecha, por lo que consideramos importante comparar nuestros resultados con los de otras poblaciones, con el fin de realizar un análisis crítico más exhaustivo.

En la distribución de alelos para MDR1 3435G>A hay grandes diferencias entre las distintas razas. En población afroamericana es mucho más predominante el alelo C que en población caucásica, esto implica que la mayoría de las personas de origen afroamericano presentan un genotipo CC, asociado a mayor expresión de glicoproteína P, en cambio en asiáticos existe una baja frecuencia para el alelo C. En consecuencia, estas variaciones influyen en la biodisponibilidad de muchos fármacos, entre ellos la CsA. Las frecuencias alélicas encontradas en nuestro trabajo son equivalentes a las publicadas en otros trabajos realizados en población caucásica. Bernal y cols, estudian la distribución de frecuencias para C3435T de MDR1 en población española, siendo similar a las frecuencias alélicas observadas por nosotros para este SNP [19]. Para CYP3A4(*1B/*1) observamos una frecuencia de 7,4% para el alelo menor (CYP3A4*1B), sin encontrar

diferencias significativas con lo publicado por otros autores en poblaciones similares a la nuestra. Así, en población portuguesa se ha observado frecuencias para CYP3A4*1B entre el 6,4 % [144] y 4 % [36]. Gervasini y cols. observaron en población española una frecuencia de 4,2 %, ligeramente inferior a la observada en nuestro estudio [62]. En trabajos publicados anteriormente, se ha observado, que el alelo CYP3A5*1 se muestra con mucha mayor frecuencia en pacientes de origen africano, presentándose el alelo CYP3A5*1 en un 70-80 % de los casos, mientras que en caucásicos ronda solamente el 10 % . En nuestro estudio el alelo CYP3A5*1 presentó una frecuencia de 11,94 %, similar a la encontrada en otras poblaciones caucásicas [62]. Entre nuestros pacientes no hubo ningún homocigoto *1/*1, lo que está de acuerdo con datos publicados anteriormente donde se muestra que este genotipo aparece en caucásicos, en menos de 1 % . La frecuencia alélica encontrada en nuestro estudio para NFACTC1 751 G>T (36 %) fue intermedia entre la publicada en HapMap para población europea (52 %) y asiática (46 %). La población africana-subsahariana es la que presenta la frecuencia alélica menor (17 %).

0.7.5. Genotipo, farmacínética y rechazo

Como ha quedado reflejado en la introducción, existen algunas discrepancias en los resultados de los diferentes trabajos publicados hasta la fecha que analizan aspectos genéticos, farmacocinéticos y farmacodinámicos de la CsA en pacientes trasplantados (bien sea como incidencia de rechazo o como aparición de infecciones y otras complicaciones no inmunológicas secundarias al fármaco). A nuestro parecer, los factores a tener en cuenta para poder realizar un adecuado análisis de los mismos son: 1) las características de la población (tanto la raza/etnia como el tipo de trasplante influyen en los efectos observados sobre los aspectos farmacogenéticos y farmacocinéticos, así como los relacionados con las peculiaridades de cada tipo de trasplante y los mecanismos de rechazo agudo, que pueden diferir entre órganos); 2) la naturaleza de las variables consideradas para el análisis farmacocinético y de resultados, principalmente el tiempo en el

que se realizan las determinaciones, ya que no es lo mismo realizar el análisis en las semanas que siguen al trasplante que meses e incluso años después de la cirugía -lo que se denomina en la mayoría de estos trabajos 'estado de equilibrio'-). Nosotros hemos observado que el genotipo de MDR1 C3435T se relaciona con diferentes niveles de CsA y determina diferencia en el riesgo de rechazo agudo durante el primer mes postraplante. Este resultado es similar al publicado por Barnard y cols. en pacientes trasplantados cardiacos, encontrando relación entre el polimorfismo en C3435T y la incidencia de rechazo [16]. Estos autores encontraron que los pacientes con genotipo CC tenía un riesgo 1,8 veces mayor de rechazar en el primer año postrasplante que los portadores del genotipo TT. Sin embargo, Von Ahsen y cols. no encontraron diferencias entre ambos genotipos en pacientes trasplantados renales[210]. Bonhomme-Faivre y cols tampoco observaron diferencias la incidencia de rechazo hepático, confirmado por biopsia, en función de los distintos genotipos de MDR1 C3435T[25].

En relación a CYP3A5*1/*3 y CYP3A4*1/*1B, no encontramos ningún efecto sobre la incidencia de rechazo. El motivo podría ser que el bajo número de portadores del alelo menor que encontramos dificultase el análisis estadístico por insuficiente buena poder estadístico. Existen pocos trabajos en la literatura que analicen la relación de estos polimorfismos y la incidencia de rechazo. Hesselink y cols. no encontraron diferencias significativas entre los portadores del alelo CYP3A5*1 frente a CYP3A5*3 y la incidencia de rechazo en pacientes trasplantados renales[83]. Von Ahsen y cols observaron, en trasplantados renales de origen caucásico en situación estable, una incidencia de rechazo similar en los portadores del alelo CYP3A4*1B en comparación con los homocigotos para el alelo CYP3A4*1 [210].

A diferencia de nuestro trabajo, la mayoría de los estudios llevados a cabo en diferentes poblaciones de pacientes trasplantados no encontraron relación entre diferentes polimorfismos de MDR1, CYP3A4 y CYP3A5 y los diferentes parámetros farmacocinéticos de la CsA [83, 75, 9, 210, 132, 124, 77, 112, 81].

Hesselink y cols. realizaron un estudio con 110 pacientes (87 caucásicos, 11

negros y 12 asiáticos) que habían sido trasplantados renales al menos 1 año antes y que estaban tratados con CsA. Al evaluar el efecto de MDR1 C3435T, CYP3A4*I/*1B y CYP3A5*1/*3 sobre los valores de C₀ y C₀/D, ajustada por dosis y peso, a los 3 y 12m no encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los polimorfismos.[83]Haufroid y cols. estudiaron en 50 pacientes trasplantados renales de origen caucásico el efecto de MDR1 C3435T, MDR1 C1236T y CYP3A5*1/*3 sobre los requerimientos de dosis de la CsA y los valores de C₀, C₀/D, en relación a la última dosis y a la dosis/día, todos ellos en fase estable del trasplante[75]. Observaron que los valores de C₀/D fueron menores en los portadores del alelo CYP3A5*1, sólo significativo cuando consideró la última dosis de ciclosporina administrada y no la dosis/día en fase estable. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los polimorfismos de MDR1 por separado ni cuando se realizó el análisis por haplotipos. Anglicheau y cols. estudiaron en 100 pacientes de origen caucásico trasplantados renales en situación estable la influencia de los polimorfismos MDR1 (T-129C,C1236T, G2677(T/A),C3435T) y CYP3A5*1/*3 sobre los valores de C₀, C_{max}, AUC_{0-4h}, AUC_{0-12h}, en valores absolutos y normalizados por la dosis[9]. Tan sólo encontraron una asociación débil entre MDR1 C1236T y los valores de C_{max}/D y AUC_{0-4h}/D, que no parece ser suficiente para la optimización de la dosis en la práctica clínica. Ninguno de los parámetros farmacocinéticos se asoció con CYP3A5*1/*3. Von Ahsen y cols. realizaron un estudio con 124 trasplantados renales de origen caucásico en situación estable (tras más de 6 meses de la cirugía) que tomaban CsA como principal inmunosupresor. Analizaron el efecto del genotipo C3435T de MDR1 y CYP3A4-V sobre la dosis, C₀, dosis/peso, C₀/D y el número de rechazos, teniendo en cuenta otras variables que podían influir como las concentraciones plasmáticas de creatinina, tiempo desde el trasplante y dosis de corticosteroides. Aunque la distribución alélica para ambos SNPs fue similar a la de otras poblaciones caucásicas, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables estudiadas al analizar por los diferentes genotipos[210]. Min y cols. llevaron a cabo un análisis en 14

voluntarios sanos, de los cuales 11 eran de origen afroamericano y 3 caucásico, del efecto de MDR1 C3435T y CYP3A4*1/*1B sobre la cinética de absorción de la CsA (AUC_{0-24h}, T_{max}, C_{max}, t_{1/2} y Cl/F). Encontraron que los portadores del alelo CYP3A4*1 presentaron mayores valores de AUC/D y menores de Cl/F. Respecto a MDR1, aunque la C_{max} y AUC en el grupo de C/T y T/T fue 15% y 22% mayor que en el grupo C/C, ninguno de estas diferencias fue estadísticamente significativa[132][132]. Mai y cols. realizaron, en 98 pacientes trasplantados renales de origen caucásico, un análisis retrospectivo del efecto de diferentes haplotipos de MDR1 sobre la farmacocinética de CsA en situación estable (al menos 6 meses postrasplante). No se observaron diferencias en el análisis por haplotipos sobre los valores de C₀, C₂ ni AUC_{0-12h}[124]. Hebert y cols. analizaron en 89 pacientes trasplantados de hígado de origen caucásico la asociación entre MDR1 G2677(T/A) y MDR1 C3435T sobre los valores de C₀, D y C₀/D en estado estable (los primeros 3 años postrasplante) sin encontrar diferencias estadísticamente significativas[77]. Kuzuya y cols. realizaron un estudio en 97 pacientes trasplantados renales de origen asiático, en los que se analizó el efecto de MDR1 (T-129C, C1236T, G2677(T/A), C3435T). El intervalo desde el trasplante fue de 2-17 años (media 7 años). Los parámetros farmacocinéticos analizados fueron AUC 0-2h, C_{max} y C_{min}. Estos autores no observaron diferencias entre la dosis requerida de CsA y los polimorfismos estudiados de MDR1[112].

Sin embargo otros trabajos sí encuentran dicha relación entre diferentes polimorfismos de MDR1, CYP3A4 y CYP3A5 y los diferentes parámetros farmacocinéticos de la CsA. De este modo, el trabajo realizado por Balram y cols. en un subgrupo de pacientes asiáticos trasplantados cardiacos demostró que los pacientes con genotipo CC presentaban una AUC_{0-4h} un 11% menor que los portadores del genotipo TT [15]. En otro estudio que se llevó a cabo en pacientes trasplantados hepáticos, los portadores del genotipo TT presentaron una mayor concentración C₂/D/peso en los primeros días y al mes del trasplante [25]. Chowbay y cols. analizaron en 275 voluntarios sanos y 14 pacientes trasplanta-

dos cardiacos de origen asiático la influencia de MDR1 (C1236T, G2677(T/A), C3435T) y CYP3A4*1/*IB sobre los valores de AUC 0-12h, AUC 0-4h, C_{max} y C_{min} en situación estable tras el trasplante. Encontraron que los valores de AUC 0-12h, AUC 0-4h y C_{max} fueron mayores en los pacientes que presentaban el haplotipo T-T-T de MDR1[40]. En la misma línea, Barnard y cols. observaron que fueron necesarias mayores dosis de CsA para los portadores CC frente a CT y TT a los 3 y 12 meses postrasplante [16]. Nosotros observamos en la primera semana, que el genotipo TT presentaba mayores concentraciones C₀, comparada con los genotipos CT y CC, datos que se confirmaron también para el primer mes. Al año postrasplante la diferencia se hizo evidente no solo para C₀ sino también para C₀/D y C₀/D/peso y se observaron menores tiempos en alcanzar los rangos terapéuticos. Sin embargo, en nuestra población no observamos diferencias significativas en los parámetros cinéticos analizados para los SNP del CYP3A4 y CYP3A5.

