



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

Farmacogenética do transplante renal: influência de polimorfismos em *CYP3A5* e *ABCB1*

Ana Beatriz de Menezes Santoro

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

Farmacogenética do transplante renal: influência de polimorfismos em *CYP3A5* e *ABCB1*

Ana Beatriz de Menezes Santoro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientador: Guilherme Suarez Kurtz

Rio de Janeiro
2009

Farmacogenética do transplante renal: influência de polimorfismos em *CYP3A5* e *ABCB1*

Ana Beatriz de Menezes Santoro

Orientador: Guilherme Suarez Kurtz

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Aprovada por:

Dr. Marcelo Rosado Fantappié (Presidente da banca)

Dra. Mara Helena Hutz

Dr. Marcello Barcinski

Dr. Wagner Seixas da Silva (Suplente interno)

Dr. Rodrigo de Moraes Brindeiro (Suplente externo)

Dr. Guilherme Suarez Kurtz (Orientador)

Dra. Margaret Magdesian (Revisora)

Rio de Janeiro

2009

Santoro, Ana Beatriz de Menezes

Farmacogenética do transplante renal: influência de polimorfismos em *CYP3A5* e *ABCB1* / Ana Beatriz de Menezes Santoro – Rio de Janeiro: UFRJ/CCS, 2009.

xviii, 80f.: il.

Orientador: Guilherme Suarez Kurtz

Tese (doutorado) – UFRJ/CCS/Instituto de Bioquímica Médica, 2009

Referências Bibliográficas: p. 53 – 69

1. Farmacogenética 2. Imunossupressores 3. Transplante renal 4. *CYP3A5*
5. *ABCB1* I. Suarez Kurtz, Guilherme II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Bioquímica Médica III. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor e compreensão e por terem me oferecido mais oportunidades que uma pessoa jamais possa precisar. Ao meu pai, pelos exemplos de amor e devoção incondicionais à família. À minha mãe, pelo imenso apoio em todos os momentos e por sempre acreditar que eu posso, mesmo quando eu não acredito.

Aos meus queridos irmãos, pelos momentos de alegria e felicidade. Companheiros eternos que levo sempre comigo. Luciano que é mais um coração que uma pessoa, Raphael, meu exemplo de correção e Titi que eu admiro pelo carisma sem igual.

Ao professor Guilherme que mesmo em uma situação difícil me recebeu em seu laboratório e me ofereceu tudo o que foi necessário para realização dessa tese.

Aos membros do Hospital do Rim que colaboraram nesse trabalho. Dr. Helio Tedesco, responsável pelo projeto junto ao Hospital, Dra. Cláudia Felipe que supervisionou a submissão do estudo ao Comitê de Ética e Michele Takaoka que coordenou o recrutamento de pacientes.

À Dra. Elida Ojopi do Hospital das Clínicas por ter aberto seu laboratório e pela ajuda na genotipagem de *ABCB1*.

Ao Dr. Claudio J Struchiner, pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os companheiros de laboratório, sempre disponíveis para dar aquela ajudinha.

À Lilian Maria, por estar sempre disposta a ajudar e resolver problemas. Obrigada por ter me ajudado em tudo que fosse preciso, dentro e fora do laboratório.

À Dani, pelos momentos de descontração, pelos cafés e por me mostrar que às vezes não tem jeito e rir é a melhor solução.

Aos amigos de sempre, Bibba, Renata, Eidy, Clay e Pablo. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins. Obrigada por todos os chopps, risadas e conselhos. Obrigada por serem AMIGOS.

Aos amigos do Fundão, Gisele, Bianca, Camila, Cyntia, Andreia, Willy, Bruno, Thiago, Michel e Leandro. União, respeito e carinho são sentimentos que ficarão para sempre comigo quando penso em vocês. Além da lembrança de momentos

impagáveis que só essa mistura de tipos seria capaz de gerar. Um agradecimento especial à Bianca, por ter me ensinado a dividir responsabilidades.

Ao Marcelo, pelo amor, pela paciência, pelo cuidado, pelos sonhos (de doce de leite),... Por muito mais que tudo! A conclusão de um projeto não depende de uma só pessoa, e devo a você não só a conclusão dessa tese, mas também a conclusão do meu projeto de vida.

RESUMO

A ciclosporina (CSA) e o tacrolimus (FK) são imunossupressores amplamente utilizados no transplante renal. Esses medicamentos apresentam grande variabilidade farmacocinética entre os indivíduos além de possuírem uma estreita faixa terapêutica. Tais características têm importante impacto na eficácia do tratamento e na indução de toxicidade. A ciclosporina e o tacrolimus são metabolizados pela enzima CYP3A5 e servem de substrato para a proteína transportadora P-gp, que são considerados os determinantes farmacocinéticos mais importantes desses medicamentos e, portanto, se tornaram os principais alvos de interesse farmacogenético. Esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito de polimorfismos em *CYP3A5* e *ABCB1* na dose requerida e na “concentração no vale” corrigida pela dose (C_0 /dose) de CSA e FK até o terceiro mês após o transplante. Pacientes transplantados renais recebendo CSA (n = 150) ou FK (n = 151) foram genotipados para os polimorfismos 6986A>G e 14690G>A de *CYP3A5* e 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T de *ABCB1*. As doses requeridas assim como a C_0 /dose foram comparadas entre os pacientes, de acordo com o status alélico de *CYP3A5* e *ABCB1*. No 2º e 3º meses após o transplante, os indivíduos homozigotos mutantes apresentaram maior C_0 /dose de CSA que indivíduos heterozigotos ou homozigotos selvagens para todos os polimorfismos de *ABCB1* estudados e, em relação aos haplótipos de *ABCB1*, foi observado que a C_0 /dose de CSA reduz de acordo com o aumento no número de cópias do haplótipo selvagem. O genótipo de *CYP3A5* não teve influência na C_0 /dose de CSA e nenhum polimorfismo, em *CYP3A5* e *ABCB1*, teve efeito na dose de CSA. Para FK, a análise multivariada mostrou o genótipo de *CYP3A5* como a única variável significativa na determinação da C_0 /dose e indivíduos portadores do alelo selvagem de *CYP3A5* apresentaram valores de C_0 /dose menores, em todos os tempos de acompanhamento. O genótipo de *CYP3A5* também teve um efeito significativo na dose requerida de FK, já na primeira semana após o transplante. Pacientes homozigotos selvagens receberam doses de 1,5 a 3,0 vezes maiores que pacientes homozigotos mutantes. Dada a importância de atingir rapidamente a C_0 alvo após o transplante, este trabalho sugere que a genotipagem de *CYP3A5* pode contribuir significativamente para a melhoria da terapia com tacrolimus.

Palavras-chave: Farmacogenética; Imunossupressores; Transplante renal; *CYP3A5*; *ABCB1*

ABSTRACT

Cyclosporine (CSA) and tacrolimus (FK) are immunosuppressive drugs widely used in renal transplantation. They are characterized by a large inter-individual pharmacokinetics variability and a narrow therapeutic index. Such characteristics have an important impact in treatment efficacy and toxicity induction. Cyclosporine and tacrolimus are metabolized by CYP3A5 and are also substrates for P-glycoprotein. For this reason, they appear as the most relevant determinants of the metabolism of these drugs and therefore had become de mainly targets of pharmacogenetics studies. The objective of this study was to investigate the effect of *CYP3A5* and *ABCB1* polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirement and dose-adjusted trough concentration in the early stage after transplantation. Patients receiving cyclosporine (n = 150) or tacrolimus (n = 151) were genotyped for *CYP3A5* (6986A>G and 14690G>A) and *ABCB1* (1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T) polymorphisms. Dose requirement as well as dose-adjusted trough concentrations were compared among patients according to allelic status for *CYP3A5* and *ABCB1*. After 2 and 3 months of transplantation, mutant homozygous patients showed higher CSA dose-adjusted trough concentration than heterozygous and wild type homozygous, for all *ABCB1* polymorphisms analyzed. The number of wild type haplotype copies also had a significant effect at C₀/dose for the same period. No association was found between CSA C₀/dose and *CYP3A5* genotype and between CSA dose requirement and *CYP3A5* or *ABCB1* genotype. In the case of FK, multivariate analysis revealed *CYP3A5* genotype as the only significant variable in the determination of C₀/dose with *CYP3A5* expressors showing the lowest ratios during the first 3 months. *CYP3A5* genotype also had a highly significant effect at FK dose requirement already at the first week after transplantation. Dose requirement were 1,5-3,0 fold higher in *CYP3A5**1/*1 patients than in *CYP3A5* non-expressors. Given the importance of rapidly achieving target blood concentrations after transplantation, *CYP3A5* genotyping could contribute to a better immunosuppressive therapy with tacrolimus.

Keywords: pharmacogenetics; immunosuppressants; renal transplant; *CYP3A5*; *ABCB1*

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ABS	Absorbância
ACA	componente de ancestralidade africana
ATP	Adenosina trifostfato
AUC	Área sob a curva
AUC _{0→∞}	Área sob a curva ao infinito
AZA	azatioprina
cm	Centímetros
C _{máx}	Concentração máxima
C ₀	Concentração no vale
C ₀ /dose	Concentração no vale corrigida pela dose
CSA	ciclosporina
CYP	citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FK	tacrolimus
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL-2	Interleucina 2
Kb	Quilobases
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
nm	Nanometros
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	glicoproteína-P
PRED	prednisona
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SRL	sirolimus
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
U	Unidade de atividade enzimática
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do locus <i>CYP3A</i>	7
Figura 2: Representação esquemática do gene <i>CYP3A5</i>	9
Figura 3: Representação esquemática dos alelos de <i>CYP3A5</i>	10
Figura 4: Distribuição da dose requerida de FK para pacientes transplantados renais com pelo menos um alelo funcional de <i>CYP3A5</i> X homozigotos <i>CYP3A5</i> *3/*3.....	12
Figura 5: Genótipo de <i>CYP3A5</i> e rejeição aguda	13
Figura 6: Representação esquemática do transporte mediado por P-gp.....	17
Figura 7: Distribuição do polimorfismo <i>CYP3A5</i> *3 de acordo com o ACA na população brasileira.....	20
Figura 8: Distribuição dos polimorfismos em <i>ABCB1</i> de acordo com o ACA na população brasileira.....	21
Figura 9: Perfil de digestão para detecção do alelo <i>CYP3A5</i> *3	26
Figura 10: Perfil de digestão para detecção do alelo <i>CYP3A5</i> *6	26

Figura 11: Perfil de eletroforese da genotipagem por SNaPshot dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T	28
Figura 12: Distribuição da C_0 /dose de ciclosporina em relação ao genótipo de <i>ABCB1</i>	38
Figura 13: Distribuição da C_0 /dose de ciclosporina em relação ao número de cópias do haplótipo selvagem de <i>ABCB1</i>	38
Figura 14: Distribuição da dose requerida de tacrolimus em relação ao genótipo de <i>CYP3A5</i> nos diferentes tempos de acompanhamento.....	41
Figura 15: Distribuição da C_0 /dose de tacrolimus em relação ao genótipo de <i>CYP3A5</i> nos diferentes tempos de acompanhamento	44
Figura 16: Distribuição da C_0 /dose de tacrolimus em relação ao genótipo/haplótipo de <i>ABCB1</i> no 3º mês após transplante.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Associação do genótipo de <i>CYP3A5</i> e a concentração de tacrolimus em pacientes transplantados renais.....	11
Tabela 2: Impacto do genótipo de <i>CYP3A5</i> para atingir a Co alvo de tacrolimus	12
Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para identificação dos alelos *3 e *6 de <i>CYP3A5</i>	25
Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos usados na PCR multiplex de <i>ABCB1</i>	27
Tabela 5: Sequência dos oligonucleotídeos internos usados no SNaPshot de <i>ABCB1</i> ..	28
Tabela 6: Características demográficas e clínicas dos pacientes no momento do transplante.....	31
Tabela 7: Doses diárias de ciclosporina e tacrolimus nos três primeiros meses após transplante.....	32
Tabela 8: Frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos em <i>CYP3A5</i> em pacientes transplantados renais.....	33
Tabela 9: Frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos em <i>ABCB1</i> em pacientes transplantados renais.....	34

Tabela 10: Desequilíbrio de ligação dos polimorfismos nas posições 1236, 2677 e 3435 de <i>ABCB1</i> em pacientes transplantados renais	35
Tabela 11: Frequência haplotípica de <i>ABCB1</i> em pacientes transplantados renais	35
Tabela 12: Influência dos genótipos/haplótipos de <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> na C_0 /dose ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{mg}$) de ciclosporina em pacientes transplantados renais	37
Tabela 13: Análise univariada dos determinantes de C_0 /dose de ciclosporina.....	39
Tabela 14: Análise multivariada dos determinantes de C_0 /dose de ciclosporina no 3º mês após o transplante.....	39
Tabela 15: Influência do genótipo de <i>CYP3A5</i> na dose requerida (mg) de tacrolimus em pacientes transplantados renais.....	40
Tabela 16: Influência dos genótipos/haplótipos de <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> na C_0 /dose ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{mg}$) de tacrolimus em pacientes transplantados renais.....	43

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	Carta de aceitação do projeto pelo Comitê de Ética.....	70
ANEXO II	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73
ANEXO III	Questionário Demográfico	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transplante renal no Brasil	1
1.1.1. Hospital do Rim de São Paulo	2
1.2. Esquema imunossupressor	2
1.3. Farmacogenética	4
1.4. Alvos farmacogenéticos no transplante renal	5
1.5. Enzimas da subfamília CYP3A	5
1.5.1. CYP3A4	7
1.5.2. CYP3A5	8
1.5.2.1. CYP3A5 e tacrolimus	10
1.5.2.2. CYP3A5 e ciclosporina	14
1.5.2.3. CYP3A5 e sirolimus	15
1.6. Glicoproteína-P	16
1.7. Etnia e polimorfismos de <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i>	18
 2. OBJETIVOS	 22
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 23
3.1. Ética	23
3.2. População estudada	23
3.3. Coleta e envio das amostras	24
3.4. Extração de DNA genômico	24

3.5. Genotipagem	25
3.5.1. <i>CYP3A5</i>	25
3.5.2. <i>ABCB1</i>	27
3.6. Desequilíbrio de ligação e análise de haplótipos	29
3.7. Dosagem dos medicamentos no sangue total	29
3.8. Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS	31
4.1. População estudada	31
4.2. Frequências dos polimorfismos de <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> em pacientes transplantados renais	32
4.3. Efeito dos genótipos/haplótipos de <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> na dose requerida e na C_0 /dose de ciclosporina	35
4.4. Efeito dos genótipos/haplótipos de <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> na dose requerida e na C_0 /dose de tacrolimus	39
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Efeito de variáveis genéticas na dose requerida de tacrolimus e ciclosporina	47
5.2. Efeito de variáveis demográficas, clínicas e genéticas na C_0 /dose de tacrolimus e ciclosporina	49
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ANEXO I	70
ANEXO II	73
ANEXO III	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transplante renal no Brasil

Nas últimas décadas, o Brasil desenvolveu modelos bem sucedidos de assistência de saúde financiados pelo governo federal. Dois bons exemplos são o programa de HIV e o de transplante de órgãos nos quais o governo além de regular as atividades também financia os tratamentos que têm um alto custo e incluem acompanhamento ao longo de toda vida do paciente. A verba para esses programas vem do sistema público de saúde e conta com aproximadamente US\$35 bilhões ou US\$200 por pessoa (IBGE, 2005). O Ministério da Saúde regula a doação de órgãos em cada estado e utiliza listas regionais de candidatos para transplante. Apenas 5% dos transplantes são realizados em instituições privadas, que também são monitoradas pelo governo (Medina-Pestana *e cols.*, 2002).

Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2006 foram realizados 2904 transplantes renais no Brasil. Entretanto, estima-se que o número de pacientes em diálise é de aproximadamente 58.000 (Medina-Pestana *e cols.*, 2006). O sistema nacional de transplante preconiza que a possibilidade de receber um órgão transplantado seja oferecida a todo paciente em diálise e encoraja a inclusão da maioria de pacientes em listas de espera, a não ser que o paciente apresente alguma contraindicação clínica. Com essa política, aproximadamente 70% dos pacientes com falência renal estão em lista de espera, enquanto em outros países essa fração é de apenas 30-50% (USRDS, 2004). O tempo médio de espera para o transplante é de 50-60 meses e, desde 2002 a seleção dos pacientes tem sido feita com base na histocompatibilidade. A maioria dos procedimentos realizados nos centros de transplante do Brasil ainda é de doadores vivos. Uma das principais razões para isso é que a criação de sistemas bem controlados e organizados para identificação de potenciais doadores mortos só ocorreu em 1996. A partir de então, o número de transplantes realizados de doadores mortos cresceu de 862 em 1996 para 1.790 em 2004 (Medina-Pestana *e cols.*, 2006).

1.1.1. Hospital do Rim de São Paulo

O Hospital do Rim de São Paulo foi fundado em 1998 e é o centro brasileiro de referência em transplante renal. Ele conta com dois programas de transplante distintos, um de doador morto e outro de doador vivo. Neste último, o paciente não é incluído em lista de espera. De acordo com as leis brasileiras o transplante de doador vivo fica limitado a parentes de primeiro a quarto grau ou esposas, a idade mínima é de 21 anos, mas o programa desencoraja a doação para doadores menores de 30 anos. O hospital realizou 3.172 transplantes entre janeiro de 1999 e dezembro de 2004. Durante esse período a incidência de rejeição aguda foi de 22% e 26% para doadores vivos e mortos, respectivamente. Para doadores vivos, a sobrevida em 3 anos do paciente transplantado foi de 96,3% e a sobrevida, também em 3 anos, do órgão transplantado foi de 87,3%. Para doadores mortos, a sobrevida em 3 anos foi de 86,7% e 71,3% para paciente e órgão, respectivamente. Uma melhor seleção de doadores mortos assim como o uso da terapia de indução (que ocorre em menos de 10% dos pacientes) e ajustes no esquema imunossupressor podem contribuir para redução na mortalidade e perda do órgão (Medina-Pestana *e cols.*, 2006).

1.2. Esquema imunossupressor

O transplante de rim é o tratamento de escolha para pacientes com falência renal. Dados recentes têm mostrado um aumento constante na sobrevida do órgão. Esse aumento é resultado principalmente da descoberta de novos imunossupressores que previnem a ocorrência de rejeição aguda (Hariharan *e cols.*, 2000). No entanto, a principal preocupação é a melhoria a longo prazo da sobrevida do órgão, relacionada em parte à nefrotoxicidade crônica associada ao uso de imunossupressores (Bennett *e cols.*, 1996).

Diversas classes de medicamentos têm sido usadas com sucesso para suprimir o sistema imune de receptores de transplantes, entre elas: corticosteróides, inibidores de calcineurina, agentes antiproliferativos e anticorpos mono e policlonais. Os inibidores de calcineurina (ciclosporina – CSA e tacrolimus – FK) e o inibidor de mTOR

(*macrocyclic target of rapamycin*; sirolimus – SRL) são imunossupressores altamente eficazes utilizados no transplante de órgão sólido. Os inibidores de calcineurina suprimem o sistema imune através da inibição da produção de interleucina-2 (IL-2) pelas células T. CSA e FK se ligam a imunofilinas intracelulares e inibem a atividade fosfatase de calcineurina, que é necessária para que ocorra a translocação de fatores de transcrição para o núcleo das células T ativadas, onde se dará a síntese de citocinas. A redução na secreção de IL-2 reduz significativamente a função do sistema imune (Utecht *e cols.*, 2006). Já o SRL se liga a proteínas da via mTOR, interrompe a sinalização por essa via e assim, inibe a proliferação e expansão clonal de células T dependente de IL-2 (Mourad *e cols.*, 2005).

Além de apresentar pequena biodisponibilidade oral (CSA = 35%, FK = 25% e SRL = 15%) (Mourad *e cols.*, 2005; Yu *e cols.*, 2006), os imunossupressores são de difícil uso clínico pois apresentam estreita faixa terapêutica e ampla variabilidade interindividual (Utecht *e cols.*, 2006). Por esse motivo é necessário que haja um acompanhamento dos pacientes para mantê-los dentro da faixa de tratamento. Segundo o protocolo adotado no Hospital do Rim, a “concentração no vale” (C_0) alvo para CSA varia de 250 – 300 ng/mL na primeira semana, de 200 – 250 ng/mL no primeiro e segundo meses, de 100-150 ng/mL no terceiro mês e de 75-100 ng/mL após esse período. Para SRL a C_0 alvo varia de 8 – 12 ng/mL ou 15 – 20 ng/mL para pacientes tratados concomitantemente ou não com inibidores de calcineurina, respectivamente. Para FK varia de 12 – 15 ng/mL na primeira semana, de 10 – 12 até o primeiro mês, de 8 – 10 ng/mL até o terceiro mês e de 5 – 8 ng/mL após esse período. Concentrações acima da C_0 alvo aumentam o risco de infecção e de efeitos colaterais adversos - diabetes mellitus, hipertensão, hiperlipidemia e nefrotoxicidade (Cohen *e cols.*, 2001). Concentrações abaixo da C_0 alvo aumentam o risco de rejeição aguda e perda do órgão (Matas *e cols.*, 1996).

Algumas interações medicamentosas podem interferir significativamente na farmacocinética dos imunossupressores. Já foi demonstrado, por exemplo, que a redução ou interrupção de corticosteróide causa uma redução na depuração de FK (van Duijnhoven *e cols.*, 2003) e que pacientes fazendo uso de corticosteróides durante a terapia de manutenção apresentam maior risco de desenvolver toxicidade. Essas observações são explicadas pelo efeito de indução que o uso de corticosteróide tem sobre as enzimas que metabolizam esses medicamentos (enzimas da família citocromo P450 3A, CYP3A) e sobre a bomba de efluxo (glicoproteína-P, P-gp) que usa os

mesmos como substrato (Shimada *e cols.*, 2002). Também já foi descrita uma interação farmacocinética entre os imunossupressores, principalmente CSA e SRL (Podder *e cols.*, 2001; Bai *e cols.*, 2004; Cattaneo *e cols.*, 2004). Foi observado que a C_0 /dose de SRL é significativamente maior em pacientes tratados concomitantemente com CSA, mas não em pacientes tratados com SRL e micofenolato mofetil. Isso pode ser explicado pela interação de CSA com P-gp, que é muito mais forte, e faz com que a absorção intestinal de SRL seja maior (Yoo *e cols.*, 2001).

Além dessas interações medicamentosas, a observação de que a variação interindividual encontrada é maior que a variação intraindividual é consistente com a noção que características genéticas são importantes determinantes na resposta a esses medicamentos (Thervet *e cols.*, 2008).

1.3. Farmacogenética

Existe grande heterogeneidade na maneira pela qual os indivíduos respondem aos fármacos, em termos de eficácia e desenvolvimento de toxicidade. As causas dessa variabilidade são muitas, incluindo, por exemplo, a severidade da doença, interações entre medicamentos, e doenças associadas. Apesar da importância dessas variáveis clínicas na determinação dos efeitos de um fármaco, diferenças hereditárias no metabolismo e disposição dos medicamentos e polimorfismos genéticos em alvos terapêuticos, podem ter influência ainda maior na eficácia ou toxicidade do tratamento (Evans *e cols.*, 1999).

Observações clínicas de diferenças hereditárias no efeito de fármacos foram descritas inicialmente nos anos 50, exemplificadas pela associação entre o surgimento de neuropatia periférica relacionada ao uso de isoniazida e diferenças interindividuais na acetilação desse medicamento (Hughes *e cols.*, 1954). Poucos anos depois, um relaxamento muscular prolongado após o uso de succinilcolina foi descrito em indivíduos com deficiência da atividade plasmática de acetilcolinesterase (Kalow *e cols.*, 1956). As bases moleculares dessas observações começaram a ser elucidadas nos anos 80 com a clonagem e caracterização do gene polimórfico que codifica a enzima CYP2D6. A partir daí, outros polimorfismos tiveram seus mecanismos moleculares descritos e suas importâncias clínicas foram mais claramente definidas (Nebert *e cols.*,

1997). As observações descritas na década de 50 deram impulso para o desenvolvimento de uma nova área que em 1959 recebeu o nome de farmacogenética. Esta área trata da influência dos fatores genéticos na resposta aos medicamentos e também recebe o nome de farmacogenômica (www.refargen.org.br). Não há limites definidos entre os dois termos, que são usados como sinônimos.

A caracterização de polimorfismos genéticos e seus mecanismos moleculares proporciona uma base racional para a individualização da terapêutica, ou seja, a prescrição do medicamento correto, na dose adequada para cada indivíduo, sendo esta a maior promessa da farmacogenética (www.refargen.org.br).

1.4. Alvos farmacogenéticos no transplante renal

Os imunossupressores representam uma classe de medicamentos em que a busca de conhecimentos farmacogenéticos para direcionar a conduta terapêutica é justificável, dada a alta variabilidade farmacocinética, a estreita faixa terapêutica, o elevado custo dos procedimentos clínicos e a importância para a sobrevivência do paciente (Utecht *e cols.*, 2006). Por esse motivo, nos últimos anos muitos estudos de farmacogenética de imunossupressores têm sido realizados. Tendo em vista que a biodisponibilidade e o metabolismo desses medicamentos são controlados principalmente por bombas de efluxo e enzimas metabolizadoras encontradas no fígado e no trato gastro-intestinal, os estudos realizados focam principalmente na contribuição dos polimorfismos em enzimas metabolizadoras da família CYP3A e na proteína transportadora P-gp. Esses parecem ser os principais determinantes na farmacocinética dos imunossupressores em uso (Yu *e cols.*, 2006).

1.5. Enzimas da subfamília CYP3A

O complexo do citocromo P450 compreende um grupo de monooxigenases que contém o grupamento heme e que desempenham um papel fundamental no metabolismo de primeira fase de compostos endógenos (como esteróides, ácidos graxos

e prostaglandinas), exógenos (fármacos e carcinógenos) e substâncias químicas ambientais (Goodman & Gilman, 2003).

As proteínas CYP são classificadas em famílias e subfamílias com base na similaridade de seqüência. Em humanos, o grupo CYP3A é o mais expresso no fígado e intestino, representando, respectivamente, aproximadamente 30% e 70% do conteúdo total de CYPs e é responsável pelo metabolismo de primeira fase de mais de 50% dos medicamentos em uso clínico, incluindo os imunossupressores (Kuehl *e cols.*, 2001).

A subfamília CYP3A é constituída de quatro proteínas homólogas codificadas pelos genes *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e o recentemente descrito *CYP3A43* (Gellner *e cols.*, 2001). Esses genes estão localizados de forma adjacente na região cromossômica 7q21.3-q22.1 e as proteínas codificadas por eles apresentam grande similaridade de estrutura e identidade de seqüência (Finta *e cols.*, 2000) (figura 1).

Dentro da subfamília CYP3A, *CYP3A4* e *CYP3A5* são as enzimas mais abundantes e importantes, com 85% de homologia na seqüência de aminoácidos e grande sobreposição de substratos (Gorski *e cols.*, 1994). *CYP3A4* se localiza principalmente no fígado, jejuno, cólon e pâncreas enquanto *CYP3A5* é mais presente no intestino e estômago (Cholerton *e cols.*, 1992). *CYP3A7* é expressa durante a vida fetal quando representa 30-50% do conteúdo total de CYPs mas provavelmente não tem nenhuma função em adultos (Schuetz *e cols.*, 1994). *CYP3A43* tem baixa expressão no fígado e seu papel ainda não é bem conhecido (Domanski *e cols.*, 2001).

A grande variabilidade interindividual na expressão de CYP3A, maior que 30 vezes em algumas populações, contribui fortemente para a variação na biodisponibilidade oral e na depuração dos substratos dessas enzimas (Watkins *e cols.*, 1995). Essa variação é particularmente importante para substratos com janela terapêutica estreita, como é o caso dos imunossupressores, e pode resultar em diferenças clínicas importantes de resposta e toxicidade; no caso de transplantados renais, rejeição e nefrotoxicidade.

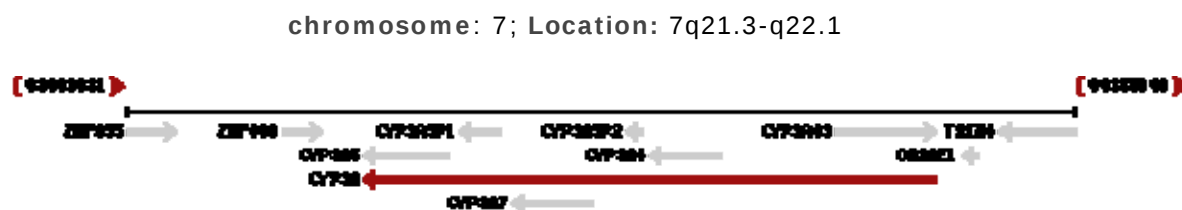


Figura 1: Representação esquemática do locus CYP3A (Entrez Gene, NCBI).

1.5.1. CYP3A4

A enzima CYP3A4 é a CYP mais bem estudada no fígado e intestino humano e sua atividade apresenta grande variabilidade interindividual. Já foram descritos 5 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) na região promotora e 19 SNPs na região codificante de CYP3A4. No entanto, a ocorrência dos alelos variantes é rara e a incidência do polimorfismo mais freqüente, designado *CYP3A4*1B* (-392A>G) é de 9% em indivíduos de origem caucasiana (Walker *e cols.*, 1998), 8% em brasileiros (Almeida *e cols.*, 2005) enquanto em asiáticos não foi detectado (Sata *e cols.*, 2000; Hsieh *e cols.*, 2001). Esse fato contribui para que o impacto desses variantes ainda não seja bem estabelecido (Ball *e cols.*, 1999). Além disso, o significado funcional desse SNP na atividade enzimática ainda é uma questão de debate. Por estar localizado na região promotora, acredita-se que esse SNP possa estar envolvido com variações na expressão gênica e não na atividade catalítica. Foi originalmente proposto que o alelo *CYP3A4*1B* estaria associado com atividade hepática de CYP3A4 alterada (Rebbeck *e cols.*, 1998; Paris *e cols.*, 1999), mas esse dado não foi observado em outros trabalhos (Westlind *e cols.*, 1999; Ball *e cols.*, 1999). Também foi descrito que o alelo *CYP3A4*1B* estaria associado com um aumento na transcrição *in vitro* do gene *CYP3A4*, o que teoricamente resultaria em uma enzima com atividade enzimática aumentada (Amirimani *e cols.*, 1999). No entanto, não foi encontrada nenhuma associação entre esse polimorfismo e a atividade enzimática de CYP3A4 quando o fenótipo foi determinado *in vivo* pela depuração de nifedipina (Kuehl *e cols.*, 2001).