Cuando analizamos la relación entre los parámetros farmacocinéticos y la incidencia de rechazo encontramos que valores bajos de CsA en la primera semana tras la cirugía se relacionaban con una mayor incidencia de rechazo agudo en el primer mes postrasplante. Aumente y cols. también encontraron una asociación similar en 70 pacientes trasplantados cardíacos, de modo que aquellos que tuvieron valores de C₀ menores a 150 ng/ml en la primera semana presentaron mayor frecuencia de rechazo agudo en el primer año postrasplante[13]. Barnard y cols. analizaron en 170 trasplantados cardíacos el efecto de MDR1 C3435T y MDR1 G2677T/G sobre los valores de D/peso, C₀, C₀/D y C₀/D/peso sobre la incidencia de rechazo agudo significativo confirmado por biopsia. Encontraron una relación significativa entre el polimorfismo C3435T y rechazo, de modo que los portadores del genotipo CC rechazaban 1,8 veces más en el primer año postrasplante. El análisis por haplotipos mostró que el riesgo de sufrir un rechazo agudo en el primer año fue 2,18 veces mayor GG/CC que con GT/CT y TT/TT. En el análisis multivariable solamente MDR1 C3435T fue factor de riesgo independiente. La D/peso a los 3 y 12 meses fue mayor para CC que para

CT y TT[16]. Nosotros no encontramos un valor de CsA con suficientemente sensibilidad y especificidad como para discriminar en un análisis temporal los pacientes en función del riesgo de sufrir rechazo en este periodo. Sin embargo, los genotipos de MDR1 C3435T sí fueron útiles, permitiendo discriminar a la población que sufriría un rechazo agudo en el primer mes postrasplante. De este modo, como se puede ver en el análisis temporal efectuado y en el modelo predictivo elaborado mediante análisis de regresión logística, ser portador del genotipo TT supone un menor riesgo de rechazo en el primer mes postrasplante frente a los portadores del genotipo CT y CC.

0.8. Conclusiones

0.8.1. Conclusión principal

El polimorfismo de nucleótido único MDR1 3435G>A determina la variabilidad interindividual en el comportamiento farmacocinético de la CsA en la primera semana y la tasa de rechazo agudo en el primer mes en pacientes adultos sometidos a un primer trasplante cardíaco.

0.8.2. Conclusiones secundarias

1) La incidencia de rechazo agudo significativo en el primer año postrasplante fue mayor al 50 %, siendo máxima en el primer mes tras la cirugía.

2) Los factores demográficos y clínicos relacionados con una mayor incidencia de rechazo agudo en el primer mes, tercer mes y el primer año postrasplante fueron una baja fracción de eyección del ventrículo izquierdo del receptor antes del trasplante, así como una mayor edad, el grupo sanguíneo A y la hemorragia intracraneal como causa de muerte en el donante.

3) Ser portador del genotipo TT para el polimorfismo MDR1 C3435 se asocia a un menor riesgo de rechazo agudo en el primer mes postrasplante frente a los portadores de los genotipos CT y CC.

4) El genotipo TT para el polimorfismo MDR1 C3435 se asocia a la presencia de concentraciones más altas de ciclosporina en la primera semana postrasplante así como a una mejor absorción de la misma frente a los portadores de los genotipos CT y CC.

5) Concentraciones bajas de CsA en la primera semana postrasplante se asocian a una frecuencia mayor de rechazo agudo en el primer mes postrasplante.

6) Estrategias basadas en Biología Computacional pueden ayudar a seleccionar posibles genes candidatos para realizar estudios farmacogenéticos.

Nomenclatura

6-MP 6-Mercaptopurina

ABCB1 ATP-binding cassette sub-family B member 1

AMR Anticuerpos mediadores de rechazo

ARNm ARN mensajero

ARNt ARN de transferencia

AUC0-12h Area bajo la curva 0-12h

AZA Azatioprina

BAS Basiliximab

BEM Biopsia Endomiocardica

BIND Biomolecular Interaction Network Database

C0 Concentracion pre-dosis

C2 Concentracion a las 2 h de la dosis

Cl Aclaramiento

Cmax Concentracion maxima

CMV Citomegalovirus

CNV Copy number variant

CsA	Ciclosporina A
Css	Concentracion en estado de equilibrio
CYP3A4	Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipeptido 4
CYP3A5	Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipeptido 5
D	Dosis
DAC	Daclizumab
DAI	Desfibrilador automático implantable
ECG	Electrocardiograma
EVE	Everolimus
FEVI	Fraccion de eyeccion del ventriculo izquierdo
FKBP	FK506 binding protein
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrofagos
GR	Receptores de Glucocorticoides
GST	Glutation-S-tranferasa
HGMD	Human Gene Mutation Database
HLA	Human leukocyte antigen
HMM	Hidden Markov Models
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
iHOP	Information Hyperlinked over Proteins
IL-1	Interleukina 1
IL-2	Interleukina 2
IL-6	Interleukina 6

ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MMF	Micofenolato mofetil
MPA	Acido micofenolico
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK	Natural Killer
NYHA	New York Heart Association
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
P-gp	P-glicoproteina
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism
PPIA	peptidylprolyl isomerase A
PRKCZ	protein kinase C zeta
SNP	Polimorfismos de nucleótido único
SRL	Sirolimus
TAC	Tacrolimus
tC0	Tiempo en alcanzar concentracion pre-dosis en rango terapéutico.
tC2	Tiempo en alcanzar concentraciones a las 2 h postdosis en rango terapeutico.

TNF Factor de necrosis tumoral

TPMT Tiopurina S-metil transferasa

UDP-GT Uridina difosfato glucuronotransferasa

Bibliografía

- [1] Jaime Agüero, Luis Almenar, Luis Martínez-Dolz, Jose A Moro, Joaquín Rueda, Rafael Raso, Carlos Chamorro, Juan M Sanchez, and Antonio Salvador. Influence of immunosuppressive regimens on short-term morbidity and mortality in heart transplantation. *Clinical transplantation*, 22(1):98–106, Jan 2008.
- [2] Blaise T F Alako, Antoine Veldhoven, Sjoef van Baal, Rob Jelier, Stefan Verhoeven, Ton Rullmann, Jan Polman, and Guido Jenster. Copub mapper: mining medline based on search term co-publication. *BMC Bioinformatics*, 6:51, Jan 2005.
- [3] Réka Albert. Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci*, 118(Pt 21):4947–57, Nov 2005.
- [4] L Almenar, M L Cardo, L Martínez-Dolz, C García-Palomar, J Rueda, E Zorio, M A Arnau, A Osa, and M Palencia. Risk factors affecting survival in heart transplant patients. *Transplant Proc*, 37(9):4011–3, Nov 2005.
- [5] Luis Almenar and Grupos Españoles de Trasplante Cardíaco. [spanish heart transplantation registry. 16th official report of the spanish society of cardiology working group on heart failure, heart transplantation, and associated therapies]. *Revista española de cardiología*, 58(11):1310–7, Nov 2005.

- [6] Luis Almenar-Bonet and Spanish Working Groups on Heart Transplantation. [spanish heart transplantation registry. 18th official report of the spanish society of cardiology working group on heart failure, heart transplantation and associated therapies (1984-2006)]. *Revista española de cardiología*, 60(11):1177–87, Nov 2007.
- [7] G Anderer, M Schrappe, A M Brechlin, M Lauten, P Muti, K Welte, and M Stanulla. Polymorphisms within glutathione s-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, 10(8):715–26, Nov 2000.
- [8] M A Andrade and P Bork. Automated extraction of information in molecular biology. *FEBS Lett*, 476(1-2):12–7, Jun 2000.
- [9] Dany Anglicheau, Eric Thervet, Isabelle Etienne, Bruno Hurault De Ligny, Yannick Le Meur, Guy Touchard, Matthias Büchler, Pierre Laurent-Puig, David Tregouet, Philippe Beaune, Ann Daly, Christophe Legendre, and Pierre Marquet. Cyp3a5 and mdr1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 75(5):422–33, May 2004.
- [10] A A Ansari, A Mayne, J B Sundstrom, M B Gravanis, K Kanter, K W Sell, F Villinger, C O Siu, and A Herskowitz. Frequency of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (hpert-) t cells in the peripheral blood of cardiac transplant recipients. a noninvasive technique for the diagnosis of allograft rejection. *Circulation*, 92(4):862–74, Aug 1995.
- [11] A C Anyanwu, E R Townsend, N R Banner, M Burke, A Khaghani, and M H Yacoub. Primary lung carcinoma after heart or lung transplantation: management and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124(6):1190–7, Dec 2002.
- [12] T Aoyama, S Yamano, D J Waxman, D P Lapenson, U A Meyer, V Fischer, R Tyndale, T Inaba, W Kalow, and H V Gelboin. Cytochrome p-450

- hpcn3, a novel cytochrome p-450 iiiA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hpcn1 and hpcn3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol Chem*, 264(18):10388–95, Jun 1989.
- [13] M D Aumente, J M Arizón, J Segura, A López, R Albornoz, M Cárdenas, and C Segura. Relationship between pharmacokinetic parameters of cyclosporin and the incidence of acute rejection after heart transplantation. *Transplant Proc*, 37(9):4014–7, Nov 2005.
- [14] T M Aziz, M I Burgess, A El-Gamel, C S Campbell, A N Rahman, A K Deiraniya, and N A Yonan. Orthotopic cardiac transplantation technique: a survey of current practice. *Ann Thorac Surg*, 68(4):1242–6, Oct 1999.
- [15] C Balram, A Sharma, C Sivathasan, and Edmund J D Lee. Frequency of c3435t single nucleotide mdr1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *British journal of clinical pharmacology*, 56(1):78–83, Jul 2003.
- [16] James B Barnard, Steven Richardson, Stephen Sheldon, James Fildes, Vera Pravica, Ian V Hutchinson, Colm T Leonard, and Nizar Yonan. The mdr1/abcb1 gene, a high-impact risk factor for cardiac transplant rejection. *Transplantation*, 82(12):1677–82, Dec 2006.
- [17] M Bellet, C Cabrol, P Sassano, P Léger, P Corvol, and J Ménard. Systemic hypertension after cardiac transplantation: effect of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Cardiol*, 56(15):927–31, Dec 1985.
- [18] A Beniaminovitz, S Itescu, K Lietz, M Donovan, E M Burke, B D Groff, N Edwards, and D M Mancini. Prevention of rejection in cardiac transplantation by blockade of the interleukin-2 receptor with a monoclonal antibody. *N Engl J Med*, 342(9):613–9, Mar 2000.