Os imunossupressores CSA, FK e SRL são substratos de CYP3A4 e, por esse motivo, especula-se que o polimorfismo desta enzima possa contribuir para explicar a variabilidade observada na farmacocinética desses medicamentos (Masuda *e cols.*,

2006). Um estudo demonstrou que indivíduos portadores do alelo mutante *CYP3A4*1B* apresentam concentrações plasmáticas de CSA menores que indivíduos selvagens (Min *e cols.*, 2003) mas esses resultados não foram reproduzidos em outros trabalhos (Rivory *e cols.*, 2000, Garcia-Martin *e cols.*, 2002). Em 2001, por exemplo, foi reportado que esse SNP não tem efeito significativo na C_0 plasmática de CSA em 124 pacientes de origem européia. Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa na dose necessária de CSA para manter C_0 similares em pacientes com ou sem alelo *CYP3A4*1B* (von Ahsen *e cols.*, 2001). No entanto, em 2003, Hesselink e colaboradores encontraram uma associação positiva entre portadores do alelo *CYP3A4*1B* e maior dose e menor C_0 /dose para FK (Hesselink *e cols.*, 2003). Como os estudos realizados até o momento apresentaram resultados controversos, o real impacto do polimorfismo *CYP3A4*1B* na farmacocinética de CSA e FK ainda permanece em debate.

Ao contrário de FK, que é metabolizado basicamente por CYP3A5, o imunossupressor SRL é metabolizado principalmente por CYP3A4 e apenas uma pequena contribuição de CYP3A5 (Jacobsen *e cols.*, 2001). Isso pode explicar a observação de que existe correlação entre a presença do alelo *CYP3A4*1B* e a dose requerida em pacientes mantidos em terapia única com SRL, na qual portadores do alelo *CYP3A4*1B* necessitam de dose maior para atingir C_0 alvo. Contudo, devido ao forte desequilíbrio de ligação entre esse alelo e o alelo *CYP3A5*1*, os autores especularam que os resultados positivos dos estudos com *CYP3A4*1B* podem estar sendo influenciados pelo genótipo de CYP3A5 (Anglicheau *e cols.*, 2005).

1.5.2. CYP3A5

A sequência do cDNA de CYP3A5 foi descrita independentemente por Aoyama e colaboradores (1989) e Schuetz e colaboradores (1989). O gene CYP3A5 está localizado na região cromossômica 7q22.1, junto com outros membros da família CYP3A. A representação esquemática do gene com seus exons e região codificante está demonstrada na figura abaixo (figura 2).



Figura 2: Representação esquemática do gene *CYP3A5* (Entrez Gene, NCBI).

O gene *CYP3A5* é polimórfico. Já foram descritos 25 alelos variantes, sendo a variante selvagem designada de *CYP3A5*1* (figura 3). A variante não-funcional mais estudada é a *CYP3A5*3*. Microsomas de fígado de indivíduos homozigotos para o alelo *CYP3A5*3* apresentaram aproximadamente metade da atividade catalítica medida pela metabolização do midazolam, comparada com indivíduos homozigotos para o alelo *CYP3A5*1* (Kuehl *e cols.*, 2001, Lin *e cols.*, 2002). O polimorfismo *CYP3A5*3* é caracterizado por uma transição 6986A>G no íntron 3 do gene *CYP3A5*. Essa mutação cria um sítio de *splicing* alternativo e como consequência a transcrição de um mRNA aberrante contendo uma inserção de 131 pb entre os exons 3 e 4. A tradução desse mRNA dá origem a uma proteína truncada como resultado da existência de um códon de término prematuro (Kuehl *e cols.*, 2001). O alelo *CYP3A5*3* encontra-se mais presente em indivíduos de origem caucasiana, com uma frequência em torno de 91-96% em europeus. Para outras populações a frequência do alelo *CYP3A5*3* é de 6-31% em africanos sub-saharianos (Kuehl *e cols.*, 2001; Lamba *e cols.*, 2002; Thompson *e cols.*, 2004; Garsa *e cols.*, 2005), 22-55% em afro-americanos (Hustert *e cols.*, 2001; Zeigler-Johnson *e cols.*, 2004; Floyd *e cols.*, 2003) e 63% em brasileiros (Suarez-Kurtz *e cols.*, 2007).

Outro polimorfismo não-funcional no gene *CYP3A5*, particularmente importante em populações de origem africana, é designado *CYP3A5*6*. Esse polimorfismo é caracterizado pela transição 14690G>A no éxon 7. A presença do nucleotídeo A na posição 14690 determina *splicing* alternativo com ausência do éxon 7 no mRNA e criação de um códon de término prematuro. A proteína produzida por essa variante é truncada e possui atividade catalítica bastante reduzida (Kuehl *e cols.*, 2001). A frequência desse polimorfismo varia de 10% a 22% em afro-americanos e é praticamente nula em populações brancas e asiáticas (Roy *e cols.*, 2005).



Figura 3: Representação esquemática dos alelos de *CYP3A5* (adaptado de www.pharmgkb.org).

Quando expresso, o gene *CYP3A5* constitui pelo menos 50% de todo o conteúdo de *CYP3A* no fígado e 61% no jejuno (Lin *e cols.*, 2002). Portanto, o polimorfismo genético observado em *CYP3A5* pode contribuir de forma significativa para as variações interindividuais descritas no processo de eliminação dependente de *CYP3A*. De fato, diversos trabalhos já demonstraram que os polimorfismos descritos em *CYP3A5* estão associados com efeitos farmacocinéticos nos imunossupressores de maneira mais significativa do que os polimorfismos em *CYP3A4* (Yu *e cols.*, 2006).

1.5.2.1. *CYP3A5* e tacrolimus

A influência do genótipo de *CYP3A5* na farmacocinética de imunossupressores foi inicialmente demonstrada em pacientes fazendo uso de tacrolimus (Mac Phee *e cols.*, 2002) e tem sido consistentemente reafirmada em trabalhos subsequentes (Ng *e cols.*, 2007). Em 2005, foi demonstrada uma diferença significativa na C_0 , na dose e na C_0 /dose de FK entre pacientes transplantados renais com diferentes genótipos de *CYP3A5* (tabela 1) (Zhang *e cols.*, 2005). Poucos meses depois, o mesmo efeito significativo do polimorfismo em *CYP3A5* sobre a dose requerida foi relatado por outro grupo de pesquisadores (figura 4) (Mourad *e cols.*, 2005). Além disso, ainda foi mostrado que um percentual maior de pacientes que

expressam *CYP3A5* não conseguiu atingir a C_0 alvo na primeira semana após transplante, colocando-os no grupo de maior risco de desenvolver rejeição aguda. Em contrapartida, um número maior de pacientes que não expressam *CYP3A5* atingiu C_0 acima de 20 ng/mL, que está relacionado com o desenvolvimento de efeitos colaterais como hiperglicemia, nefrotoxicidade e infecção (Zhang *e cols.*, 2005). Dado semelhante foi observado em pacientes de origem branca (tabela 2) (MacPhee *e cols.*, 2005). Em uma análise de regressão múltipla, foi visto que o polimorfismo em *CYP3A5* pode explicar até 38% da variação de dose requerida de FK (Haufrond *e cols.*, 2004).

Tabela 1: Associação do genótipo de *CYP3A5* e a concentração de tacrolimus em pacientes transplantados renais (adaptado de Zhang *e cols.*, 2005)

	CYP3A5 genotype			p Value
	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
Number of patients	12	36	70	
Tacrolimus C_0 (ng/mL)				
1 wk	4.9 ± 2.6	6.2 ± 2.2	14.4 ± 7.7	<0.001
1 month	7.3 ± 1.9	8.2 ± 2.4	11.0 ± 3.8	<0.001
3 months	4.7 ± 1.8	5.8 ± 1.9	8.3 ± 2.2	<0.001
Tacrolimus dose (mg/kg/d)				
1 wk	0.149 ± 0.013	0.153 ± 0.027	0.141 ± 0.026	0.024
1 month	0.224 ± 0.056	0.179 ± 0.044	0.117 ± 0.037	<0.001
3 months	0.146 ± 0.034	0.103 ± 0.032	0.068 ± 0.032	<0.001
Tacrolimus C_0 /dose (ng/mL per mg/kg/d)				
1 wk	32.8 ± 17.7	41.6 ± 15.8	102.3 ± 51.2	<0.001
1 month	33.1 ± 7.5	46.4 ± 12.9	103.2 ± 47.5	<0.001
3 months	35.3 ± 20.9	59.0 ± 20.6	150.3 ± 85.3	<0.001

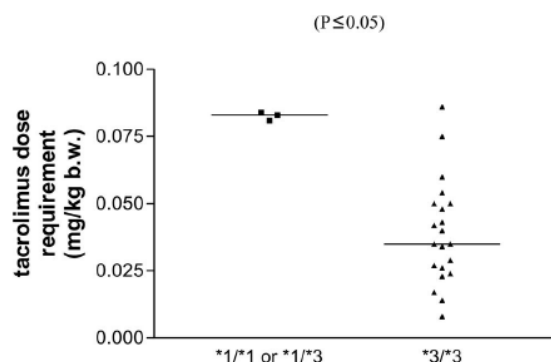


Figura 4: Distribuição da dose requerida de FK para pacientes transplantados renais com pelo menos um alelo funcional de *CYP3A5* X homozigotos *CYP3A5**3/*3 (adaptado de Mourad *e cols.*, 2005).

Tabela 2: Impacto do genótipo de *CYP3A5* para atingir a C_0 alvo de tacrolimus

	% de pacientes com C_0 fora da faixa terapêutica					
	Primeira semana			Segunda semana		
	*3/*3	*1/*1 ou *1/*3	Qui-quadrado	*3/*3	*1/*1 ou *1/*3	Qui-quadrado
<15 µg/L (1ª semana)	8,2	39,3	<0,0001			
<10 µg/L (2ª semana)				3,3	17,9	<0,002
>20 µg/L (1ª semana)	73,0	39,3	<0,009			
>15 µg/L (2ª semana)				63,1	46,4	0,17

(adaptado de MacPhee *e cols.*, 2005)

Um parâmetro de grande importância na administração de imunossupressores é o tempo que o paciente demora em atingir a C_0 alvo. Diversos trabalhos, em diversos tipos de transplantes mostraram que a demora em atingir a C_0 alvo aumenta o risco de o paciente desenvolver rejeição aguda (Undre *e cols.*, 1999). No entanto, Roy e colaboradores demonstraram que não há diferença significativa na taxa de rejeição aguda entre pacientes *1/*1 ou *1/*3 vs *3/*3 (Roy *e cols.*, 2006). Este resultado foi corroborado por um estudo seguinte que mostrou que apesar de os pacientes com genótipo *CYP3A5**1/*1 ou *1/*3 apresentarem maior C_0 /dose de FK, a depuração de creatinina é semelhante em pacientes com ou sem expressão de *CYP3A5* (figura 5) (Hesselink *e cols.*, 2008). A única diferença observada até o momento foi que pacientes com os genótipos *CYP3A5**1/*1 ou *1/*3 apresentaram rejeição aguda mais

precocemente em relação a pacientes *CYP3A5**3/*3 (mediana 7 dias vs. 13 dias, $p = 0,005$) (MacPhee *e cols.*, 2004).

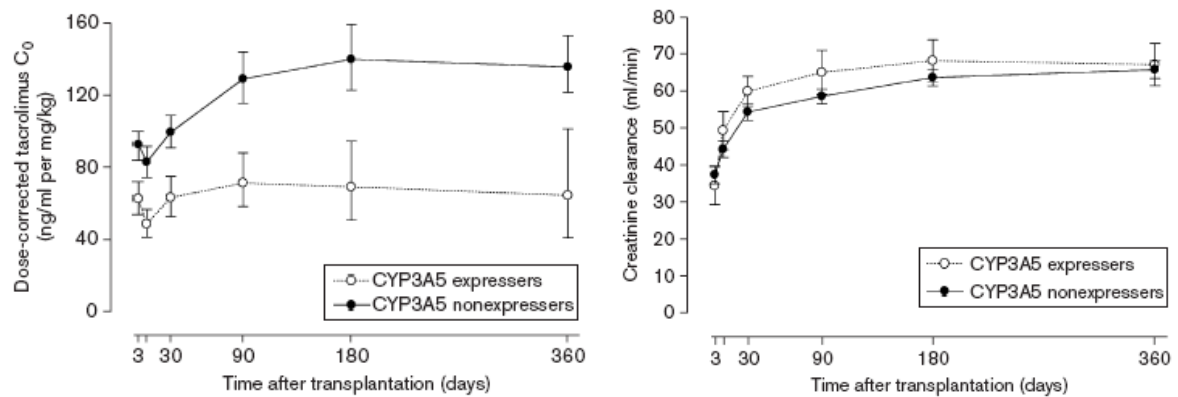


Figura 5: Genótipo de *CYP3A5* e rejeição aguda. Comparação da (A) C_0 /dose e (B) *clearance* médio de creatinina em pacientes que expressam ou não *CYP3A5* (adaptado de Hesselink *e cols.*, 2008).

Em relação à farmacocinética de tacrolimus foi observado que a $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (área sobre a curva) é 2,6 vezes maior em pacientes que não expressam *CYP3A5*. Com base nesse resultado, os autores argumentam a favor de um aumento de 2 vezes na dose de FK para pacientes com alta atividade de *CYP3A5*. Como os pacientes com baixa atividade de *CYP3A5* apresentaram concentração de FK acima do C_0 alvo, os autores também estão de acordo com uma redução na dose desses indivíduos e sugerem que a dose inicial seja de 0,075 mg/kg e 0,150 mg/kg duas vezes ao dia para pacientes que não expressam e expressam *CYP3A5*, respectivamente (Haufried *e cols.*, 2006).

A atividade aumentada de *CYP3A5* pode levar a um aumento na concentração sistêmica ou tecidual dos metabólitos de FK, como o 13-DMT (13-O-desmetiltacrolimus), condição que pode agravar ou induzir nefrotoxicidade (Kuypers *e cols.*, 2007). Experimentos *in vitro* confirmaram que a formação de 13-DMT é 13,5 vezes maior em microssomas de rim de pacientes com o genótipo *CYP3A5**1/*3 vs *CYP3A5**3/*3. Apesar da taxa de metabolismo absoluta no rim ser apenas uma fração

da que ocorre em fígado e, portanto, não contribuir significativamente para o *clearance* sistêmico, pode ser suficiente para afetar o acúmulo intrarenal de FK e seus metabólitos e causar toxicidade (Daí *e cols.*, 2006).

Em 2006, Uesugi e colaboradores examinaram pacientes submetidos a transplante de fígado e demonstraram que o genótipo de *CYP3A5*, no intestino e no fígado, dos receptores e dos doadores tinha um papel importante no metabolismo de primeira passagem de FK (Uesugi *e cols.*, 2006). No entanto, acredita-se que, para transplante de rim, o polimorfismo em *CYP3A5* parece afetar a terapia e a sobrevida do órgão de duas maneiras: Primeiro, o genótipo do receptor (relacionado à expressão no fígado e intestino) afetaria predominantemente o metabolismo do imunossupressor e conseqüentemente a dose requerida e os efeitos colaterais; Segundo, o genótipo doador (relacionado à expressão no rim) afetaria a regulação da pressão sanguínea e o tratamento anti-hipertensivo e, portanto, a sobrevida a longo prazo do órgão. Um potencial papel das enzimas da subfamília *CYP3A* no controle da pressão sanguínea é sugerido por experimentos *in vivo* usando o modelo de hipertensão espontânea em ratos e células isoladas de rim. Juntos esses resultados sugerem um envolvimento de *CYP3A5* na formação de 6 β -hidroxisteróide no rim com retenção renal de sódio. Contudo, os resultados do trabalho demonstraram que a pressão sanguínea e o tratamento anti-hipertensivo não eram afetados pelo genótipo de *CYP3A5* tanto do receptor quanto do doador, em pacientes transplantados renais (Kreutz *e cols.*, 2004).

1.5.2.2. CYP3A5 e ciclosporina

Diferente do que é observado para FK, a influência do polimorfismo de *CYP3A5* na farmacocinética de CSA foi descrita em poucos estudos e ainda assim com um impacto menor. Em 2003, foi demonstrado não haver associação entre o genótipo de *CYP3A5* e a C_0 /dose de CSA (Hesselink *e cols.*, 2003). Trabalhos posteriores também não conseguiram estabelecer nenhuma relação significativa entre os genótipos de *CYP3A5* e dose, C_0 , C_0 /dose ou $AUC_{0\rightarrow 12}$ de CSA (Kreutz *e cols.*, 2004; Anglicheau *e cols.*, 2004; Zhao *e cols.*, 2005). Contudo, também em 2003, foi observado que o *clearance* oral de CSA era significativamente menor em pacientes portadores do alelo *CYP3A5*1* (Yates *e cols.*, 2003). No entanto, como discutido pelos autores, essa

observação pode ser um artefato. No trabalho, os autores não conseguiram demonstrar que o status de *CYP3A5* influencia de maneira independente a farmacocinética de CSA, uma vez que todos os pacientes estudados também eram portadores do alelo MDR1 3435T. Além desse, outros dois trabalhos apresentam associação positiva entre o genótipo de *CYP3A5* e C_0 /dose de CSA (Haufrond *e cols.*, 2004; Hu *e cols.*, 2006), apesar do impacto observado para essa associação ser menor do que o observado para tacrolimus. No trabalho de Haufrond e colaboradores, foi observado que a C_0 /dose é 3 e 1,6 vezes maior em pacientes *CYP3A5**3/*3 para FK e CSA, respectivamente (Haufrond *e cols.*, 2004). Na literatura, o envolvimento exato de *CYP3A5* na farmacocinética de CSA ainda é controverso e necessita ser mais bem estudado.

1.5.2.3. *CYP3A5* e sirolimus

São poucos os estudos que avaliam o papel de polimorfismos em *CYP3A5* e sua relação na variabilidade interindividual observada em pacientes transplantados renais tratados com SRL. No primeiro deles, realizado em 2005, os autores identificaram que pacientes portadores do alelo *CYP3A5**1, tratados apenas com SRL, apresentam valores de C_0 /dose menores que pacientes não portadores desse alelo, sugerindo, que os primeiros, necessitam de uma dose maior de SRL para atingir a faixa terapêutica. No entanto, esse efeito farmacogenético pode ser limitado visto que a mesma associação não foi observada nos grupos que eram tratados de forma concomitante com inibidores de calcineurina (Anglicheau *e cols.*, 2005). Esse resultado foi confirmado em um estudo seguinte, com a demonstração que, durante os 3 primeiros meses após o transplante, a C_0 de SRL estava abaixo da C_0 alvo em pacientes com expressão de *CYP3A5* enquanto em pacientes sem expressão de *CYP3A5* estava acima da C_0 alvo (Le Meur *e cols.*, 2006). Posteriormente, também foi observada uma associação entre o status de *CYP3A5* e a farmacocinética de SRL com a demonstração que a AUC_{0-24} /dose é 2,1 vezes menor em pacientes que expressam *CYP3A5* (Renders *e cols.*, 2007). Mais recentemente foi descrita uma associação significativa entre SRL e *CYP3A5* na qual a C_0 /dose de SRL é maior em pacientes *CYP3A5**3/*3 (Miao *e cols.*, 2008). Assim como descrito por Anglicheau e colaboradores em 2005, os autores deste último trabalho (Miao *e cols.*, 2008) também demonstraram que o efeito de *CYP3A5* na

farmacocinética de SRL é menor em pacientes tratados de forma concomitante com CSA ou FK. Essa observação pode ser explicada pela interação farmacocinética observada entre SRL e os inibidores de calcineurina, principalmente CSA (Cattaneo *e cols.*, 2004). Como mostrado por Cattaneo e colaboradores, a quantidade molar de CSA excede muito a de SRL e pode assim inibir o metabolismo de SRL via CYP3A.

1.6. Glicoproteína-P

A glicoproteína-P (P-gp) é uma proteína integral de membrana plasmática e atua exportando substâncias do interior da célula ou da membrana plasmática para o meio extracelular. A P-gp é membro da superfamília de proteínas transportadoras *ATP-binding cassette* e é codificada pelo gene *ABCB1* (Ieiri *e cols.*, 2004). Este gene foi identificado pela primeira vez em células tumorais humanas, nas quais havia uma superexpressão de P-gp, e foi associado com a resistência a agentes quimioterápicos (Fromm *e cols.*, 2002). O gene *ABCB1* está localizado na região cromossômica 7q22.1 e codifica uma proteína de 170 Kda. A P-gp humana é composta de duas seqüências homólogas e simétricas, cada qual contendo seis domínios transmembrana e uma região de ligação ao ATP (figura 6) (Edwards, 2003). Esta proteína é encontrada nas barreiras hemato-encefálica, sangue-fluido cerebral, sangue-testículos e nas microvilosidades da placenta humana. A co-localização de P-gp e CYP3A no intestino delgado e fígado sugere que esse transportador tem papel importante na biodisponibilidade oral, distribuição e excreção de fármacos. A faixa de substratos transportados por P-gp é ampla e inclui uma variedade de agentes farmacológicos como agentes anti-câncer, anti-hipertensivos, corticóides, antivirais, neurolépticos, imunossupressores, entre outros (Marzoloni *e cols.*, 2004).

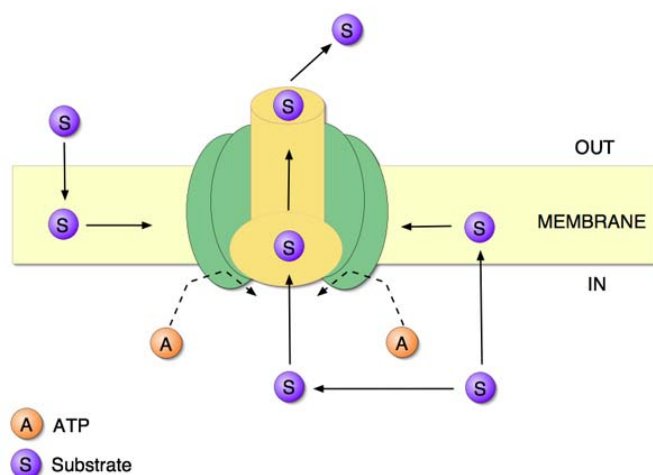


Figura 6: Representação esquemática do transporte mediado por P-gp. O transporte de drogas mediado por P-gp pode ocorrer em nível de membrana plasmática ou do compartimento intracelular e é dependente de ATP (Edwards, 2003).

O gene *ABCB1* é altamente polimórfico e até o momento já foram descritos mais de 100 sítios variantes (Kroetz *e cols.*, 2003). Entre os SNPs mais estudados estão o 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T. Os variantes sinônimos nas posições 1236 e 3435 estão em forte desequilíbrio de ligação com o variante não-sinônimo da posição 2677 (Ala893Ser). A frequência desses polimorfismos varia entre as populações (Kroetz *e cols.*, 2003) e em brasileiros é de 0,41, 0,34 e 0,33 (brancos, pardos e pretos, respectivamente) para 1236T; <0,01, 0,02 e <0,01 para 2677A; 0,39, 0,28 e 0,18 para 2677T e 0,41, 0,34 e 0,31 para 3435T (Estrela *e cols.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, os imunossupressores são substratos de P-gp e, por esse motivo, diversos trabalhos buscam avaliar o impacto dos polimorfismos em *ABCB1* na farmacocinética desses medicamentos em pacientes transplantados. A maioria dos trabalhos foi realizada em pacientes transplantados recebendo CSA ou FK, poucos foram realizados em pacientes recebendo SRL. Contudo, ainda não há consenso sobre a real influência desses polimorfismos. Observa-se, entretanto, que poucos artigos demonstraram a ocorrência de algum impacto na farmacocinética dos imunossupressores enquanto a maioria aponta para nenhuma influência dos SNPs 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T.

Um dos primeiros trabalhos avaliando o impacto dos polimorfismos em *ABCB1* foi realizado em 2002 no qual foi observado um pequeno efeito do alelo 3435T, associado a menor atividade de P-gp, na biodisponibilidade oral de FK (MacPhee *e cols.*, 2002). Dois anos depois, os polimorfismos nas posições 1236, 2677 e 3435 foram avaliados e não foi encontrada nenhuma associação com a C_0 e a dose requerida de CSA ou FK (Haufrond *e cols.*, 2004). Em trabalhos subsequentes, a avaliação dos haplótipos (2677 e 3435) também não demonstrou nenhum impacto nos parâmetros de C_0 , C_{max} e $AUC_{0\rightarrow 12}$ e corrigidos pela dose para FK (Mai *e cols.*, 2004; Tsuchiya *e cols.*, 2004). Em 2006, foi demonstrado, para CSA, que pacientes homozigotos 3435CC tinham C_0 /dose menor que pacientes portadores do alelo 3435T. Apesar de pequena, essa diferença encontrada é significativa ($17,7 \times 26,4$ ng/mL/mg/kg, $p = 0,014$) (Hu *e cols.*, 2006). Também em 2006, foi avaliado se a presença de polimorfismos em conjunto, ao invés de isolados, tinha maior impacto na farmacocinética de FK. Os autores genotiparam três polimorfismos (-129T>C, 2677C>T e 3435C>T) e mostraram que pacientes com menos de 3 SNPs apresentavam menor C_0 /dose que pacientes com 3 ou mais SNPs (Roy *e cols.*, 2006). Em seguida, muitos trabalhos demonstraram que não havia correlação entre os polimorfismos isolados ou em haplótipos ou diplótipos e a farmacocinética de CSA e FK (Fredericks *e cols.*, 2006; Choi *e cols.*, 2007; Li *e cols.*, 2007; Elens *e cols.*, 2007; Op den Buijsch *e cols.*, 2007;). No entanto, em 2008, dois trabalhos apresentaram associação entre o status de *ABCB1* e a farmacocinética de imunossupressores. No primeiro foi relatado que o *clearance* oral de FK era significativamente afetado pelo nível de mRNA de *ABCB1* em enterócitos e pacientes com maiores níveis apresentavam maior *clearance* (Fukudo *e cols.*, 2008). No segundo, foi reportado que portadores do alelo 3435T apresentavam concentração intracelular de CSA em linfócitos 1,7 vezes maior que pacientes portadores do alelo 3435C (Crettol *e cols.*, 2008). Com essa divergência de resultados, a real contribuição dos polimorfismos em *ABCB1* na farmacocinética dos imunossupressores ainda é uma questão em aberto.

1.7. Etnia e polimorfismos de *CYP3A5* e *ABCB1*

Estudos para determinação do impacto farmacogenético no tratamento com imunossupressores têm sido realizados em diferentes grupos populacionais,

particularmente chineses, norte americanos brancos e europeus. Essas populações são relativamente homogêneas quanto à ancestralidade quando comparadas com a população brasileira, altamente miscigenada e com proporções variáveis de ancestralidade genômica ameríndia, européia e africana (com uma pequena contribuição asiática mais recente), independentemente da autoclassificação “racial” ou étnica (Parra e cols., 2003; Salzano e Bortolini, 2002).

No caso brasileiro, as proporções relativas de ancestralidade de cada indivíduo variam. Logo, se o risco de uma doença ou a predisposição a um fenótipo farmacológico varia com as proporções de mistura (ou seja, se eles diferem nas populações ancestrais) isto levará à confusão de associações do fenótipo com o genótipo em qualquer locus no qual as freqüências alélicas variam entre as populações ancestrais. Uma importante consequência farmacogenética disto é a inadequação da extrapolação livre de dados colhidos em populações relativamente homogêneas, como as dos países em que se desenvolvem a maioria dos medicamentos de uso clínico, para populações altamente miscigenadas como é o caso do Brasil (Suarez-Kurtz, 2005a, b; Suarez-Kurtz e Pena, 2006, 2007). Dessa forma, faz-se necessário que as observações obtidas em outras populações sejam validadas em estudos na população brasileira.

Um estudo realizado na população demonstrou uma tendência significativa de redução na freqüência do polimorfismo *CYP3A5**3 de indivíduos brancos para intermediários para pretos (Suarez-Kurtz e cols., 2007). Essa observação é consistente com a maior prevalência do alelo *CYP3A5**3 em europeus que em africanos sub-saharianos (Kuehl e cols., 2001; Thompson e cols., 2004; Garsa e cols., 2005). No entanto, como consequência da miscigenação da população brasileira, a freqüência do alelo *CYP3A5**3 nos indivíduos autoclassificados como brancos ou pretos difere das freqüências descritas nas populações européias e sub-saharianas de duas maneiras: Primeiro, a freqüência alélica nos indivíduos autoclassificados como pretos (32%) está acima da faixa observada em africanos sub-saharianos (7-31%) (Lamba e cols., 2002; Thompson e cols., 2004) e dentro da faixa observada em afro-americanos (22-55%) (Garsa e cols., 2005; Roy e cols., 2005); Segundo, nos brasileiros autoclassificados como brancos, a freqüência do alelo *CYP3A5**3 (78%) está abaixo da faixa observada em europeus (91-97%) (Lamba e cols., 2002; Thompson e cols., 2004).

Nesse mesmo trabalho, utilizando marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), os autores dividiram a população brasileira em quartis de acordo com o componente de ancestralidade africana (ACA) de cada indivíduo. Com essa divisão,

confirmaram a tendência observada na redução da frequência do polimorfismo *CYP3A5**3 de indivíduos brancos para intermediários para pretos, demonstrando que as frequências alélicas e genotípicas reduzem, de forma significativa, progressivamente do menor (<0.25 ACA) para o maior (>0.75 ACA) quartil (figura 7) (Suarez-Kurtz e cols., 2007).

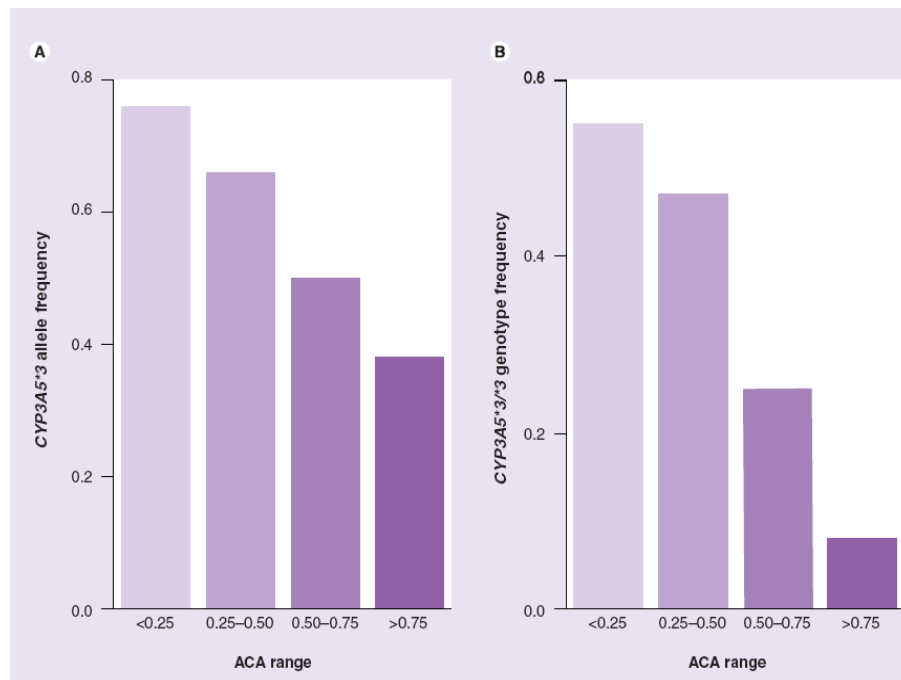


Figura 7: Distribuição do polimorfismo *CYP3A5**3 de acordo com o ACA na população brasileira: (A) frequência alélica e (B) frequência genotípica (Suarez-Kurtz e cols., 2007)

O impacto da miscigenação da população brasileira na distribuição dos polimorfismos em *ABCB1* também já foi avaliado. Foi demonstrado que a frequência do nucleotídeo variante T nos loci 1236, 2677 e 3435 reduz do menor para o maior quartil de ACA (figura 8). Aplicando um modelo de regressão linear, os autores confirmaram que a probabilidade de carrear o nucleotídeo variante T em cada locus reduz linearmente a medida que a proporção de ancestralidade africana aumenta. De acordo com essa observação, a análise dos haplótipos de *ABCB1* revelou uma relação inversa entre a proporção de ACA e a frequência do haplótipos T/nonG/T (Estrela e cols., 2008).