- [19] Maria Luisa Bernal, Blanca Sinues, Ana Fanlo, and Esteban Mayayo. Frequency distribution of c3435t mutation in exon 26 of the *mdr1* gene in a spanish population. *Therapeutic drug monitoring*, 25(1):107–11, Feb 2003.
- [20] P G Bertram, C Zeng, J Thorson, A S Shaw, and X F Zheng. The 14-3-3 proteins positively regulate rapamycin-sensitive signaling. *Curr Biol*, 8(23):1259–67, Nov 1998.
- [21] M E Billingham, N R Cary, M E Hammond, J Kemnitz, C Marboe, H A McCallister, D C Snovar, G L Winters, and A Zerbe. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart rejection study group. the international society for heart transplantation. *The Journal of heart transplantation*, 9(6):587–93, Jan 1990.
- [22] Mikhail V Blagosklonny and Arthur B Pardee. Conceptual biology: unearthing the gems. *Nature*, 416(6879):373, Mar 2002.
- [23] C Blanche, D A Blanche, B Kearney, M Sandhu, L S Czer, A Kamlot, A Hickey, and A Trento. Heart transplantation in patients seventy years of age and older: A comparative analysis of outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121(3):532–41, Mar 2001.
- [24] K Boncimino, D J McMahon, V Adesso, J P Bilezikian, and E Shane. Magnesium deficiency and bone loss after cardiac transplantation. *J Bone Miner Res*, 14(2):295–303, Feb 1999.
- [25] Laurence Bonhomme-Faivre, Aurore Devocelle, Faouzi Saliba, Skander Chatled, Jean Maccario, Robert Farinotti, and Véronique Picard. *Mdr-1* c3435t polymorphism influences cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients. *Transplantation*, 78(1):21–5, Jul 2004.
- [26] N Bonnefoy-Berard and J P Revillard. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and okt3. *J Heart Lung Transplant*, 15(5):435–42, May 1996.

- [27] A M Borkon, G F Muehlebach, P G Jones, D R Bresnahan, R E Genton, M E Gorton, N D Long, A Magalski, C B Porter, W A Reed, and S K Rowe. An analysis of the effect of age on survival after heart transplant. *J Heart Lung Transplant*, 18(7):668–74, Jul 1999.
- [28] S Bortoluzzi, C Romualdi, A Bisognin, and G A Danieli. Disease genes and intracellular protein networks. *Physiol Genomics*, 15(3):223–7, Nov 2003.
- [29] Mark M Boucek, David A Waltz, Leah B Edwards, David O Taylor, Berkeley M Keck, Elbert P Trulock, Marshall I Hertz, International Society for Heart, and Lung Transplantation. Registry of the international society for heart and lung transplantation: ninth official pediatric heart transplantation report–2006. *J Heart Lung Transplant*, 25(8):893–903, Aug 2006.
- [30] C Boudaa, J M Lalot, J F Perrier, C Voltz, P Strub, O Claudon, G Audibert, I Sandefo, C Meistelman, D Longrois, and P M Mertes. Evaluation of donor cardiac function for heart transplantation: experience of a french academic hospital. *Ann Transplant*, 5(4):51–3, Jan 2000.
- [31] J S Bourdage and D M Hamlin. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-cd antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation*, 59(8):1194–200, Apr 1995.
- [32] D C Brennan, K Flavin, J A Lowell, T K Howard, S Shenoy, S Burgess, S Dolan, J M Kano, M Mahon, M A Schnitzler, R Woodward, W Irish, and G G Singer. A randomized, double-blinded comparison of thymoglobulin versus atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation*, 67(7):1011–8, Apr 1999.
- [33] D A Bull, S V Karwande, J A Hawkins, L A Neumayer, D O Taylor, K W Jones, D G Renlund, C W Putnam, and C W Putnam. Long-term results of cardiac transplantation in patients older than sixty years. utah cardiac

- transplant program. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 111(2):423–7; discussion 427–8, Feb 1996.
- [34] Marcelo Cantarovich, Nadia Giannetti, Jeffrey Barkun, and Renzo Cecere. Antithymocyte globulin induction allows a prolonged delay in the initiation of cyclosporine in heart transplant patients with postoperative renal dysfunction. *Transplantation*, 78(5):779–81, Sep 2004.
- [35] D Cattaneo, F Gaspari, S Ferrari, N Stucchi, L Del Priore, N Perico, E Gotti, and G Remuzzi. Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients. *Clinical transplantation*, 15(6):402–9, Dec 2001.
- [36] Isa Cavaco, J Pedro Gil, Eva Gil-Berglund, and Vera Ribeiro. Cyp3a4 and mdr1 alleles in a portuguese population. *Clin Chem Lab Med*, 41(10):1345–50, Oct 2003.
- [37] C Chan, J Maurer, C Cardella, D Cattran, and Y Pei. A randomized controlled trial of verapamil on cyclosporine nephrotoxicity in heart and lung transplant recipients. *Transplantation*, 63(10):1435–40, May 1997.
- [38] Jeffrey T Chang, Hinrich Schütze, and Russ B Altman. Gapscore: finding gene and protein names one word at a time. *Bioinformatics*, 20(2):216–25, Jan 2004.
- [39] P R Chocair, J A Duley, H A Simmonds, and J S Cameron. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation*, 53(5):1051–6, May 1992.
- [40] Balram Chowbay, Sivathasan Kumaraswamy, Yin Bun Cheung, Qingyu Zhou, and Edmund J D Lee. 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, Feb 2003.

- [41] John Colgan, Mohammed Asmal, Bin Yu, and Jeremy Luban. Cyclophilin a-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol*, 174(10):6030–8, May 2005.
- [42] F Conti, S Breton, F Batteux, V Furlan, D Houssin, B Weill, and Y Calmus. Defective interleukin-1 receptor antagonist production is associated with resistance of acute liver graft rejection to steroid therapy. *Am J Pathol*, 157(5):1685–92, Nov 2000.
- [43] James W Cooper and Aaron Kershenbaum. Discovery of protein-protein interactions using a combination of linguistic, statistical and graphical information. *BMC Bioinformatics*, 6:143, Jan 2005.
- [44] J G Copeland and E B Stinson. Human heart transplantation. *Current problems in cardiology*, 4(8):1–5, Nov 1979.
- [45] Maria G Crespo-Leiro, Luis Alonso-Pulpón, José M Arizón, Luis Almenar, Juan F Delgado, Jesús Palomo, Nicolás Manito, Gregorio Rábago, Ernesto Lage, Beatriz Diaz, Eulalia Roig, Domingo Pascual, Teresa Blasco, Luis de la Fuente, Marta Campreciós, José A Vázquez de Prada, and Javier Muñiz. Influence of induction therapy, immunosuppressive regimen and anti-viral prophylaxis on development of lymphomas after heart transplantation: data from the spanish post-heart transplant tumour registry. *J Heart Lung Transplant*, 26(11):1105–9, Nov 2007.
- [46] Nikolai Daraselia, Anton Yuryev, Sergei Egorov, Svetalana Novichkova, Alexander Nikitin, and Ilya Mazo. Extracting human protein interactions from medline using a full-sentence parser. *Bioinformatics*, 20(5):604–11, Mar 2004.
- [47] Philippe Demers, Susan Moffatt, Philip E Oyer, Sharon A Hunt, Bruce A Reitz, and Robert C Robbins. Long-term results of heart transplantation in patients older than 60 years. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126(1):224–31, Jul 2003.

- [48] T Dervieux, Y Médard, V Baudouin, A Maisin, D Zhang, F Broly, C Loirat, and E Jacqz-Aigrain. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *British journal of clinical pharmacology*, 48(6):793–800, Dec 1999.
- [49] J Ding, D Berleant, D Nettleton, and E Wurtele. Mining medline: abstracts, sentences, or phrases? *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing*, pages 326–37, Jan 2002.
- [50] Ian Donaldson, Joel Martin, Berry de Bruijn, Cheryl Wolting, Vicki Lay, Brigitte Tuekam, Shudong Zhang, Berivan Baskin, Gary D Bader, Katerina Michalickova, Tony Pawson, and Christopher W V Hogue. Prebind and textomy—mining the biomedical literature for protein-protein interactions using a support vector machine. *BMC Bioinformatics*, 4:11, Mar 2003.
- [51] Jun Dong and Steve Horvath. Understanding network concepts in modules. *BMC systems biology*, 1:24, Jan 2007.
- [52] G Dreyfus, V Jebara, S Mihaileanu, and A F Carpentier. Total orthotopic heart transplantation: an alternative to the standard technique. *Ann Thorac Surg*, 52(5):1181–4, Nov 1991.
- [53] C J Dunn, A J Wagstaff, C M Perry, G L Plosker, and K L Goa. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. *Drugs*, 61(13):1957–2016, Jan 2001.
- [54] Howard J Eisen, E Murat Tuzcu, Richard Dorent, Jon Kobashigawa, Donna Mancini, Hannah A Valentine von Kaepler, Randall C Starling, Keld Sørensen, Manfred Hummel, Joan M Lind, Kamal H Abeywickrama, Peter Bernhardt, and RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*, 349(9):847–58, Aug 2003.

- [55] William E Evans and Howard L McLeod. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, 348(6):538–49, Feb 2003.
- [56] Jenny Finkel, Shipra Dingare, Christopher D Manning, Malvina Nissim, Beatrice Alex, and Claire Grover. Exploring the boundaries: gene and protein identification in biomedical text. *BMC Bioinformatics*, 6 Suppl 1:S5, Jan 2005.
- [57] Gary B Fogel. Computational intelligence approaches for pattern discovery in biological systems. *Brief Bioinformatics*, 9(4):307–16, Jul 2008.
- [58] C Friedman, P Kra, H Yu, M Krauthammer, and A Rzhetsky. Genies: a natural-language processing system for the extraction of molecular pathways from journal articles. *Bioinformatics*, 17 Suppl 1:S74–82, Jan 2001.
- [59] B Fulton and A Markham. Mycophenolate mofetil. a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs*, 51(2):278–98, Feb 1996.
- [60] A O Gaber, M R First, R J Tesi, R S Gaston, R Mendez, L L Mulloy, J A Light, L W Gaber, E Squiers, R J Taylor, J F Neylan, R W Steiner, S Knechtle, D J Norman, F Shihab, G Basadonna, D C Brennan, E E Hodge, B D Kahan, L Kahan, S Steinberg, E S Woodle, L Chan, J M Ham, and T J Schroeder. Results of the double-blind, randomized, multicenter, phase iii clinical trial of thymoglobulin versus atgam in the treatment of acute graft rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation*, 66(1):29–37, Jul 1998.
- [61] Jean-François Gagné, Valerie Montminy, Patrick Belanger, Kim Journault, Genevieve Gaucher, and Chantal Guillemette. Common human ugt1a polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (sn-38). *Mol Pharmacol*, 62(3):608–17, Sep 2002.