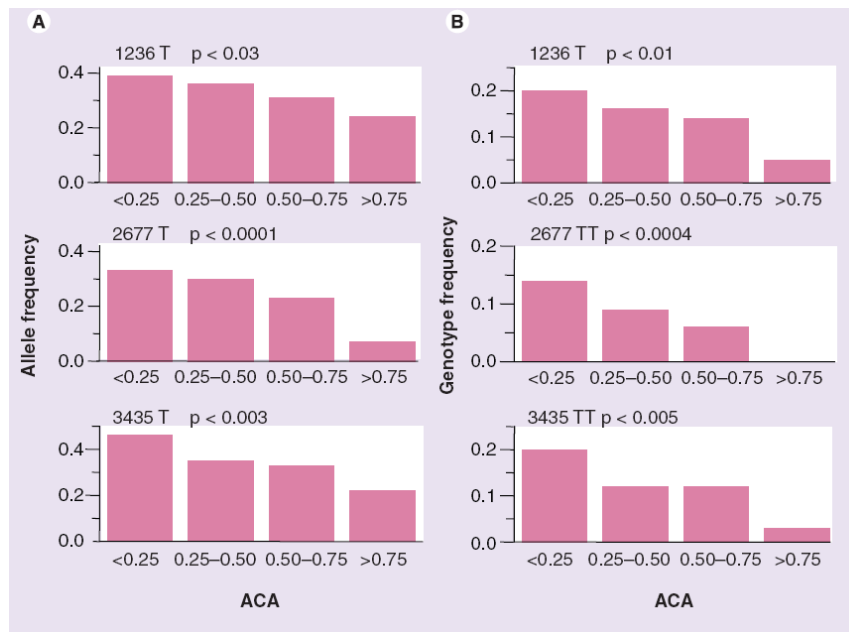


Figura 8: Distribuição dos polimorfismos em *ABCB1* de acordo com o ACA na população brasileira: (A) frequências alélicas e (B) frequências genóticas (Estrela e cols., 2008).

Em conjunto, esses resultados suportam a noção de que a miscigenação deve ser tratada como uma variável contínua e que a categorização étnica baseada na autoclassificação de cor de pele é insuficiente para controlar o efeito da estratificação em estudos de associação na população brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a prevalência de polimorfismos nos genes *CYP3A5* e *ABCB1* em pacientes brasileiros submetidos a transplante renal e avaliar a associação desses polimorfismos com as doses requeridas e os valores de C_0 /dose de CSA e FK até o terceiro mês após o transplante.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito dos polimorfismos 6986A>G e 14690G>A de *CYP3A5* e 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T de *ABCB1* nas doses requeridas e na C_0 /dose de CSA e FK, 1 semana, 1, 2 e 3 meses após o transplante;
2. Avaliar se o uso concomitante de SRL influencia na C_0 /dose de CSA e FK.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ética

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Hospital do Rim de São Paulo e sua aprovação está incluída no anexo I, juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Questionário demográfico usados no estudo. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas a fim de garantir sua confidencialidade.

3.2. População estudada

Participaram deste trabalho 301 pacientes submetidos a transplante renal no Hospital do Rim no período entre 01/07/2000 e 31/12/2006. Os indivíduos foram convidados a participar no momento em que compareceram ao ambulatório do hospital para suas consultas de rotina. Todos os pacientes receberam o TCLE e foram orientados a lê-lo cuidadosamente e a inquirir a respeito de qualquer dúvida quanto ao projeto. A inclusão do voluntário no protocolo de estudo só foi feita mediante assinatura do TCLE. Após inclusão, os indivíduos responderam ao questionário demográfico e foi coletada uma amostra de sangue para posterior extração de DNA genômico. Os dados clínicos foram obtidos diretamente do prontuário médico. Todas as informações pessoais foram mantidas em sigilo e utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no estudo. Os seguintes critérios de inclusão foram usados: receptores de primeiro transplante renal, idade igual ou maior de 18 anos e ambos os sexos. Os critérios de exclusão foram: recusa em assinar o TCLE, pacientes menores de 18 anos, pacientes cujo acompanhamento não era realizado no ambulatório do hospital, receptores de 2º e 3º transplante e pacientes em uso concomitante de medicação que interage com os inibidores de calcineurina como, por exemplo, bloqueadores de canais de cálcio (diltiazem, nicardipina e verapamil), antiepiléticos (fenitoína e carbamazepina),

antimicóticos (fluconazol e cetoconazol) e antibióticos macrolídeos (eritromicina e claritromicina).

Os pacientes incluídos faziam parte dos seguintes grupos de imunossupressão de base:

1. Pacientes tratados com tacrolimus, prednisona e azatioprina (GI, n=101);
2. Pacientes tratados com ciclosporina, prednisona e azatioprina (GII, n=97);
3. Pacientes tratados com tacrolimus, prednisona e sirolimus (GIII, n=50);
4. Pacientes tratados com ciclosporina, prednisona e sirolimus (GIV, n=53);

Após a primeira semana, 2 pacientes tratados com CSA/AZA e 1 paciente tratado com CSA/SRL mudaram, respectivamente, para FK/AZA e FK/SRL e, portanto, foram trocados de grupo nos tempos de análise de 1, 2 e 3 meses.

3.3. Coleta e envio das amostras

Todas as amostras foram coletadas no ambulatório do Hospital do Rim sob a supervisão de Michele Takaoka, coordenadora de estudos do Protocolo de Pesquisa Clínica. Aproximadamente 3 mL de sangue periférico foram coletados em tubo contendo o anticoagulante EDTA. O material era armazenado a 4°C por até 5 dias antes de ser enviado para o Laboratório de Farmacologia do INCa, onde foi feita a extração de DNA genômico e a genotipagem de *CYP3A5* e *ABCB1*.

3.4. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total usando o Kit de purificação de DNA genômico GFXTM (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), segundo as instruções do fabricante.

A quantificação do DNA genômico foi feita por espectrofotometria, na qual foi medida a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A concentração de DNA foi calculada pela seguinte fórmula: $[DNA] = ABS_{260} \times \text{diluição} \times 50$. A pureza das amostras foi avaliada pela razão entre as absorbâncias medidas em 260 e 280.

3.5. Genotipagem

3.5.1. CYP3A5

Para identificação dos alelos não-funcionais da enzima CYP3A5 foi utilizada a metodologia de PCR-RFLP, descrita por Liu e cols. (2002). Os oligonucleotídeos usados na etapa de PCR estão representados na tabela 3. A reação foi feita utilizando: 100 ng de DNA genômico, 0,28 µM de oligonucleotídeo para amplificação do alelo *3 e 0,15 µM de oligonucleotídeo para amplificação do alelo *6 (Alpha DNA, Montreal, Quebec), 0,2 mM de deoxinucleotídeos (Invitrogen, Invitrogen do Brasil, São Paulo), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5U/µL de Taq DNA polimerase e tampão de PCR (Fermentas Life Sciences, California, USA), em volume final de 25 µL. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 57°C ou 51°C por 30 segundos (anelamento alelo *3 e *6, respectivamente) e 72°C por 30 segundos (extensão), seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos. Após PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a digestão pela enzima DdeI (Promega, Madison, USA) que tem como sítio de restrição a sequência C/TNAG. Nesta reação foi usado 5U/µL de enzima para digestão de 10 µL de produto de PCR. Após incubação da reação a 37°C por 4 horas, as amostras foram corridas em gel de agarose 3% para visualização do perfil de digestão. As figuras 9 e 10 representam o perfil de digestão para detecção dos alelos *3 e *6, respectivamente. A classificação genotípica foi baseada no fato de os alelos *3 e *6 ocorrerem em *trans* (Mirghani e cols., 2006). Pacientes com os genótipos *1/*3 ou *1/*6 foram analisados em conjunto, assim como os pacientes com genótipos *3/*3 ou *3/*6.

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para identificação dos alelos *3 e *6 de CYP3A5

Alelo	Polimorfismo	Produto (pb)	Primer 5' → 3'
*3	6986A>G	155	F: CTCTTTAAAGAGCTCTTTTGTCTCTCA
			R: GTTGTACGACACACAGCAACC
*6	14690G>A	237	F: GTGGGTTTCTTGCTGCATGT
			R: GCCCACATACTTATTGAGAG

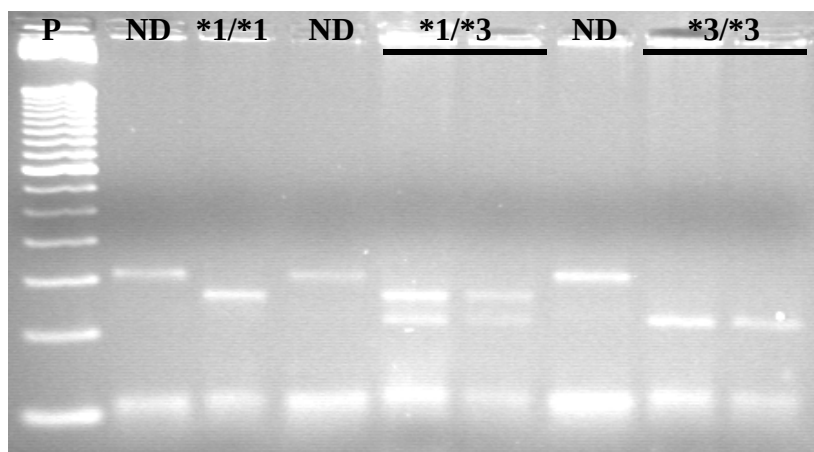


Figura 9: Perfil de digestão para detecção do alelo *CYP3A5**3. Gel de agarose corado com brometo de etídeo contendo as amostras de DNA digeridas com a enzima DdeI. P: padrão de peso molecular (50 pb) e ND: produto de PCR não digerido. *1/*1: perfil de digestão de um indivíduo homozigoto selvagem, *1/*3: perfil de digestão de um indivíduo heterozigoto e *3/*3: perfil de digestão de um indivíduo homozigoto mutante.

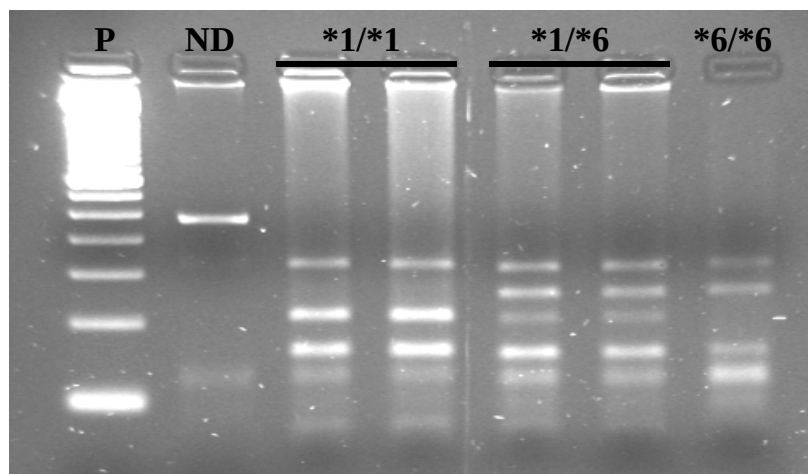


Figura 10: Perfil de digestão para detecção do alelo *CYP3A5**6. Gel de agarose corado com brometo de etídeo contendo as amostras de DNA digeridas com a enzima DdeI. P: padrão de peso molecular (50 pb) e ND: produto de PCR não digerido. *1/*1: perfil de digestão de um indivíduo homozigoto selvagem, *1/*6: perfil de digestão de um indivíduo heterozigoto e *6/*6: perfil de digestão de um indivíduo homozigoto mutante.

3.5.2. *ABCB1*

A detecção dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T foi feita utilizando a metodologia de seqüenciamento de uma única base (SNapShot Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA). Primeiramente as regiões genômicas contendo os polimorfismos de interesse foram amplificadas por PCR multiplex (exons 12, 21 e 26, respectivamente) e os produtos analisados em gel de agarose 1%. Os oligonucleotídeos usados na reação de PCR multiplex foram descritos por Wadelius e cols. (2004) e estão representados na tabela 4. A reação de amplificação foi feita utilizando: 100 ng de DNA genômico, 0,05 µM de cada oligonucleotídeos (Alpha DNA, Montreal, Quebec), 0,2 mM de deoxinucleotídeos (Invitrogen, Invitrogen do Brasil, São Paulo), 4,0 mM de MgCl₂, 5U/µL de Taq DNA polimerase e tampão de PCR (Gold, Applied Biosystems, Foster City, USA)), em volume final de 50 µL. As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento dos *primers*) e 72°C por 30 segundos (extensão), seguidos de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 4: Seqüência dos oligonucleotídeos usados na PCR multiplex de *ABCB1*

Exon	Polimorfismo	Produto (pb)	Oligonucleotídeo 5' → 3'
12	1236C>T	429	F: TATTCGAAGAGTGGGCACAA
			R: CTGATCACCGCAGGGTCTA
21	2677G>T/A	293	F: AGCAAATCTTGGGACAGGAA
			R: AAGATTGCTTTGAGGAATGGTT
26	3435C>T	171	F: GAGCCCATCCTGTTTGACTG
			R: CATGCTCCCAGGCTGTTTAT

Após a etapa de amplificação por PCR multiplex, os SNPs foram genotipados usando um oligonucleotídeo interno, cuja extremidade 3' se localiza adjacente à base polimórfica. A extensão de uma única base foi feita por um ciclo de reação de seqüenciamento, com os três oligonucleotídeos e dideoxinucleotídeos fluorescentes. Devido à ausência de deoxinucleotídeos, somente uma única base é adicionada na

extremidade 3' dos oligonucleotídeos. Os produtos dessa reação foram detectados no aparelho de eletroforese capilar ABI3100 (Applied Biosystems) e os resultados analisados no programa GenScan (Applied Biosystems) (Figura 11). Para evitar sobreposição na corrida dos produtos analisados foi adicionada uma cauda (GACT)_n de diferentes tamanhos aos oligonucleotídeos utilizados (tabela 5).

Tabela 5: Seqüência dos oligonucleotídeos internos usados no SNaPshot de *ABCB1*

Exon	Polimorfismo	Produto (pb)	Oligonucleotídeo 5' → 3'
12	1236C>T	36	GTCAGTCAGTCAGTCGTCCTGGTAGATCTTGAAGGG
21	2677G>T/A	40	GACTGACTGACTGACTGACTAGTTTGACTCACCTTCCCAG
26	3435C>T	52	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGCCTCCTTGTGCCCCAC

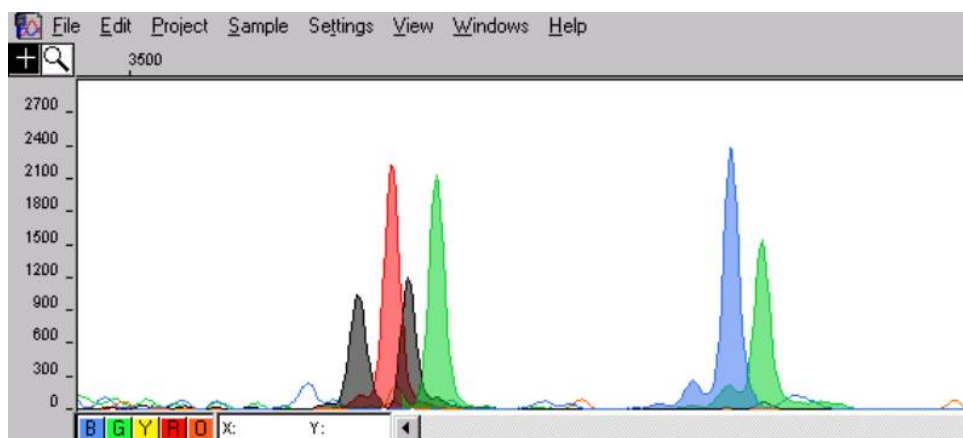


Figura 11: Perfil de eletroforese da genotipagem por SNaPshot dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T. A cor de cada pico representa o dideoxinucleotídeo incorporado (C-preto, T-vermelho, A-verde, G-azul). Nesse exemplo temos um indivíduo heterozigoto para as três posições estudadas.