- [62] Guillermo Gervasini, Sonia Vizcaino, Carolina Gasiba, Juan Antonio Carrillo, and Julio Benitez. Differences in *cyp3a5*3* genotype distribution and combinations with other polymorphisms between spaniards and other caucasian populations. *Therapeutic drug monitoring*, 27(6):819–21, Dec 2005.
- [63] Guri Giaever, Angela M Chu, Li Ni, Carla Connelly, Linda Riles, Steeve Véronneau, Sally Dow, Ankuta Lucau-Danila, Keith Anderson, Bruno André, Adam P Arkin, Anna Astromoff, Mohamed El-Bakkoury, Rhonda Bangham, Rocio Benito, Sophie Brachat, Stefano Campanaro, Matt Curtiss, Karen Davis, Adam Deutschbauer, Karl-Dieter Entian, Patrick Flaherty, Francoise Foury, David J Garfinkel, Mark Gerstein, Deanna Gotte, Ulrich Güldener, Johannes H Hegemann, Svenja Hempel, Zelek Herman, Daniel F Jaramillo, Diane E Kelly, Steven L Kelly, Peter Kötter, Darlene LaBonte, David C Lamb, Ning Lan, Hong Liang, Hong Liao, Lucy Liu, Chuanyun Luo, Marc Lussier, Rong Mao, Patrice Menard, Siew Loon Ooi, Jose L Revuelta, Christopher J Roberts, Matthias Rose, Petra Ross-Macdonald, Bart Scherens, Greg Schimmack, Brenda Shafer, Daniel D Shoemaker, Sharon Sookhai-Mahadeo, Reginald K Storms, Jeffrey N Strathern, Giorgio Valle, Marleen Voet, Guido Volckaert, Ching yun Wang, Teresa R Ward, Julie Wilhelmy, Elizabeth A Winzeler, Yonghong Yang, Grace Yen, Elaine Youngman, Kexin Yu, Howard Bussey, Jef D Boeke, Michael Snyder, Peter Philippsen, Ronald W Davis, and Mark Johnston. Functional profiling of the *saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896):387–91, Jul 2002.
- [64] L Giot, J S Bader, C Brouwer, A Chaudhuri, B Kuang, Y Li, Y L Hao, C E Ooi, B Godwin, E Vitols, G Vijayadamodar, P Pochart, H Machineni, M Welsh, Y Kong, B Zerhusen, R Malcolm, Z Varrone, A Collis, M Minto, S Burgess, L McDaniel, E Stimpson, F Spriggs, J Williams, K Neurath, N Ioime, M Agee, E Voss, K Furtak, R Renzulli, N Aanensen, S Carrolla,

- E Bickelhaupt, Y Lazovatsky, A DaSilva, J Zhong, C A Stanyon, R L Finley, K P White, M Braverman, T Jarvie, S Gold, M Leach, J Knight, R A Shimkets, M P McKenna, J Chant, and J M Rothberg. A protein interaction map of drosophila melanogaster. *Science*, 302(5651):1727–36, Dec 2003.
- [65] Maki Goto, Satoshi Masuda, Hideyuki Saito, Shinji Uemoto, Tetsuya Kiuchi, Koichi Tanaka, and Ken ichi Inui. C3435t polymorphism in the *mdr1* gene affects the enterocyte expression level of *cyp3a4* rather than *pgp* in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics*, 12(6):451–7, Aug 2002.
- [66] M M Gottesman and I Pastan. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 62:385–427, Jan 1993.
- [67] M T Grattan, C E Moreno-Cabral, V A Starnes, P E Oyer, E B Stinson, and N E SHUMWAY. Eight-year results of cyclosporine-treated patients with cardiac transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 99(3):500–9, Mar 1990.
- [68] C G Groth, L Bäckman, J M Morales, R Calne, H Kreis, P Lang, J L Touraine, K Claesson, J M Campistol, D Durand, L Wramner, C Brattström, and B Charpentier. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. sirolimus european renal transplant study group. *Transplantation*, 67(7):1036–42, Apr 1999.
- [69] Matthew W Hahn, Gavin C Conant, and Andreas Wagner. Molecular evolution in large genetic networks: does connectivity equal constraint? *J Mol Evol*, 58(2):203–11, Feb 2004.
- [70] A Hamosh, A F Scott, J Amberger, D Valle, and V A McKusick. Online mendelian inheritance in man (omim). *Hum Mutat*, 15(1):57–61, Jan 2000.

- [71] Jing-Dong J Han, Nicolas Bertin, Tong Hao, Debra S Goldberg, Gabriel F Berriz, Lan V Zhang, Denis Dupuy, Albertha J M Walhout, Michael E Cusick, Frederick P Roth, and Marc Vidal. Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network. *Nature*, 430(6995):88–93, Jul 2004.
- [72] Daniel Hanisch, Katrin Fundel, Heinz-Theodor Mevissen, Ralf Zimmer, and Juliane Fluck. Prominer: rule-based protein and gene entity recognition. *BMC Bioinformatics*, 6 Suppl 1:S14, Jan 2005.
- [73] Yu Hao, Xiaoyan Zhu, Minlie Huang, and Ming Li. Discovering patterns to extract protein-protein interactions from the literature: Part ii. *Bioinformatics*, 21(15):3294–300, Aug 2005.
- [74] T Hashida, S Masuda, S Uemoto, H Saito, K Tanaka, and K Inui. Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal *mdr1* expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 69(5):308–16, May 2001.
- [75] Vincent Haufroid, Michel Mourad, Valérie Van Kerckhove, Jeremie Warzyniak, Martine De Meyer, Djamila Chaïb Eddour, Jacques Malaise, Dominique Lison, Jean-Paul Squifflet, and Pierre Wallemacq. The effect of *cyp3a5* and *mdr1* (*abcb1*) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics*, 14(3):147–54, Mar 2004.
- [76] P J Hauptman, K J O’Connor, R E Wolf, and B J McNeil. Angiography of potential cardiac donors. *J Am Coll Cardiol*, 37(5):1252–8, Apr 2001.
- [77] Mary F Hebert, Amy L Dowling, Cynthia Gierwatowski, Yvonne S Lin, Karen L Edwards, Connie L Davis, Christopher L Marsh, Erin G Schuetz, and Kenneth E Thummel. Association between *abcb1* (multidrug resistance transporter) genotype and post-liver transplantation renal dysfunction

- in patients receiving calcineurin inhibitors. *Pharmacogenetics*, 13(11):661–74, Nov 2003.
- [78] Raoul Herbrecht, David W Denning, Thomas F Patterson, John E Bennett, Reginald E Greene, Jörg-W Oestmann, Winfried V Kern, Kieren A Marr, Patricia Ribaud, Olivier Lortholary, Richard Sylvester, Robert H Rubin, John R Wingard, Paul Stark, Christine Durand, Denis Caillot, Eckhard Thiel, Pranatharthi H Chandrasekar, Michael R Hodges, Haran T Schlamm, Peter F Troke, Ben de Pauw, Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research, Treatment of Cancer, and the Global Aspergillus Study Group. Voriconazole versus amphotericin b for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 347(6):408–15, Aug 2002.
- [79] H Herlitz and B Lindelöw. Renal failure following cardiac transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, 15(3):311–4, Mar 2000.
- [80] A L Heroux, M R Costanzo-Nordin, J E O’Sullivan, W G Kao, Y Liao, G M Mullen, and M R Johnson. Heart transplantation as a treatment option for end-stage heart disease in patients older than 65 years of age. *J Heart Lung Transplant*, 12(4):573–8; discussion 578–9, Jan 1993.
- [81] Dennis A Hesselink, Teun van Gelder, Ron H N van Schaik, Aggie H M M Balk, Ilse P van der Heiden, Thea van Dam, Marloes van der Werf, Willem Weimar, and Ron A A Mathot. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the *mdr-1*, *cyp3a4*, and *cyp3a5* genes. *Clin Pharmacol Ther*, 76(6):545–56, Dec 2004.
- [82] Dennis A Hesselink, Teun van Gelder, and Ron Hn van Schaik. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression? *Pharmacogenomics*, 6(4):323–37, Jun 2005.

- [83] Dennis A Hesselink, Ron H N van Schaik, Ilse P van der Heiden, Marloes van der Werf, Peter J H Smak Gregoor, Jan Lindemans, Willem Weimar, and Teun van Gelder. Genetic polymorphisms of the *cyp3a4*, *cyp3a5*, and *mdr-1* genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther*, 74(3):245–54, Sep 2003.
- [84] Robert Hoffmann and Alfonso Valencia. A gene network for navigating the literature. *Nat Genet*, 36(7):664, Jul 2004.
- [85] Robert Hoffmann and Alfonso Valencia. Implementing the ihop concept for navigation of biomedical literature. *Bioinformatics*, 21 Suppl 2:ii252–8, Sep 2005.
- [86] S Huang and P J Houghton. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist Updat*, 4(6):378–91, Dec 2001.
- [87] Sharon A Hunt. Malignancy in organ transplantation: heart. *Transplant Proc*, 34(5):1874–6, Aug 2002.
- [88] Sharon A Hunt. Taking heart–cardiac transplantation past, present, and future. *N Engl J Med*, 355(3):231–5, Jul 2006.
- [89] E Hustert, M Haberl, O Burk, R Wolbold, Y Q He, K Klein, A C Nuessler, P Neuhaus, J Klattig, R Eiselt, I Koch, A Zibat, J Brockmüller, J R Halpert, U M Zanger, and L Wojnowski. The genetic determinants of the *cyp3a5* polymorphism. *Pharmacogenetics*, 11(9):773–9, Dec 2001.
- [90] Trey Ideker and Roded Sharan. Protein networks in disease. *Genome Res*, 18(4):644–52, Apr 2008.
- [91] I Iliopoulos, A J Enright, and C A Ouzounis. Textquest: document clustering of medline abstracts for concept discovery in molecular biology. *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing*, pages 384–95, Jan 2001.

- [92] Lars Juhl Jensen, Jasmin Saric, and Peer Bork. Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. *Nat Rev Genet*, 7(2):119–29, Feb 2006.
- [93] T K Jenssen, A Laegreid, J Komorowski, and E Hovig. A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. *Nat Genet*, 28(1):21–8, May 2001.
- [94] H Jeong, S P Mason, A L Barabási, and Z N Oltvai. Lethality and centrality in protein networks. *Nature*, 411(6833):41–2, May 2001.
- [95] R John, J M Chen, A Weinberg, M C Oz, D Mancini, S Itescu, M E Galantowicz, C R Smith, E A Rose, and N M Edwards. Long-term survival after cardiac retransplantation: a twenty-year single-center experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117(3):543–55, Mar 1999.
- [96] B D Kahan. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. the rapamune us study group. *Lancet*, 356(9225):194–202, Jul 2000.
- [97] B D Kahan and J S Camardo. Rapamycin: clinical results and future opportunities. *Transplantation*, 72(7):1181–93, Oct 2001.
- [98] B D Kahan, P R Rajagopalan, and M Hall. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. united states simulect renal study group. *Transplantation*, 67(2):276–84, Jan 1999.
- [99] B V Karanam, S H Vincent, D J Newton, R W Wang, and S H Chiu. Fk 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome p450 isozymes other than cyp3a4. *Drug Metab Dispos*, 22(5):811–4, Jan 1994.

- [100] Bertram L Kasiske, Jon J Snyder, David Gilbertson, and Arthur J Matas. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the united states. *Am J Transplant*, 3(2):178–85, Feb 2003.
- [101] Jin-Dong Kim, Tomoko Ohta, and Jun'ichi Tsujii. Corpus annotation for mining biomedical events from literature. *BMC Bioinformatics*, 9:10, Jan 2008.
- [102] Chava Kimchi-Sarfaty, Jung Mi Oh, In-Wha Kim, Zuben E Sauna, Anna Maria Calcagno, Suresh V Ambudkar, and Michael M Gottesman. A "silent" polymorphism in the *mdr1* gene changes substrate specificity. *Science*, 315(5811):525–8, Jan 2007.
- [103] H Kitano. The theory of biological robustness and its implication in cancer. *Ernst Schering Res Found Workshop*, (61):69–88, Jan 2007.
- [104] Hiroaki Kitano. Computational systems biology. *Nature*, 420(6912):206–10, Nov 2002.
- [105] Hiroaki Kitano. Looking beyond the details: a rise in system-oriented approaches in genetics and molecular biology. *Curr Genet*, 41(1):1–10, Apr 2002.
- [106] Hiroaki Kitano. Systems biology: a brief overview. *Science*, 295(5560):1662–4, Mar 2002.
- [107] W T Klimecki, B W Futscher, T M Grogan, and W S Dalton. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*, 83(9):2451–8, May 1994.
- [108] P K Koskinen, E A Kallio, J M Tikkanen, R K Sihvola, P J Häyry, and K B Lemström. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 1(2):115–26, Jun 1999.

- [109] T Kronbach, V Fischer, and U A Meyer. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome p-450iii gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther*, 43(6):630–5, Jun 1988.
- [110] Marion Kübrich, Paraskevi Petrakopoulou, Sieglinde Kofler, Thomas Nickel, Ingo Kaczmarek, Bruno M Meiser, Bruno Reichart, Wolfgang von Scheidt, and Michael Weis. Impact of coronary endothelial dysfunction on adverse long-term outcome after heart transplantation. *Transplantation*, 85(11):1580–7, Jun 2008.
- [111] Dmitry V Kuprash, Veronica E Boitchenko, Felix O Yarovinsky, Nancy R Rice, Alfred Nordheim, Andreas Rühlmann, and Sergei A Nedospasov. Cyclosporin a blocks the expression of lymphotoxin alpha, but not lymphotoxin beta, in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 100(5):1721–7, Sep 2002.
- [112] Takafumi Kuzuya, Takaaki Kobayashi, Natsuko Moriyama, Takaharu Nagasaka, Itsuo Yokoyama, Kazuharu Uchida, Akimasa Nakao, and Toshihata Nabeshima. Amlodipine, but not *mdr1* polymorphisms, alters the pharmacokinetics of cyclosporine a in japanese kidney transplant recipients. *Transplantation*, 76(5):865–8, Sep 2003.
- [113] M Lauten, T Matthias, M Stanulla, C Beger, K Welte, and M Schrappe. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia*, 16(8):1437–42, Aug 2002.
- [114] J Léger and B Swynghedauw. From molecular to modular cardiology. how to interpret the millions of data that came out from large scale analysis of gene expression? *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, 99(3):231–6, Mar 2006.

- [115] G Leidig-Bruckner, S Hosch, P Dodidou, D Ritschel, C Conradt, C Klose, G Otto, R Lange, L Theilmann, R Zimmerman, M Pritsch, and R Ziegler. Frequency and predictors of osteoporotic fractures after cardiac or liver transplantation: a follow-up study. *Lancet*, 357(9253):342–7, Feb 2001.
- [116] María G Crespo Leiro and María J Paniagua Martín. [management of advanced or refractory heart failure]. *Revista española de cardiología*, 57(9):869–83, Sep 2004.
- [117] Julie E Leonard, Jeffrey B Colombe, and Joshua L Levy. Finding relevant references to genes and proteins in medline using a bayesian approach. *Bioinformatics*, 18(11):1515–22, Nov 2002.
- [118] Daniel Levy, Satish Kenchaiah, Martin G Larson, Emelia J Benjamin, Michelle J Kupka, Kalon K L Ho, Joanne M Murabito, and Ramachandran S Vasan. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*, 347(18):1397–402, Oct 2002.
- [119] Yun-Feng Li, Hong-Xia Sun, Guo-Dong Wu, Wei-Nan Du, Jin Zuo, Yan Shen, Bo-Qin Qiang, Zhi-Jian Yao, Heng Wang, Wei Huang, Zhu Chen, Mo-Miao Xiong, Yan Meng, and Fu-De Fang. Protein kinase *c/zeta* (*prkcz*) gene is associated with type 2 diabetes in han population of north china and analysis of its haplotypes. *World J Gastroenterol*, 9(9):2078–82, Sep 2003.
- [120] M C Lorenz and J Heitman. Tor mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with *fkbp12*-rapamycin. *J Biol Chem*, 270(46):27531–7, Nov 1995.
- [121] R R LOWER, R C STOFER, and N E SHUMWAY. Homovital transplantation of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 41:196–204, Feb 1961.
- [122] K S Lown, R R Mayo, A B Leichtman, H L Hsiao, D K Turgeon, P Schmiedlin-Ren, M B Brown, W Guo, S J Rossi, L Z Benet, and P B

- Watkins. Role of intestinal p-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*, 62(3):248–60, Sep 1997.
- [123] Iain A M Macphee, Salim Fredericks, Maha Mohamed, Michelle Moreton, Nicholas D Carter, Atholl Johnston, Lawrence Goldberg, and David W Holt. Tacrolimus pharmacogenetics: the cyp3a5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and south asians. *Transplantation*, 79(4):499–502, Feb 2005.
- [124] Ingrid Mai, Elke Störmer, Mark Goldammer, Andreas Johne, Hagen Krüger, Klemens Budde, and Ivar Roots. Mdr1 haplotypes do not affect the steady-state pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *Journal of clinical pharmacology*, 43(10):1101–7, Oct 2003.
- [125] Piero Marchetti. New-onset diabetes after transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 23(5 Suppl):S194–201, May 2004.
- [126] O Mason and M Verwoerd. Graph theory and networks in biology. *IET systems biology*, 1(2):89–119, Mar 2007.
- [127] Satohiro Masuda, Shinji Uemoto, Maki Goto, Yasuhiro Fujimoto, Koichi Tanaka, and Ken ichi Inui. Tacrolimus therapy according to mucosal mdr1 levels in small-bowel transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*, 75(4):352–61, Apr 2004.
- [128] Marie Françoise Mattei, Michel Redonnet, Iradj Gandjbakhch, Annick Mouly Bandini, Allain Billes, Eric Epailly, Romain Guillemain, Bernard Lelong, Annie Pol, Michelle Treilhaud, Emmanuelle Vermes, Richard Dorent, Djamilia Lemay, Anne Sandrine Blanc, and Pascale Boissonnat. Lower risk of infectious deaths in cardiac transplant patients receiving basiliximab versus anti-thymocyte globulin as induction therapy. *J Heart Lung Transplant*, 26(7):693–9, Jul 2007.

- [129] A M De Mattos, M A Head, J Everett, J Hosenpud, R Hershberger, A Cobanoglu, G Ott, R Ratkovec, and D J Norman. Hla-dr mismatching correlates with early cardiac allograft rejection, incidence, and graft survival when high-confidence-level serological dr typing is used. *Transplantation*, 57(4):626–30, Feb 1994.
- [130] R C McKoy, B F Uretsky, R Kormos, R L Hardesty, B P Griffith, and R Salerni. Left ventricular hypertrophy in cyclosporine-induced systemic hypertension after cardiac transplantation. *Am J Cardiol*, 62(16):1140–2, Nov 1988.
- [131] Sven Mika and Burkhard Rost. Protein names precisely peeled off free text. *Bioinformatics*, 20 Suppl 1:i241–7, Aug 2004.
- [132] David I Min and Vicki L Ellingrod. C3435t mutation in exon 26 of the human *mdr1* gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Therapeutic drug monitoring*, 24(3):400–4, Jun 2002.
- [133] David I Min, Vicki L Ellingrod, Sharon Marsh, and Howard McLeod. Cyp3a5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Therapeutic drug monitoring*, 26(5):524–8, Oct 2004.
- [134] Sean D Mooney and Teri E Klein. The functional importance of disease-associated mutation. *BMC Bioinformatics*, 3:24, Sep 2002.
- [135] Sean D Mooney, Teri E Klein, Russ B Altman, Mark A Trifiro, and Bruce Gottlieb. A functional analysis of disease-associated mutations in the androgen receptor gene. *Nucleic Acids Res*, 31(8):e42, Apr 2003.
- [136] Jeffrey A Morgan and Niloo M Edwards. Orthotopic cardiac transplantation: comparison of outcome using biatrial, bicaval, and total techniques. *Journal of cardiac surgery*, 20(1):102–6, Jan 2005.