3.6 Desequilíbrio de ligação e análise de haplótipos

O desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos de *ABCB1* foi investigado através dos programas VG2 (<http://pga.gs.washington.edu/VG2.html>) e GENEPOP (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op2.html). O desequilíbrio de ligação entre dois loci foi avaliado pelos valores de r^2 . Os haplótipos de *ABCB1* foram inferidos estatisticamente utilizando o programa haplo.stats, versão 1.3 (http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm). Esse programa atribui uma probabilidade para o diplótipo de cada indivíduo, baseado em frequências haplotípicas estimadas.

3.7. Dosagem dos medicamentos no sangue total

A partir dos dados de prontuário, as doses e as respectivas concentrações plasmáticas de ciclosporina, tacrolimus e sirolimus foram obtidas de todos os pacientes incluídos no estudo. Os períodos analisados se referem à primeira semana e aos primeiro, segundo e terceiro meses após a data do transplante. Os dados foram coletados com uma janela de mais ou menos 3 dias para a primeira semana e mais ou menos 5 dias para os demais períodos de interesse. Os pacientes que não apresentaram dado de concentração do medicamento em um determinado tempo foram excluídos da análise no referido tempo, mas foram incluídos nos demais tempos. Por esse motivo, o número de pacientes analisados varia entre os tempos de análise.

As concentrações plasmáticas dos medicamentos imunossupressores são rotineiramente determinadas no Hospital do Rim por kit comercial para a ciclosporina (fluorescência polarizada utilizando anticorpo monoclonal - TDX), tacrolimus (ensaio de adsorção de micropartículas - IMX) e sirolimus (HPLC).

3.8. Análises estatísticas

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos investigados foram determinadas por contagem direta dos alelos. O teste de qui-quadrado foi usado para comparar as frequências observadas e esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg e para a comparação com frequências descritas na população brasileira sadia.

A associação de variáveis genéticas (genótipos/haplótipos de *CYP3A5* e *ABCB1*) com a dose requerida de FK ou CSA foi investigada pelo teste de ANOVA. Na investigação de associações par a par, foi utilizada a correção de Bonferroni.

A associação de variáveis demográficas (sexo e superfície corporal), clínicas (creatinina, tipo de doador e uso concomitante de AZA, SRL ou PRED) e genéticas (genótipos/haplótipos de *CYP3A5* e *ABCB1*) com a C_0 /dose de FK ou CSA foi investigada utilizando um modelo de regressão múltipla. Primeiramente, a seleção de variáveis candidatas para análise multivariada foi feita examinando o efeito independente de cada variável na C_0 /dose de FK ou CSA. As variáveis discretas entraram na análise como variáveis *dummy* a fim de quantificar como as categorias individuais afetam a C_0 /dose de FK ou CSA. As variáveis associadas ($P < 0,15$) com o parâmetro avaliado nessa análise inicial foram selecionadas para análise multivariada. Na análise multivariada, valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos para manter a variável no modelo.

4. RESULTADOS

4.1. População estudada

Nesse estudo retrospectivo foram recrutados 301 pacientes submetidos a transplante renal no Hospital do Rim e Hipertensão de São Paulo e suas características demográficas e clínicas estão relacionadas na tabela 6. No momento da inclusão, todos os pacientes estavam em fase estável de tratamento. Dos pacientes incluídos apenas 15 apresentaram rejeição aguda nos três primeiros meses após transplante. Com base no esquema imunossupressor, os pacientes foram divididos em dois grupos: os que eram tratados com CSA (em combinação com AZA ou SRL) e os que eram tratados com FK (em combinação com AZA ou SRL).

Tabela 6: Características demográficas e clínicas dos pacientes no momento do transplante

	N
Sexo (masculino:feminino)	180:121
Idade (anos)	39 (15-69)*
Superfície corporal (m ²)	1,7 (1,0-2,3)*
Esquema imunossupressor	
CSA/AZA	97
CSA/SRL	53
FK/AZA	101
FK/SRL	50
Grupo**	
Branco	117
Pardo	139
Preto	41
Amarelo	4
Doador (vivo:cadáver)	264:37
Indicação para transplante	
Hipertensão arterial	49
Glomerulonefrite crônica	38
Doença renal policística	13
Outras	58
Indeterminada	143

*Mediana (faixa)

**Baseado na autodeclaração de cor de pele, de acordo com o Censo Brasileiro

A dose diária de CSA variou, entre os pacientes, 5 vezes na 1ª semana, 7,5 vezes no 1º mês, 6 vezes no 2º mês e 5 vezes no 3º mês (tabela 7). Para FK, a variação de dose foi de 5,7 vezes na 1ª semana, 13,3 vezes no 1º mês e 16 vezes nos 2º e 3º meses (tabela 7).

Tabela 7: Doses diárias de ciclosporina e tacrolimus nos três primeiros meses após transplante.

	Média (mg)	D.P.	Mediana (mg)	Mínimo (mg)	Máximo (mg)
CSA					
1ª semana	507,5	180,9	500,0	200,0	1.000,0
1º mês	312,1	121,0	300,0	100,0	750,0
2º mês	256,6	100,9	250,0	100,0	600,0
3º mês	226,7	91,0	200,0	100,0	500,0
FK					
1ª semana	20,9	7,3	20,0	7,0	40,0
1º mês	14,2	7,3	14,0	3,0	40,0
2º mês	11,8	6,4	10,0	2,0	32,0
3º mês	10,5	6,1	9,0	2,0	32,0

4.2. Frequências dos polimorfismos de *CYP3A5* e *ABCB1* em pacientes transplantados renais

As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos em *CYP3A5* e *ABCB1* estudados estão mostradas, respectivamente, nas tabelas 8 e 9. As frequências observadas não são significativamente diferentes das preditas pela equação de Hardy-Weinberg e não diferem das frequências previamente descritas para brasileiros sadios (*ABCB1* - Estrela *e cols.*, 2008; *CYP3A5**3 - Suarez-Kurtz *e cols.*, 2007; *CYP3A5**6 - dado não publicado). No caso de *CYP3A5*, para comparar as frequências entre pacientes transplantados renais e voluntários sadios foi feita uma média ponderada visto que o

grupo de indivíduos sadios era composto de 1/3 de brancos, 1/3 de pardos e 1/3 de pretos. As frequências alélicas e genotípicas não diferem entre pacientes tratados com CSA e pacientes tratados com FK, mostrando não haver erro de amostragem entre os grupos.

A análise no programa VG2 mostrou que os SNPs nas posições 1236, 2677 e 3435 estão em desequilíbrio de ligação na população estudada (Tabela 10). A partir dos polimorfismos nessas posições foram determinados os haplótipos de *ABCB1* e suas frequências estão mostradas na tabela 11. Para análise de haplótipos, os alelos 2677A e 2677T foram agrupados como nonG e as frequências haplotípicas observadas em pacientes transplantados renais não diferem das descritas para brasileiros sadios (Estrela *et cols.*, 2008). O haplótipo foi inferido com uma probabilidade > 0,94 em 276 pacientes, > 0,88 em 11 pacientes e > 0,77 em 14 pacientes. Para a população estudada, a ocorrência do haplótipo selvagem C/G/C é de 52,3% e a do haplótipo mutante mais freqüente, T/nonG/T, é de 26,6%. Este haplótipo mutante também é o mais freqüente para voluntários sadios. Quatro haplótipos (C/G/C, T/nonG/T, C/G/T e T/G/C) são responsáveis por 91% da variabilidade genética encontrada na população estudada.

Tabela 8: Frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos em *CYP3A5* em pacientes transplantados renais

Grupos (n)	Frequência genotípica % (95% IC)				
	*1/*1	*1/*3	*1/*6	*3/*3	*3/*6
Pop. estudada (301)	5,0 (2,8 – 8,1)	37,5 (32,1 – 43,3)	1,3 (0,4 – 3,4)	51,8 (46,0 – 57,6)	4,3 (2,3 – 7,3)
CSA (150)	6,7 (3,2 – 11,9)	36,7 (29,0 – 44,9)	1,3 (0,2 – 4,7)	50,7 (42,4 – 58,9)	4,7 (1,9 – 9,4)
FK (151)	3,3 (1,1 – 7,6)	38,4 (30,6 – 46,7)	1,3 (0,2 – 4,7)	53,0 (44,7 – 61,1)	4,0 (1,5 – 8,4)
Grupos (n)	Frequência alélica % (95% IC)				
	*1	*3	*6		
Pop. sadia (257)*	31,0	63,0	6,0		
Pop. estudada (301)	24,4 (21,0 – 28,1)	72,8 (69,0 – 76,3)	2,8 (1,7 – 4,5)		
CSA (150)	25,7 (20,8 – 31,0)	71,3 (65,9 – 76,4)	3,0 (1,4 – 5,6)		
FK (151)	23,2 (18,5 – 28,4)	74,2 (68,8 – 79,0)	2,6 (1,2 – 5,2)		

* *CYP3A5**3 - Suarez-Kurtz *et cols.*, 2007; *CYP3A5**6 - dado não publicado

Tabela 9: Frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos em *ABCB1* em pacientes transplantados renais

Grupos (n)	Frequência genotípica % (95% IC)				
1236C>T	CC	CT	TT		
Pop. estudada (301)	41,5 (35,9 – 47,3)	45,5 (39,8 – 51,3)	13,0 (9,4 – 17,3)		
CSA (150)	38,7 (30,8 – 47,0)	46,0 (37,8 – 54,3)	15,3 (10,0 – 22,1)		
FK (151)	44,4 (36,3 – 52,7)	45,0 (36,9 – 53,3)	10,6 (6,2 – 16,6)		
2677G>T/A	GG	GT	GA	TT	TA
Pop. estudada (301)	47,2 (41,4 – 53,0)	36,5 (31,1 – 42,3)	3,7 (1,8 – 6,4)	11,3 (8,0 – 15,4)	1,3 (0,4 – 3,4)
CSA (150)	48,0 (39,8 – 56,3)	32,0 (24,6 – 40,1)	5,3 (2,3 – 10,2)	12,7 (7,8 – 19,1)	2,0 (0,4 – 5,7)
FK (151)	46,4 (38,2 – 54,6)	41,1 (33,1 – 49,3)	2,0 (0,4 – 5,7)	9,9 (5,7 – 15,9)	0,7 (0,02 – 3,6)
3435C>T	CC	CT	TT		
Pop. estudada (301)	35,9 (30,5 – 41,6)	48,5 (42,7 – 54,3)	15,6 (11,7 – 20,2)		
CSA (150)	38,7 (30,8 – 47,0)	43,3 (35,3 – 51,7)	18,0 (12,2 – 25,1)		
FK (151)	33,1 (25,7 – 41,2)	53,6 (45,4 – 61,8)	13,2 (8,3 – 19,7)		
Frequência alélica % (95% IC)					
1236C>T	C	T			
Pop. sadia (320)*	64,0	36,0			
Pop. estudada (301)	64,3 (60,3 – 68,1)	35,7 (31,9 – 39,7)			
CSA (150)	61,7 (55,9 – 67,2)	38,3 (32,8 – 44,1)			
FK (151)	66,9 (61,3 – 72,2)	33,1 (27,8 – 38,7)			
2677G>T/A	G	T	A		
Pop. sadia (320)*	70,0	38,0	1,4		
Pop. estudada (301)	67,3 (63,4 – 71,0)	30,2 (26,6 – 34,1)	2,5 (1,4 – 4,1)		
CSA (150)	66,7 (61,0 – 72,0)	29,7 (24,6 – 35,2)	3,7 (1,8 – 6,5)		
FK (151)	67,9 (62,3 – 73,1)	30,8 (25,6 – 36,3)	1,3 (0,4 – 3,4)		
3435C>T	C	T			
Pop. sadia (320)*	63,0	37,0			
Pop. estudada (301)	60,1 (56,1 – 64,1)	39,9 (35,9 – 43,9)			
CSA (150)	60,3 (54,6 – 65,9)	39,7 (34,1 – 45,4)			
FK (151)	59,9 (54,2 – 65,5)	40,1 (34,5 – 45,8)			

* Estrela e cols., 2008

Tabela 10: Desequilíbrio de ligação dos polimorfismos nas posições 1236, 2677 e 3435 de *ABCB1* em pacientes transplantados renais

Comparação par a par*	r^2
1236 vs 2677	0.57
1236 vs 3435	0.38
2677 vs 3435	0.44

* $P < 0,0001$ para todas as comparações. Teste exato de Fisher realizado no programa GENEPOP

Tabela 11: Frequência haplotípica de *ABCB1* em pacientes transplantados renais

Haplótipo	População estudada (%)	População sadia (%)*
C/G/C	52,3	53,5
C/G/T	8,1	8,3
C/nonG/C	1,7	1,1
C/nonG/T	2,2	2,2
T/G/C	3,8	7,8
T/G/T	3,0	2,9
T/nonG/C	2,3	1,7
T/nonG/T	26,6	22,1

* Estrela e cols., 2008

4.3. Efeito dos genótipos/haplótipos de *CYP3A5* e *ABCB1* na dose requerida e na C_0 /dose de ciclosporina

A análise de univariada revelou que nenhum polimorfismo em *CYP3A5* e *ABCB1* ou haplótipo de *ABCB1* analisados apresentaram efeito significativo na dose requerida de CSA.

A tabela 12 mostra os valores de C_0 /dose de CSA em função dos genótipos de *CYP3A5*, de cada um dos loci examinados de *ABCB1* e do número de cópias do haplótipo selvagem (haplótipo WT) de *ABCB1*. A contribuição de variáveis

demográficas, clínicas e genéticas na variabilidade interindividual da C_0 /dose de CSA foi avaliada, primeiramente, através de uma análise univariada (ver Métodos) e gerou os seguintes resultados:

1. Na 1ª semana e no 1º mês após o transplante, nenhuma variável genética teve efeito significativo na C_0 /dose de CSA e, portanto, não foi feita análise de regressão múltipla para esses tempos;

2. Não houve influência significativa dos polimorfismos de *CYP3A5* na C_0 /dose de CSA em nenhum período de análise;

3. Os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T apresentaram efeito significativo na C_0 /dose de CSA para os 2º e 3º meses de acompanhamento. Nesse caso, os indivíduos homozigotos mutantes apresentaram os maiores valores de C_0 /dose, para cada um dos polimorfismos. Esses resultados são mostrados de forma gráfica na figura 12;

4. O número de cópias do haplótipo selvagem também apresentou associação significativa com a C_0 /dose de CSA para os 2º e 3º meses de acompanhamento. Foi observado que a C_0 /dose de CSA reduz de acordo com o aumento no número de cópias do haplótipo selvagem. Esses resultados são mostrados de forma gráfica na figura 13;

5. Nos 2º e 3º meses após o transplante, as variáveis superfície corporal e dose de PRED (só para o 3º mês) também apresentaram associação positiva com a C_0 /dose de CSA.