- [137] Jeffrey A Morgan, Ranjit John, Donna M Mancini, and Niloo M Edwards. Should heart transplantation be considered as a treatment option for patients aged 70 years and older? *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127(6):1817–9, Jun 2004.
- [138] Jeffrey A Morgan, Ranjit John, Alan D Weinberg, Aftab R Kherani, Nicholas J Colletti, Deon W Vigilance, Faisal H Cheema, Gianluigi Bisleri, Thomas Cosola, Donna M Mancini, Mehmet C Oz, and Niloo M Edwards. Prolonged donor ischemic time does not adversely affect long-term survival in adult patients undergoing cardiac transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126(5):1624–33, Nov 2003.
- [139] Jeffrey A Morgan, Ranjit John, Alan D Weinberg, Romolo Remoli, Aftab R Kherani, Deon W Vigilance, Bella M Schanzer, Gianluigi Bisleri, Donna M Mancini, Mehmet C Oz, and Niloo M Edwards. Long-term results of cardiac transplantation in patients 65 years of age and older: a comparative analysis. *Ann Thorac Surg*, 76(6):1982–7, Dec 2003.
- [140] Hans-Michael Müller, Eimear E Kenny, and Paul W Sternberg. Textpresso: an ontology-based information retrieval and extraction system for biological literature. *PLoS Biol*, 2(11):e309, Nov 2004.
- [141] Jayan Nagendran, Stephen M Wildhirt, Dennis Modry, John Mullen, Arvind Koshal, and Shao Hua Wang. A comparative analysis of outcome after heart transplantation in patients aged 60 years and older: the university of alberta experience. *Journal of cardiac surgery*, 19(6):559–62, Jan 2004.
- [142] M Narayanaswamy, K E Ravikumar, and K Vijay-Shanker. Beyond the clause: extraction of phosphorylation information from medline abstracts. *Bioinformatics*, 21 Suppl 1:i319–27, Jun 2005.
- [143] B Nashan, R Moore, P Amlot, A G Schmidt, K Abeywickrama, and J P Soulillou. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of

- acute cellular rejection in renal allograft recipients. chib 201 international study group. *Lancet*, 350(9086):1193–8, Oct 1997.
- [144] Ana Nogal, Ana Coelho, Raquel Catarino, António Morais, Francisco Lobo, and Rui Medeiros. The cyp3a4 *1b polymorphism and prostate cancer susceptibility in a portuguese population. *Cancer Genet Cytogenet*, 177(2):149–52, Sep 2007.
- [145] Anju Nohria, Eldrin Lewis, and Lynne Warner Stevenson. Medical management of advanced heart failure. *JAMA*, 287(5):628–40, Feb 2002.
- [146] Toru Oka, Yan-Shan Dai, and Jeffery D Molkenin. Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin a beta promoter in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*, 25(15):6649–59, Aug 2005.
- [147] G Opelz and T Wujciak. The influence of hla compatibility on graft survival after heart transplantation. the collaborative transplant study. *N Engl J Med*, 330(12):816–9, Mar 1994.
- [148] V Ozdemir, W Kalow, B K Tang, A D Paterson, S E Walker, L Endrenyi, and A D Kashuba. Evaluation of the genetic component of variability in cyp3a4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics*, 10(5):373–88, Jul 2000.
- [149] Moorthy S S Palanki. Inhibitors of ap-1 and nf-kappa b mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr Med Chem*, 9(2):219–27, Jan 2002.
- [150] M J Paniagua, M G Crespo-Leiro, L De la Fuente, T Tabuyo, I Mosquera, A Cañizares, C Naya, P Fariña, A Juffé, and A Castro-Beiras. Prevention of cytomegalovirus disease after heart transplantation: preemptive therapy with 7 days' intravenous ganciclovir. *Transplant Proc*, 34(1):69–70, Feb 2002.

- [151] Jason A Papin and Bernhard O Palsson. Topological analysis of mass-balanced signaling networks: a framework to obtain network properties including crosstalk. *J Theor Biol*, 227(2):283–97, Mar 2004.
- [152] Carlos Paya, Atul Humar, Ed Dominguez, Kenneth Washburn, Emily Blumberg, Barbara Alexander, Richard Freeman, Nigel Heaton, Mark D Pescovitz, and Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 4(4):611–20, Apr 2004.
- [153] S M Pham, R L Kormos, B G Hattler, A Kawai, A C Tsamandas, A J Demetris, S Murali, F J Fricker, H C Chang, A B Jain, T E Starzl, R L Hardesty, and B P Griffith. A prospective trial of tacrolimus (fk 506) in clinical heart transplantation: intermediate-term results. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 111(4):764–72, Apr 1996.
- [154] Brian J Potter, Nadia Giannetti, Michael D deB Edwardes, Renzo Cere, and Marcelo Cantarovich. Calcineurin inhibitor substitution with sirolimus vs. reduced-dose calcineurin inhibitor plus sirolimus is associated with improved renal dysfunction in heart transplant patients. *Clinical transplantation*, 21(3):305–8, Jan 2007.
- [155] T W Prendergast, S Furukawa, A J Beyer, B J Browne, H J Eisen, and V Jeevanandam. The role of gender in heart transplantation. *Ann Thorac Surg*, 65(1):88–94, Jan 1998.
- [156] Arun K Ramani, Razvan C Bunescu, Raymond J Mooney, and Edward M Marcotte. Consolidating the set of known human protein-protein interactions in preparation for large-scale mapping of the human interactome. *Genome Biol*, 6(5):R40, Jan 2005.
- [157] G J Randolph, S Beaulieu, M Pope, I Sugawara, L Hoffman, R M Steinman, and W A Muller. A physiologic function for p-glycoprotein (mdr-1)

- during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(12):6924–9, Jun 1998.
- [158] E Ravasz, A L Somera, D A Mongru, Z N Oltvai, and A L Barabási. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, 297(5586):1551–5, Aug 2002.
- [159] Richard Redon, Shumpei Ishikawa, Karen R Fitch, Lars Feuk, George H Perry, T Daniel Andrews, Heike Fiegler, Michael H Shapero, Andrew R Carson, Wenwei Chen, Eun Kyung Cho, Stephanie Dallaire, Jennifer L Freeman, Juan R González, Mònica Gratacòs, Jing Huang, Dimitrios Kallitropoulos, Daisuke Komura, Jeffrey R MacDonald, Christian R Marshall, Rui Mei, Lyndal Montgomery, Kunihiro Nishimura, Kohji Okamura, Fan Shen, Martin J Somerville, Joelle Tchinda, Armand Valsesia, Cara Woodwark, Fengtang Yang, Junjun Zhang, Tatiana Zerjal, Jane Zhang, Lluís Armengol, Donald F Conrad, Xavier Estivill, Chris Tyler-Smith, Nigel P Carter, Hiroyuki Aburatani, Charles Lee, Keith W Jones, Stephen W Scherer, and Matthew E Hurles. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118):444–54, Nov 2006.
- [160] A Renner and A Aszódi. High-throughput functional annotation of novel gene products using document clustering. *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing*, pages 54–68, Jan 2000.
- [161] D F Del Rizzo, A H Menkis, P W Pflugfelder, R J Novick, F N McKenzie, W D Boyd, and W J Kostuk. The role of donor age and ischemic time on survival following orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 18(4):310–9, Apr 1999.
- [162] Jeffrey Rand Rubel, Edgar Louis Milford, Dianne Brenda McKay, and John Adams Jarcho. Renal insufficiency and end-stage renal disease in the heart transplant population. *J Heart Lung Transplant*, 23(3):289–300, Mar 2004.

- [163] M Ruiz, U Lind, M Gåfvells, G Eggertsen, J Carlstedt-Duke, L Nilsson, M Holtmann, P Stierna, A C Wikström, and S Werner. Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 55(3):363–71, Sep 2001.
- [164] Andrey Rzhetsky, Ivan Iossifov, Tomohiro Koike, Michael Krauthammer, Pauline Kra, Mitzi Morris, Hong Yu, Pablo Ariel Duboué, Wubin Weng, W John Wilbur, Vasileios Hatzivassiloglou, and Carol Friedman. Geneways: a system for extracting, analyzing, visualizing, and integrating molecular pathway data. *Journal of biomedical informatics*, 37(1):43–53, Feb 2004.
- [165] T Saeki, K Ueda, Y Tanigawara, R Hori, and T Komano. Human p-glycoprotein transports cyclosporin a and fk506. *J Biol Chem*, 268(9):6077–80, Mar 1993.
- [166] Maya R Said, Thomas J Begley, Alan V Oppenheim, Douglas A Lauffenburger, and Leona D Samson. Global network analysis of phenotypic effects: protein networks and toxicity modulation in *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(52):18006–11, Dec 2004.
- [167] Jasmin Saric, Lars Juhl Jensen, Rossitza Ouzounova, Isabel Rojas, and Peer Bork. Extraction of regulatory gene/protein networks from medline. *Bioinformatics*, 22(6):645–50, Mar 2006.
- [168] E Schütz, J Gummert, V W Armstrong, F W Mohr, and M Oellerich. Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(3):199–205, Mar 1996.

- [169] L Sebbag, P Boucher, P Davelu, P Boissonnat, G Champsaur, J Ninet, G Dureau, J F Obadia, J J Vallon, and J Delaye. Thiopurine s-methyltransferase gene polymorphism is predictive of azathioprine-induced myelosuppression in heart transplant recipients. *Transplantation*, 69(7):1524–7, Apr 2000.
- [170] S N Sehgal, H Baker, and C Vézina. Rapamycin (ay-22,989), a new antifungal antibiotic. ii. fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot*, 28(10):727–32, Oct 1975.
- [171] V Sehgal, J Radhakrishnan, G B Appel, A Valeri, and D J Cohen. Progressive renal insufficiency following cardiac transplantation: cyclosporine, lipids, and hypertension. *Am J Kidney Dis*, 26(1):193–201, Jul 1995.
- [172] Mario Sénéchal, Richard Dorent, Sophie Tézéas du Montcel, Jean-Jacques Ghossou, Alain Pavie, Thierry Petitclerc, Michelle Dubois, Richard Isnard, and Iradj Gandjbakhch. End-stage renal failure and cardiac mortality after heart transplantation. *Clinical transplantation*, 18(1):1–6, Feb 2004.
- [173] E Shane, D Mancini, K Aaronson, S J Silverberg, M J Seibel, V Adesso, and D J McMahon. Bone mass, vitamin d deficiency, and hyperparathyroidism in congestive heart failure. *Am J Med*, 103(3):197–207, Sep 1997.
- [174] E Shane, M A Rodino, D J McMahon, V Adesso, R B Staron, M J Seibel, D Mancini, R E Michler, and S H Lo. Prevention of bone loss after heart transplantation with antiresorptive therapy: a pilot study. *J Heart Lung Transplant*, 17(11):1089–96, Nov 1998.
- [175] H H Sievers, M Weyand, E G Kraatz, and A Bernhard. An alternative technique for orthotopic cardiac transplantation, with preservation of the normal anatomy of the right atrium. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 39(2):70–2, Apr 1991.