6. O uso concomitante de SRL não apresentou influência significativa na determinação da C_0 /dose de CSA em nenhum tempo estudado;

A tabela 13 mostra a relação de variáveis que na análise univariada se associaram com a C_0 /dose de CSA ($P < 0,15$) e foram selecionadas para posterior análise de regressão multivariada. No 2º mês, a superfície corporal foi a única variável que se manteve significativa ($P = 0,002$) enquanto no 3º mês, a superfície corporal, o número de cópias do haplótipo selvagem de *ABCB1* e a dose de PRED se mostraram importantes para determinação da C_0 /dose. Esses resultados estão mostrados na tabela 14 e o modelo final gerado é capaz de explicar 17% da variação de C_0 /dose de CSA observada na população estudada.

Tabela 12: Influência dos genótipos/haplótipos de *CYP3A5* e *ABCB1* na C_0 /dose ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{mg}$) de ciclosporina em pacientes transplantados renais

Genótipo		1ª semana (n=150)	n	1º mês (n=141)	n	2º mês (n=129)	n	3º mês (n=118)	n
CYP3A5	wt/wt	$0,48 \pm 0,19$	10	$0,71 \pm 0,36$	10	$0,69 \pm 0,43$	9	$0,70 \pm 0,21$	10
	wt/mut	$0,42 \pm 0,19$	57	$0,64 \pm 0,35$	55	$0,57 \pm 0,19$	50	$0,62 \pm 0,24$	45
	mut/mut	$0,46 \pm 0,24$	83	$0,69 \pm 0,33$	76	$0,67 \pm 0,27$	70	$0,65 \pm 0,33$	63
1236C>T	wt/wt	$0,45 \pm 0,21$	58	$0,68 \pm 0,29$	56	$0,60 \pm 0,22$	52	$0,60 \pm 0,25$	47
	wt/mut	$0,44 \pm 0,23$	69	$0,63 \pm 0,30$	63	$0,61 \pm 0,22$	55	$0,60 \pm 0,27$	51
	mut/mut	$0,48 \pm 0,20$	23	$0,76 \pm 0,50$	22	$0,78 \pm 0,38$	22	$0,86 \pm 0,32$	20
2677G>T/A	wt/wt	$0,45 \pm 0,21$	72	$0,69 \pm 0,31$	69	$0,63 \pm 0,25$	66	$0,63 \pm 0,26$	59
	wt/mut	$0,41 \pm 0,23$	56	$0,64 \pm 0,41$	51	$0,57 \pm 0,22$	43	$0,57 \pm 0,24$	42
	mut/mut	$0,51 \pm 0,22$	22	$0,66 \pm 0,23$	21	$0,77 \pm 0,31$	20	$0,87 \pm 0,36$	17
3435C>T	wt/wt	$0,47 \pm 0,22$	58	$0,68 \pm 0,32$	58	$0,59 \pm 0,27$	53	$0,58 \pm 0,25$	47
	wt/mut	$0,42 \pm 0,21$	65	$0,68 \pm 0,39$	58	$0,63 \pm 0,20$	55	$0,63 \pm 0,26$	49
	mut/mut	$0,46 \pm 0,23$	27	$0,61 \pm 0,22$	25	$0,75 \pm 0,32$	21	$0,81 \pm 0,35$	22
Haplótipo WT	0	$0,47 \pm 0,21$	36	$0,71 \pm 0,42$	34	$0,77 \pm 0,36$	29	$0,81 \pm 0,35$	29
	1	$0,41 \pm 0,21$	73	$0,62 \pm 0,30$	66	$0,59 \pm 0,21$	62	$0,59 \pm 0,24$	56
	2	$0,49 \pm 0,23$	41	$0,71 \pm 0,32$	41	$0,61 \pm 0,22$	38	$0,58 \pm 0,25$	33

Valores expressos em média $\pm$ D.P.

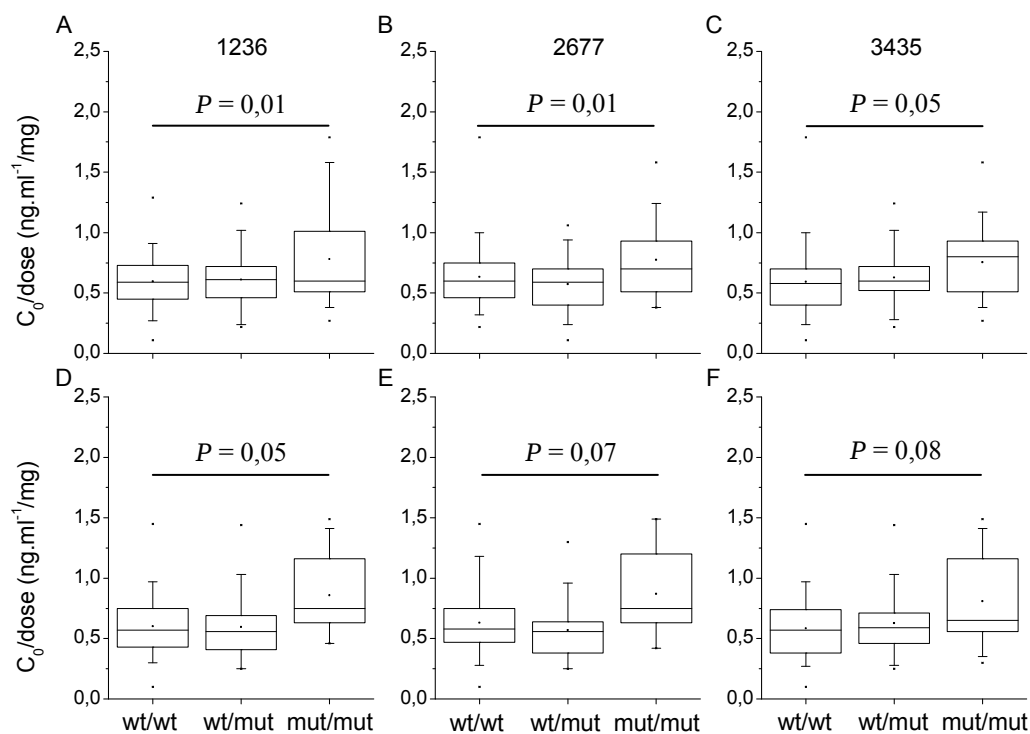


Figura 12: Distribuição da C_0/dose de ciclosporina em relação ao genótipo de *ABCB1* no 2º (A-C) e 3º (D-F) mês de acompanhamento. A e D: 1236C>T; B e E: 2677G>T/A; C e F: 3435C>T.

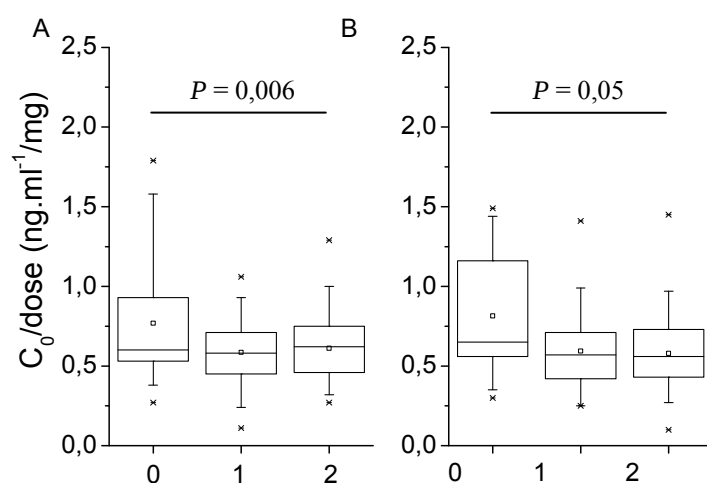


Figura 13: Distribuição da C_0/dose de ciclosporina em relação ao número de cópias do haplótipo selvagem de *ABCB1* no 2º (A) e 3º (B) mês de acompanhamento.

Tabela 13: Análise univariada dos determinantes de C_0 /dose de ciclosporina

Variáveis	2º mês <i>P</i>	3º mês <i>P</i>
Superfície corporal	0,0008	0,0004
Dose PRED	-	0,03
1236C>T	0,01	0,05
2677G>T/A	0,01	0,07
3435C>T	0,05	0,08
HapWT	0,006	0,05

Tabela 14: Análise multivariada dos determinantes de C_0 /dose de ciclosporina no 3º mês após o transplante

Variáveis	Coefficiente de regressão	<i>P</i>	<i>P</i> do modelo	<i>R</i> ² do modelo
Superfície corporal	-0,4730	0,05	9,5·10 ⁻⁵	0,1683
Dose PRED	-0,0134	0,01		
HapWT (1 cópia)	-0,1885	0,03		
HapWT (2 cópias)	-0,2634	0,006		

4.4. Efeito dos genótipos/haplótipos de *CYP3A5* e *ABCB1* na dose requerida e na C_0 /dose de tacrolimus

A análise de ANOVA revelou que o genótipo de *CYP3A5* tem efeito significativo na dose requerida de FK em todos os tempos de análise (tabela 15). Esse efeito está mostrado de forma gráfica na figura 14. Foi observado que, para *CYP3A5*, os indivíduos homozigotos selvagens receberam em média doses 1,5 (1ª semana); 2,4 (1º mês); 2,5 (2º mês) e 3,0 (3º mês) vezes maiores que os indivíduos homozigotos mutantes. Além disso, também foi observada diferença significativa na dose requerida entre indivíduos homozigotos selvagens e heterozigotos ($P < 0,05$), a partir do 1º mês após transplante. O efeito de polimorfismos em *ABCB1* na dose requerida de FK também foi avaliado. Analisados separadamente, o polimorfismo 2677G>T/A foi o

único que apresentou efeito significativo na dose de FK. Pacientes homozigotos selvagens apresentaram maior dose quando comparados com pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes, no 3º mês de acompanhamento ($12,0 \pm 6,7$, $9,4 \pm 5,4$ e $8,4 \pm 4,7$, respectivamente) ($P < 0,05$). Quando analisados na forma de haplótipos, foi observada uma associação significativa com a dose requerida de FK, para o 3º mês de acompanhamento. Os resultados mostraram que indivíduos que não possuem cópia do haplótipo selvagem necessitaram de doses significativamente menores que indivíduos com duas cópias do haplótipo selvagem ($8,5 \pm 5$ vs $12,4 \pm 7$, $P < 0,05$).

Tabela 15: Influência do genótipo de *CYP3A5* na dose requerida (mg) de tacrolimus em pacientes transplantados renais

	<i>CYP3A5</i>		
	wt/wt	wt/mut	mut/mut
1ª semana (151)	$30,0 \pm 6,6$	$22,8 \pm 7,4$	$19,0 \pm 6,6^{b,c}$
1º mês (154)	$26,0 \pm 7,5$	$17,5 \pm 7,5^a$	$11,2 \pm 5,2^{b,c}$
2º mês (152)	$22,6 \pm 6,7$	$15,1 \pm 6,3^a$	$9,0 \pm 4,4^{b,c}$
3º mês (141)	$23,0 \pm 7,8$	$13,5 \pm 5,8^a$	$7,6 \pm 3,9^{b,c}$

Valores expressos em média $\pm$ D.P.

^a wt/wt X wt/mut; ^b wt/wt X mut/mut; ^c wt/mut X mut/mut ($P < 0,05$)

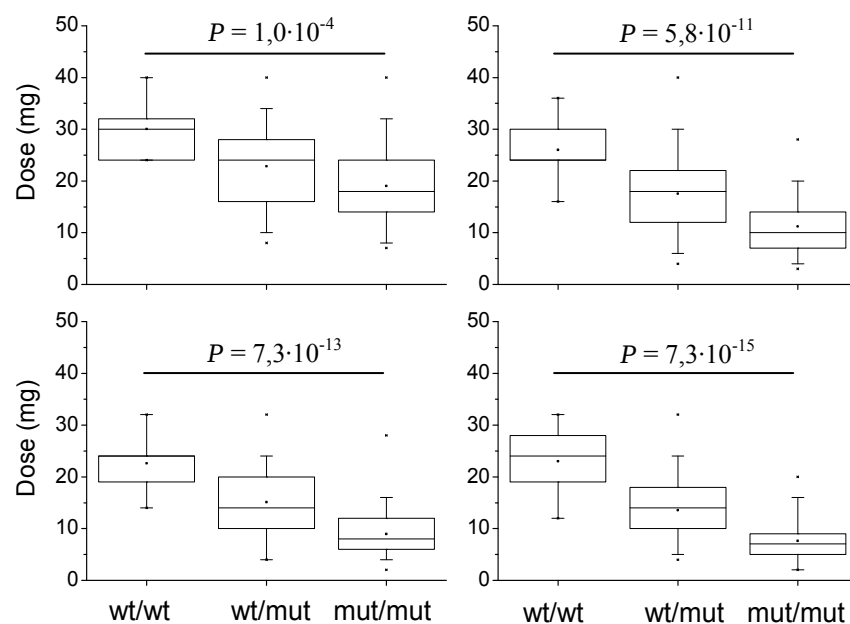


Figura 14: Distribuição da dose requerida de tacrolimus em relação ao genótipo de *CYP3A5* nos diferentes tempos de acompanhamento. A-D: 1ª semana-3º mês, respectivamente.

A tabela 16 mostra os valores de C_0 /dose de FK em função dos genótipos de *CYP3A5*, de cada um dos loci examinados de *ABCB1* e do número de cópias do haplótipo selvagem (haplótipo WT) de *ABCB1*. Assim como feito para os dados de CSA, foi realizada uma análise univariada para avaliar o impacto independente de variáveis demográficas, clínicas e genéticas na variabilidade interindividual da C_0 /dose de FK. Essa análise gerou os seguintes resultados:

1. O genótipo de *CYP3A5* apresentou um efeito significativo na C_0 /dose de FK em todos os tempos analisados. Foi observado que indivíduos que expressam *CYP3A5* apresentaram valores de C_0 /dose de FK significativamente menores que indivíduos sem expressão de *CYP3A5*. Esse resultado está mostrado de forma gráfica na figura 15;

2. Os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T de *ABCB1* apresentaram efeito significativo na C_0 /dose de FK apenas no 3º mês de acompanhamento. Para os três polimorfismos, foi observado que a C_0 /dose é maior nos indivíduos homozigotos mutantes ($P = 0,03$, $0,006$ e $0,05$, respectivamente para cada polimorfismo) (figura16);

3. Em relação aos haplótipos de *ABCB1*, foi observada uma associação significativa entre o número de cópias do haplótipo selvagem e a C_0 /dose de FK apenas no 3º mês após o transplante. A figura 16 mostra que a C_0 /dose de FK reduz com o aumento no número de cópias do haplótipo selvagem;

4. Nenhuma variável demográfica ou clínica foi associada com a C_0 /dose de FK nos tempos analisados;

5. O uso concomitante de SRL também não apresentou influência significativa na determinação da C_0 /dose de FK;

Da 1ª semana ao 2º mês após o transplante, o genótipo de *CYP3A5* se mostrou o único determinante significativo na C_0 /dose de FK. Portanto, a análise de regressão múltipla só foi feita para 3º mês após o transplante e, de acordo com o que foi descrito anteriormente, as variáveis selecionadas foram o genótipo de *CYP3A5* e os polimorfismos e número de cópias do haplótipo selvagem de *ABCB1*. A análise multivariada apresentou o genótipo de *CYP3A5* como única variável com efeito significativo na C_0 /dose de FK ($P = 2,2 \cdot 10^{-7}$) e responsável por 21% da variação de C_0 /dose de FK observada na população estudada.