- [176] Nina Singh. Late-onset cytomegalovirus disease as a significant complication in solid organ transplant recipients receiving antiviral prophylaxis: a call to heed the mounting evidence. *Clin Infect Dis*, 40(5):704–8, Mar 2005.
- [177] Małgorzata Sobieszcańska-Małek, Tomasz Zieliński, and Jerzy Korewicki. The influence of donor-related factors on the frequency of acute cellular rejection by the recipient in the first year following heart transplantation. *Ann Transplant*, 12(4):38–43, Jan 2007.
- [178] Claudia Sommerer, Thomas Giese, Jan Schmidt, Stefan Meuer, and Martin Zeier. Cyclosporin a tapering monitored by nfat-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression. *Transplantation*, 85(1):15–21, Jan 2008.
- [179] Claudia Sommerer, Mathias Konstandin, Thomas Dengler, Jan Schmidt, Stefan Meuer, Martin Zeier, and Thomas Giese. Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies. *Transplantation*, 82(10):1280–5, Nov 2006.
- [180] Christine E Staatz and Susan E Tett. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics*, 43(10):623–53, Jan 2004.
- [181] Peter D Stenson, Edward V Ball, Matthew Mort, Andrew D Phillips, Jacqueline A Shiel, Nick S T Thomas, Shaun Abeyasinghe, Michael Krawczak, and David N Cooper. Human gene mutation database (hgmd): 2003 update. *Hum Mutat*, 21(6):577–81, Jun 2003.
- [182] M Stephens, M Palakal, S Mukhopadhyay, R Raje, and J Mostafa. Detecting gene relations from medline abstracts. *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing*, pages 483–95, Jan 2001.

- [183] Paula H Stern. The calcineurin-nfat pathway and bone: intriguing new findings. *Mol Interv*, 6(4):193–6, Aug 2006.
- [184] Susan Stewart, Gayle L Winters, Michael C Fishbein, Henry D Tazelaar, Jon Kobashigawa, Jacki Abrams, Claus B Andersen, Annalisa Angelini, Gerald J Berry, Margaret M Burke, Anthony J Demetris, Elizabeth Hammond, Silviu Itescu, Charles C Marboe, Bruce McManus, Elaine F Reed, Nancy L Reinsmoen, E Rene Rodriguez, Alan G Rose, Marlene Rose, Nicole Suciú-Focia, Adriana Zeevi, and Margaret E Billingham. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*, 24(11):1710–20, Nov 2005.
- [185] Nathan O Stitzel, Yan Yuan Tseng, Dimitri Pervouchine, David Goddeau, Simon Kasif, and Jie Liang. Structural location of disease-associated single-nucleotide polymorphisms. *J Mol Biol*, 327(5):1021–30, Apr 2003.
- [186] Daniel N Streblow, Craig Kreklywich, Qiang Yin, V T De La Melena, Christopher L Corless, Patricia A Smith, Christina Brakebill, Judith W Cook, Cornelis Vink, Cathrien A Bruggeman, Jay A Nelson, and Susan L Orloff. Cytomegalovirus-mediated upregulation of chemokine expression correlates with the acceleration of chronic rejection in rat heart transplants. *J Virol*, 77(3):2182–94, Feb 2003.
- [187] Hong-Xia Sun, Wei-Nan Du, Jin Zuo, Guo-Dong Wu, Gui bin Shi, Yan Shen, Bo-Qin Qiang, Zhi-Jian Yao, Jian mei Hang, Heng Wang, Wei Huang, Zhu Chen, and Fu-De Fang. [the association of two single nucleotide polymorphisms in *prkcz* and *uts2* respectively with type 2 diabetes in han people of northern china]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 24(3):223–7, Jun 2002.
- [188] S Sunyaev, J Hanke, D Brett, A Aydin, I Zastrow, W Lathe, P Bork, and J Reich. Individual variation in protein-coding sequences of human

- genome. *Adv Protein Chem*, 54:409–37, Jan 2000.
- [189] Brian P Suomela and Miguel A Andrade. Ranking the whole medline database according to a large training set using text indexing. *BMC Bioinformatics*, 6:75, Jan 2005.
- [190] D R Swanson. Fish oil, raynaud’s syndrome, and undiscovered public knowledge. *Perspect Biol Med*, 30(1):7–18, Jan 1986.
- [191] A J Swerdlow, C D Higgins, B J Hunt, J A Thomas, M M Burke, D H Crawford, and M H Yacoub. Risk of lymphoid neoplasia after cardiothoracic transplantation. a cohort study of the relation to epstein-barr virus. *Transplantation*, 69(5):897–904, Mar 2000.
- [192] L J Swinnen, M R Costanzo-Nordin, S G Fisher, E J O’Sullivan, M R Johnson, A L Heroux, G J Dizikes, R Pifarre, and R I Fisher. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody okt3 in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*, 323(25):1723–8, Dec 1990.
- [193] Josep Tabernero, Federico Rojo, Emiliano Calvo, Howard Burris, Ian Judson, Katharine Hazell, Erika Martinelli, Santiago Ramon y Cajal, Suzanne Jones, Laura Vidal, Nicholas Shand, Teresa Macarulla, Francisco Javier Ramos, Sasa Dimitrijevic, Ulrike Zoellner, Pui Tang, Michael Stumm, Heidi A Lane, David Lebwohl, and José Baselga. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase i tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 26(10):1603–10, Apr 2008.
- [194] H Tada, N Tsuchiya, S Satoh, H Kagaya, Z Li, K Sato, M Miura, T Suzuki, T Kato, and T Habuchi. Impact of cyp3a5 and mdr1(abcb1) c3435t polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc*, 37(4):1730–2, May 2005.

- [195] L Tanabe, U Scherf, L H Smith, J K Lee, L Hunter, and J N Weinstein. Medminer: an internet text-mining tool for biomedical information, with application to gene expression profiling. *BioTechniques*, 27(6):1210–4, 1216–7, Dec 1999.
- [196] D O Taylor, M R Bristow, J B O’Connell, G D Price, E H Hammond, D B Doty, S V Karwande, W A Gay, K W Jones, D Lappé, and D G Renlund. Improved long-term survival after heart transplantation predicted by successful early withdrawal from maintenance corticosteroid therapy. *J Heart Lung Transplant*, 15(10):1039–46, Oct 1996.
- [197] David O Taylor, Leah B Edwards, Mark M Boucek, Elbert P Trulock, Mario C Deng, Berkeley M Keck, and Marshall I Hertz. Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-second official adult heart transplant report–2005. *J Heart Lung Transplant*, 24(8):945–55, Aug 2005.
- [198] David O Taylor, Leah B Edwards, Mark M Boucek, Elbert P Trulock, Berkeley M Keck, and Marshall I Hertz. The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-first official adult heart transplant report–2004. *J Heart Lung Transplant*, 23(7):796–803, Jul 2004.
- [199] David O Taylor, Leah B Edwards, Mark M Boucek, Elbert P Trulock, David A Waltz, Berkeley M Keck, Marshall I Hertz, International Society for Heart, and Lung Transplantation. Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report–2006. *J Heart Lung Transplant*, 25(8):869–79, Aug 2006.
- [200] Joshua M Temkin and Mark R Gilder. Extraction of protein interaction information from unstructured text using a context-free grammar. *Bioinformatics*, 19(16):2046–53, Nov 2003.

- [201] C G ter Meulen, C C Baan, R J Hené, L B Hilbrands, and A J Hoitsma. Two doses of daclizumab are sufficient for prolonged interleukin-2 α chain blockade. *Transplantation*, 72(10):1709–10, Nov 2001.
- [202] E Thervet, D Anglicheau, N Toledano, H Kreis, C Legendre, and P Beaune. Clinical consequences of the polymorphism of azathioprine metabolism. *Transplant Proc*, 32(8):2780, Dec 2000.
- [203] Eric Thervet, Dany Anglicheau, Barry King, Marie-Hélène Schlageter, Bruno Cassinat, Philippe Beaune, Christophe Legendre, and Ann K Daly. Impact of cytochrome p450 3a5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation*, 76(8):1233–5, Oct 2003.
- [204] Nicki Tiffin, Janet F Kelso, Alan R Powell, Hong Pan, Vladimir B Bajic, and Winston A Hide. Integration of text- and data-mining using ontologies successfully selects disease gene candidates. *Nucleic Acids Res*, 33(5):1544–52, Jan 2005.
- [205] Yanto Sandy Tjang, Geert J M G van der Heijden, Gero Tenderich, Reiner Körfer, and Diederick E Grobbee. Impact of recipient’s age on heart transplantation outcome. *Ann Thorac Surg*, 85(6):2051–5, Jun 2008.
- [206] Elbert P Trulock, Leah B Edwards, David O Taylor, Mark M Boucek, Berkeley M Keck, and Marshall I Hertz. The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-first official adult lung and heart-lung transplant report–2004. *J Heart Lung Transplant*, 23(7):804–15, Jul 2004.
- [207] C Vézina, A Kudelski, and S N Sehgal. Rapamycin (ay-22,989), a new antifungal antibiotic. i. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot*, 28(10):721–6, Oct 1975.
- [208] F Vincenti, R Kirkman, S Light, G Bumgardner, M Pescovitz, P Halloran, J Neylan, A Wilkinson, H Ekberg, R Gaston, L Bäckman, and J Burdick.

- Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. daclizumab triple therapy study group. *N Engl J Med*, 338(3):161–5, Jan 1998.
- [209] Dennis Vitkup, Chris Sander, and George M Church. The amino-acid mutational spectrum of human genetic disease. *Genome Biol*, 4(11):R72, Jan 2003.
- [210] N von Ahsen, M Richter, C Grupp, B Ringe, M Oellerich, and V W Armstrong. 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. *Clin Chem*, 47(6):1048–52, Jun 2001.
- [211] A Wagner and D A Fell. The small world inside large metabolic networks. *Proc Biol Sci*, 268(1478):1803–10, Sep 2001.
- [212] Z Wang and J Moulton. Snps, protein structure, and disease. *Hum Mutat*, 17(4):263–70, Apr 2001.
- [213] D J Watts and S H Strogatz. Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature*, 393(6684):440–2, Jun 1998.
- [214] R M Weinshilboum and S L Sladek. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*, 32(5):651–62, Sep 1980.
- [215] Leszek Wojnowski. Genetics of the variable expression of cyp3a in humans. *Therapeutic drug monitoring*, 26(2):192–9, Apr 2004.
- [216] A Yakushiji, Y Tateisi, Y Miyao, and J Tsujii. Event extraction from biomedical papers using a full parser. *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing*, pages 408–19, Jan 2001.
- [217] Mark D Yandell and William H Majoros. Genomics and natural language processing. *Nat Rev Genet*, 3(8):601–10, Aug 2002.

- [218] Charles R Yates, Wenhui Zhang, Pengfei Song, Shen Li, A Osama Gaber, Malak Kotb, Marsha R Honaker, Rita R Alloway, and Bernd Meibohm. The effect of cyp3a5 and mdrl polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *Journal of clinical pharmacology*, 43(6):555–64, Jun 2003.
- [219] Hyeonju Yeo, Jay M McDonald, and Majd Zayzafoon. Nfatc1: a novel anabolic therapeutic target for osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1068:564–7, Apr 2006.
- [220] Soon-Hyung Yook, Zoltán N Oltvai, and Albert-László Barabási. Functional and topological characterization of protein interaction networks. *Proteomics*, 4(4):928–42, Apr 2004.
- [221] Matthew R Yudt and John A Cidlowski. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*, 16(8):1719–26, Aug 2002.
- [222] Martin Zeier, Bernd Döhler, Gerhard Opelz, and Eberhard Ritz. The effect of donor gender on graft survival. *J Am Soc Nephrol*, 13(10):2570–6, Oct 2002.
- [223] Y Zhang and L Z Benet. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome p450 3a and p-glycoprotein. *Clinical pharmacokinetics*, 40(3):159–68, Jan 2001.
- [224] Hongxia Zheng, Erin Schuetz, Adriana Zeevi, Jiong Zhang, Kenneth McCurry, Steven Webber, Aldo Iacono, Jatinder Lamba, and Gilbert J Burckart. Sequential analysis of tacrolimus dosing in adult lung transplant patients with abcb1 haplotypes. *Journal of clinical pharmacology*, 45(4):404–10, Apr 2005.
- [225] Hongxia Zheng, Steven Webber, Adriana Zeevi, Erin Schuetz, Jiong Zhang, Pamela Bowman, Gerard Boyle, Yuk Law, Susan Miller, Jatinder Lamba, and Gilbert J Burckart. Tacrolimus dosing in pediatric heart

transplant patients is related to cyp3a5 and mdr1 gene polymorphisms.
Am J Transplant, 3(4):477-83, Apr 2003.



Reunida la Comisión Permanente del Comité Local de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba en sesión de fecha 2 de diciembre de 2005, y una vez estudiada la documentación presentada por D^a. Beatriz Isla Tejera, Farmacéutica Interna Residente de este Centro, tiene a bien informar que el proyecto de investigación, del cual figura como investigadora, titulado "Estudio farmacogenético de los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrolimus): análisis de los polimorfismos de los genes CYP3A4, CYP3A5 y MDR-1 en relación con su comportamiento farmacocinético y la incidencia de rechazo agudo tras el trasplante cardíaco", se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

En consecuencia, este Comité considera que procede la realización del mencionado proyecto.

Y para que conste, lo firmo, en Córdoba a 02 de diciembre de 2.005

El Presidente del Comité Local de Ensayos Clínicos

Fdo.: Alberto Rodríguez Benot



**TRASPLANTE CARDÍACO Y
FARMACOGENÉTICA**



**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
2005-2007**

**ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO DE LA CICLOSPORINA EN RELACIÓN
A FACTORES FARMACOCINÉTICOS-FARMACODINÁMICOS
Y LA INCIDENCIA DE RECHAZO AGUDO TRAS EL
TRASPLANTE CARDÍACO**

3.-CONSENTIMIENTO INFORMADO

Beatriz Isla Tejera
Farmacéutica Interna Residente
Hospital Universitario Reina Sofía
Córdoba

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

**TITULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACION: ANÁLISIS
FARMACOGENÉTICO DE LA CICLOSPORINA EN RELACIÓN
A FACTORES FARMACOCINÉTICOS-FARMACODINÁMICOS
Y LA INCIDENCIA DE RECHAZO AGUDO TRAS EL TRASPLANTE
CARDÍACO**

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación en el que se analizará la relación existente entre las variaciones (polimorfismos) de genes que producen proteínas que tienen que ver con la variaciones de la concentración en sangre medicamentos inmunosupresores, como es Sandimun Neoral (ciclosporina), que ya está usted tomando, y el riesgo de rechazo de su organismo al órgano que le han transplantado.

Debe decidir si desea tomar parte en él. Tómese el tiempo necesario para decidir. Lea atentamente lo que sigue y formule al médico del estudio todas las dudas que tenga. El estudio es llevado a cabo por miembros del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

¿Por qué se realiza este estudio?

El trasplante cardíaco continúa siendo el único tratamiento definitivo de la insuficiencia cardíaca. En España disponemos de una gran experiencia, siendo nuestros resultados equiparables con los de otros países, tanto de nuestro entorno como norteamericanos. El rechazo agudo del órgano transplantado representa un problema significativo ya que puede suponer tanto la disfunción temporal como la pérdida del mismo. En los últimos años, su incidencia ha disminuido notablemente con el desarrollo de nuevos medicamentos inmunosupresores. Su aparición depende de las características inmunogénicas del órgano, de las características del receptor y de nuestra capacidad de diagnóstico. Con el objetivo de prevenirlo, inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, se inicia el tratamiento inmunosupresor. A pesar de todo, en España, el rechazo se observa en un 50-80% de los enfermos en este primer año, con una media de 2-3 episodios por paciente.

Uno de los fármacos inmunosupresores utilizados tras el trasplante de corazón es la ciclosporina (Sandimun Neoral®). Existe una gran variabilidad en

las concentraciones de estos fármacos cuando se analizan en varias personas. A concentraciones plasmáticas excesivamente altas, estos fármacos producen efectos tóxicos (nefrotoxicidad, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus, neurotoxicidad, trombopenia, hirsutismo y síntomas digestivos) y favorecen condiciones en las que existe mayor probabilidad de aparición de infecciones oportunistas y tumores asociados. Por otro lado, las concentraciones demasiado bajas conllevan un menor efecto inmunosupresor y, por tanto, mayor probabilidad de rechazo agudo.

Se conocen múltiples factores que contribuyen a la variabilidad en las concentraciones en sangre de estos medicamentos, tales como la edad, el género, la raza, las enfermedades asociadas, la exposición ambiental y la hora del día en que se administran. Hoy en día, tan sólo la monitorización periódica de las concentraciones plasmáticas de estos fármacos permite el control de dichas variaciones, de modo que, con los valores obtenidos, su médico establece si ha de modificarse o no las siguientes dosis en cada visita. De este modo se pretende que las concentraciones en sangre del medicamento estén, en la medida de lo posible, dentro de dicho margen terapéutico.

Recientemente se han descubierto algunos genes relacionados con dichas variaciones. Todo el mundo tiene estos genes, pero hay pequeñas diferencias entre personas, que podrían explicar porqué, tomando una misma cantidad de inmunosupresores, en unos individuos se alcanzan niveles en sangre adecuados y en otros son demasiado elevados o demasiado bajos. De este modo, se pretende investigar si el análisis de las variantes individuales de estos genes puede ayudar a predecir las concentraciones de ciclosporina que tendrán los enfermos, de modo que se pueda comenzar con dosis mayores o menores según el caso.

Objetivos:

1.-Determinar el papel de los polimorfismos en los genes MDR-1, CYP3A4 y CYP2C8, en relación a la variabilidad individual de las concentraciones de ciclosporina y del riesgo de rechazo en pacientes sometidos a un primer trasplante cardíaco.

Objetivos secundarios:

1.-Estudiar si existe correlación entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y los eventos clínicos en el primer año postrasplante en función de los diferentes polimorfismos analizados.

2.-Elaborar un modelo que, teniendo en cuenta los factores genéticos y farmacocinéticos analizados, permita predecir las posibilidades de rechazo y la supervivencia tras un año de trasplante.

3-Aplicar una estrategia de Biología Computacional para seleccionar nuevos genes cuyas proteínas estén implicadas en la farmacodinamia de la ciclosporina y estudiar su relación con la aparición de rechazo agudo precoz en nuestra población.

¿Por qué se me pide que participe en este estudio?

Se le ha pedido que participe en el estudio y que done muestras de su sangre para analizar su ADN y otros componentes de la sangre. La información que se obtenga será utilizada para investigar que relación existe entre los genes, las concentraciones en sangre de ciclosporina y la incidencia de rechazo agudo. Su autorización para donar estas muestras de sangre es opcional y depende por entero de usted. Tanto si decide donarlas como si decide no hacerlo, recibirá el mismo trato médico. Si decide no donar la muestra o sí retira su consentimiento, no perderá ninguno de los beneficios, el tratamiento médico ni los derechos que le correspondan. El investigador no desea identificarle en relación con esta investigación y utilizará procedimientos diseñados para impedir que los resultados de la misma sean relacionados con usted.

¿En qué consistirá mi participación?

Tras ser seleccionado, se le realizará una única extracción de sangre venosa periférica mediante una aguja y una jeringa, con el fin de realizar el análisis genético. También se realizarán extracciones de sangre venosa periférica (en los tiempos: pre-dosis, 0'5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas tras la administración de la dosis matutina de los fármacos) y biopsia endomiocárdica (los días +14, +21 y +28 tras el trasplante; posteriormente, cada dos semanas durante 2 meses, luego cada mes durante 3 meses y, finalmente, cada dos meses hasta el final del primer año), tal y como está especificado en el protocolo de trasplante cardíaco de este hospital. Con estas muestras se pretende monitorizar los niveles de ciclosporina a lo largo del primer año postrasplante y analizar de forma precoz si existe rechazo del órgano trasplantado.

¿Qué efectos adversos pueden derivarse de mi donación de las muestras de sangre?

Debe saber que se utilizará una aguja para extraerle sangre. La mayoría de los donantes experimenta un ligero dolor en el punto de inserción de la aguja y algunos pueden desarrollar un hematoma.

Los procedimientos han sido diseñados para que sea muy difícil relacionarle a usted con los resultados de la investigación genética. No obstante, existe siempre una remota posibilidad de que la información sobre su participación en este estudio sea conocida.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (nombre y apellidos) _____

He leído y entendido la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio.

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:
(A completar por el paciente)

Firma del Participante.

Fecha:

Firma de la persona que llevó la discusión del
Consentimiento informado.

Fecha:

Firma del investigador*

- En caso de que sea la misma persona que llevó la discusión del consentimiento informado, debe firmar también en este apartado.

CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE

Yo (nombre y apellidos)_____

En calidad de (relación con el participante): _____ de (nombre del participante):_____

He leído y entendido la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado.
He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con (nombre del Investigador)_____

Comprendo que la participación es voluntaria,
Comprendo que puede retirarse del estudio.:
1º Cuando quiera.
2º Sin tener que dar explicaciones.
3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a _____ toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que _____ participe en este estudio.

Fecha:
Firma del representante.
(a completar por el representante).

Fecha: _____ Firma de la persona que llevó la discusión del Consentimiento informado.

Fecha: _____ Firma del Investigador*

*En caso de que sea la misma persona que llevó la discusión del consentimiento informado, debe firmar también en este apartado.

CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Yo (nombre y apellidos) _____

Declaro bajo mi responsabilidad que _____

Ha recibido y entendido la hoja de información sobre el estudio.
Ha podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado,
Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
Ha sido informado por _____

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:
1º Cuando quiera.
2º Sin tener que dar explicaciones.
3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Fecha:
(A completar por el Testigo)

Firma del Testigo Imparcial.

Fecha:
(A completar por el paciente)

Firma (o marca o huella digital)
del paciente:

Fecha:

Firma de la persona que llevó la discusión del
consentimiento informado.

Fecha:

Firma del Investigador*

* En caso de que sea la misma persona que llevó la discusión del consentimiento informado, debe firmar también en este apartado.