Tabela 16: Influência dos genótipos/haplótipos de *CYP3A5* e *ABCB1* na C_0 /dose ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}/\text{mg}$) de tacrolimus em pacientes transplantados renais

Genótipo		1ª semana (n=151)	n	1º mês (n=154)	n	2º mês (n=152)	n	3º mês (n=141)	n
CYP3A5	wt/wt	$0,39 \pm 0,17$	5	$0,33 \pm 0,06$	5	$0,44 \pm 0,32$	5	$0,42 \pm 0,17$	5
	wt/mut	$0,61 \pm 0,31$	60	$0,75 \pm 0,41$	61	$0,80 \pm 0,56$	59	$0,81 \pm 0,46$	56
	mut/mut	$1,04 \pm 0,59$	86	$1,34 \pm 0,77$	88	$1,42 \pm 0,74$	88	$1,54 \pm 0,89$	80
1236C>T	wt/wt	$0,84 \pm 0,59$	67	$1,10 \pm 0,83$	68	$1,06 \pm 0,65$	66	$1,09 \pm 0,57$	64
	wt/mut	$0,83 \pm 0,48$	68	$1,06 \pm 0,62$	70	$1,21 \pm 0,74$	70	$1,21 \pm 0,66$	61
	mut/mut	$0,95 \pm 0,58$	16	$1,02 \pm 0,58$	16	$0,96 \pm 0,43$	15	$1,31 \pm 0,67$	16
2677G>T/A	wt/wt	$0,82 \pm 0,58$	70	$1,08 \pm 0,82$	71	$1,05 \pm 0,70$	69	$1,07 \pm 0,55$	67
	wt/mut	$0,84 \pm 0,48$	65	$1,06 \pm 0,62$	67	$1,18 \pm 0,67$	67	$1,21 \pm 0,67$	58
	mut/mut	$0,96 \pm 0,57$	16	$1,13 \pm 0,60$	16	$1,18 \pm 0,66$	16	$1,41 \pm 0,65$	16
3435C>T	wt/wt	$0,87 \pm 0,63$	50	$1,09 \pm 0,73$	50	$1,09 \pm 0,70$	47	$1,13 \pm 0,64$	47
	wt/mut	$0,81 \pm 0,47$	81	$1,05 \pm 0,72$	84	$1,13 \pm 0,70$	85	$1,15 \pm 0,61$	74
	mut/mut	$0,97 \pm 0,55$	20	$1,14 \pm 0,64$	20	$1,14 \pm 0,57$	20	$1,31 \pm 0,61$	20
Haplótipo WT	0	$0,97 \pm 0,54$	27	$1,13 \pm 0,61$	27	$1,27 \pm 0,89$	28	$1,36 \pm 0,61$	28
	1	$0,80 \pm 0,46$	88	$1,04 \pm 0,70$	91	$1,17 \pm 0,73$	90	$1,16 \pm 0,63$	79
	2	$0,86 \pm 0,68$	36	$1,11 \pm 0,82$	36	$0,96 \pm 0,61$	34	$0,96 \pm 0,47$	34

Valores expressos em média $\pm$ D.P.

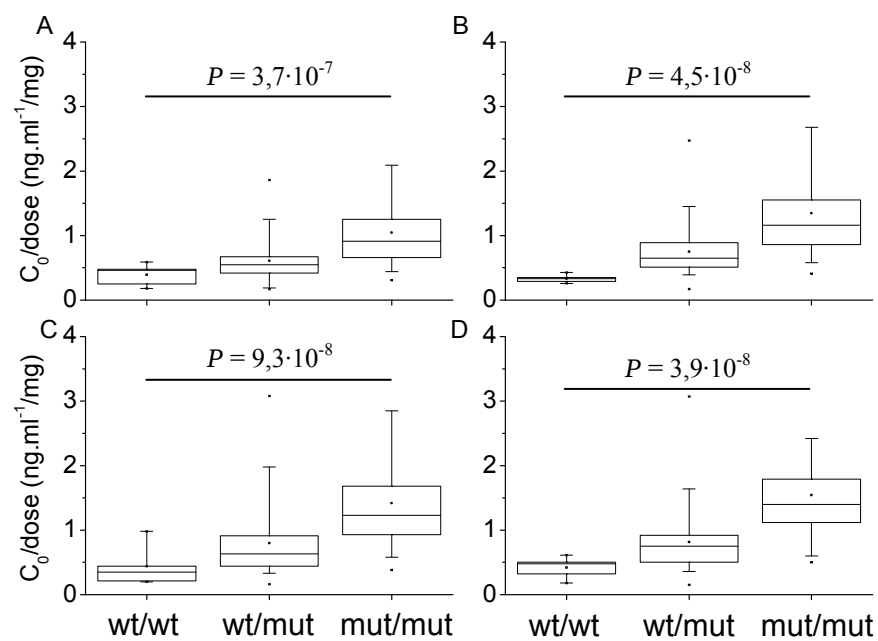


Figura 15: Distribuição da C_0/dose de tacrolimus em relação ao genótipo de *CYP3A5* nos diferentes tempos de acompanhamento. A-D: 1ª semana-3º mês, respectivamente.

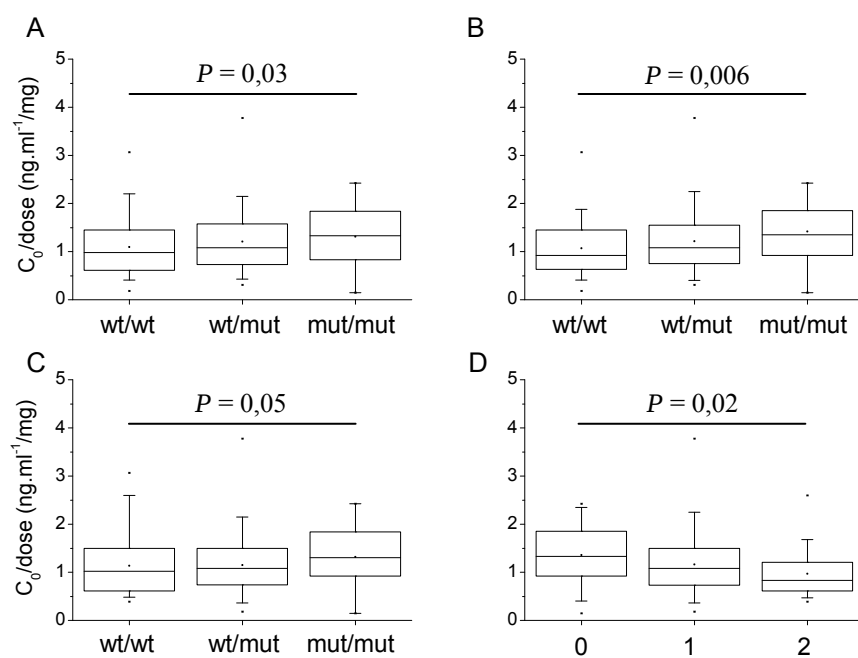


Figura 16: Distribuição da C_0/dose de tacrolimus em relação ao genótipo/haplótipo de *ABCB1* no 3º mês após transplante. A: 1236C>T, B:2677G>T/A, C: 3435C>T e D: número de cópias do haplótipo selvagem.

5. DISCUSSÃO

Esse trabalho, em colaboração com o Hospital do Rim de São Paulo, um centro de referência em transplantes renais no país, é o primeiro a avaliar o impacto de polimorfismos farmacogenéticos na terapia com imunossupressores na população brasileira. Diversos estudos mostram que a extrapolação livre de dados colhidos em populações relativamente homogêneas para populações altamente miscigenadas como é o caso do Brasil (Suarez-Kurtz, 2005a, b; Suarez-Kurtz e Pena, 2006, 2007) é inadequada no caso de genes nos quais as frequências alélicas variam entre as populações ancestrais. Esse é o caso, por exemplo, dos genes *CYP3A5* e *ABCB1*, que têm sido apontados como principais determinantes na farmacocinética dos imunossupressores. Além de terem sido realizados em populações homogêneas, a maioria dos trabalhos investigou apenas a presença do alelo *CYP3A5**3 e não a do alelo *CYP3A5**6. A presença do alelo nulo *CYP3A5**6 pode coexistir com o alelo *CYP3A5**1 e resultar em uma determinação incorreta do *status* alélico de um paciente, quando não avaliado. Como discutido por MacPhee e colaboradores em 2004, a investigação do alelo *CYP3A5**6, presente em aproximadamente 10% de indivíduos de origem africana (Kuehl *e cols.*, 2001; Hustert *e cols.*, 2001) também é muito importante, principalmente em populações com ancestralidade africana, como é o caso da população brasileira.

Além de apresentar pequena biodisponibilidade oral, os imunossupressores são de difícil uso clínico pois apresentam estreita faixa terapêutica e ampla variabilidade interindividual (Utecht *e cols.*, 2006). Em nosso estudo observamos uma diferença na dose diária de CSA que variou de 5 a 7,5 vezes entre os pacientes, de acordo com o tempo após transplante. No caso de FK, essa diferença foi ainda maior e variou de 5,7 a 16 vezes, de acordo com o tempo após transplante. Por esse motivo, a busca por variáveis genéticas com influência na farmacocinética desses medicamentos é de grande interesse a fim de reduzir, no caso de transplantados renais, os riscos de rejeição e nefrotoxicidade.

5.1. Efeito de variáveis genéticas na dose requerida de tacrolimus e ciclosporina

O efeito de polimorfismos em *CYP3A5* na biodisponibilidade de FK foi primeiramente sugerido por MacPhee e colaboradores (2002). Os autores demonstraram que a expressão de *CYP3A5* era o principal determinante da dose requerida de FK em pacientes transplantados renais. Tal efeito foi confirmado repetidamente em diversos trabalhos subseqüentes que mostram que pacientes que expressam *CYP3A5* necessitam de doses significativamente maiores de FK para atingir a C_0 alvo, quando comparados com pacientes que não expressam *CYP3A5* (Haufrond *e cols.*, 2006; Kuypers *e cols.*, 2007; Bandur *e cols.*, 2008). Nosso trabalho confirma esse efeito para a população brasileira, com a demonstração que indivíduos homozigotos selvagens receberam doses de FK de 1,5 a 3,0 vezes maiores que indivíduos homozigotos mutantes, de acordo com o tempo após o transplante. Em 2004, Kuypers e Vanrenterghem demonstraram que atingir a C_0 alvo logo nos primeiros dias após o transplante era essencial para reduzir o risco de rejeição aguda. Portanto, quanto mais rápido for o acerto na dose requerida, mais cedo a C_0 alvo será alcançada e menor será o risco de rejeição aguda.

Em nosso trabalho, o efeito do genótipo de *CYP3A5* na dose requerida de FK pôde ser observado já na primeira semana após o transplante, reforçando a importância dessa variável e que a correção da dose de FK em relação ao genótipo de *CYP3A5* deve ser considerada em pacientes transplantados renais. De fato, alguns autores já defendem que a dose inicial de FK seja corrigida em função do genótipo de *CYP3A5* de tal forma que pacientes que expressam *CYP3A5* recebam uma dose inicial equivalente ao dobro da dose inicial de pacientes sem expressão de *CYP3A5* (Hesselink *e cols.*, 2005; Haufrond *e cols.*, 2006). Apesar de essa hipótese ter que ser formalmente testada, alguns centros de transplante já adotaram a estratégia de dobrar a dose inicial de FK em pacientes com expressão de *CYP3A5* (MacPhee *e cols.*, 2008). Além de confirmar o efeito de polimorfismos em *CYP3A5* na dose requerida de FK, nosso trabalho é o primeiro a mostrar uma diferença significativa na dose requerida de FK entre pacientes homozigotos selvagens e heterozigotos. Até o momento, todos os artigos publicados apresentavam diferença

apenas entre portadores do alelo *CYP3A5**1 (homozigotos selvagens + heterozigotos) e homozigotos mutantes, possivelmente pelo número limitado de indivíduos *1/*1.

Diferente do que foi observado para FK, não houve influência do genótipo de *CYP3A5* na dose requerida de CSA. Visto que a CSA é metabolizada pela mesma via que o FK, se poderia esperar que esses medicamentos fossem susceptíveis a influências genéticas semelhantes. No entanto, assim como no nosso trabalho, a maioria dos estudos não é capaz de demonstrar efeito de *CYP3A5* na dose requerida de CSA (Hesselink *e cols.* 2003, Bandur *e cols.*, 2008; Wang *e cols.*, 2009). Como dito anteriormente, observamos uma variabilidade na dose diária de FK maior que na dose de CSA e esse fato pode ter aumentado nosso poder estatístico de detectar um efeito significativo dos polimorfismos de *CYP3A5* na dose de FK e não de CSA.

A correlação entre polimorfismos em *ABCB1* e a dose requerida de FK e CSA pode ser interpretada como um aumento na absorção intestinal desses medicamentos em pacientes portadores de alelos mutantes. Pacientes selvagens para o gene *ABCB1* tendem a ter um efluxo maior de medicamentos das células intestinais para o lúmen intestinal e, portanto, necessitam de doses diárias maiores para atingir concentrações plasmáticas alvo. Em contrapartida, uma redução na atividade de P-gp diminui o efluxo mediado por essa bomba, resultando em uma maior biodisponibilidade oral de medicamentos (Anglicheau *e cols.* 2003). Nesse trabalho investigamos a correlação entre os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T de *ABCB1* e a dose requerida de FK e CSA. Para FK, foi observada uma associação significativa entre o polimorfismo não-sinônimo 2677G>T/A (alelo G está associado a maior expressão de *ABCB1*) e a dose no 3º mês de acompanhamento. Observamos que a dose de FK em pacientes homozigotos selvagens para o alelo 2677G foi, em média, 22% e 30% maior que em pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes, respectivamente. O impacto dos haplótipos de *ABCB1* na dose de FK também foi avaliado. A única associação significativa detectada foi entre a dose requerida e o número de cópias do haplótipo selvagem após três meses de transplante. Nesse tempo, observamos que pacientes homozigotos para o haplótipo selvagem C/G/C receberam em média uma dose de FK 31% maior que pacientes sem nenhuma cópia do haplótipo selvagem ($12,4 \pm 7$ vs $8,5 \pm 5$). A maioria dos estudos, usando tanto SNPs individuais ou haplótipos, não demonstra associação entre os polimorfismos de *ABCB1* e a

dose requerida de FK (Hesselink *e cols.*, 2003; Haufroid *e cols.*, 2004; Tsuchiya *e cols.*, 2004; Loh *e cols.*, 2008, Bandur *e cols.*, 2008, Press *e cols.*, 2009). No entanto, MacPhee e colaboradores descreveram uma associação entre a dose FK e o polimorfismo 3435C>T, na qual pacientes com o genótipo 3435CC recebiam doses maiores. Apesar de significativo, esse efeito era relativamente pequeno (MacPhee *e cols.*, 2002). Em outro trabalho, foi mostrado que pacientes com o haplótipo C/G/C recebiam doses significativamente maiores que pacientes com o genótipo T/nonG/T (Anglicheau *e cols.*, 2003). Mais recentemente, foi descrita uma associação significativa entre o genótipo 3435CC e a dose requerida de FK em pacientes chineses submetidos a transplante hepático (Wei-Lin *e cols.*, 2006). A falta de consenso nos resultados pode ser explicada pela diferença no número de pacientes analisados em cada estudo e no tempo após transplante em que o efeito dos polimorfismos em *ABCB1* era analisado. Em relação a dose de CSA, não observamos nenhuma associação entre os genótipos e haplótipos de *ABCB1* e a dose requerida. Essa ausência de associação está de acordo com os dados mostrados em estudos realizados com pacientes submetidos a transplante renal (Hesselink *e cols.* 2003; Foote *e cols.* 2006; Crettol *e cols.* 2008), hepático (Crettol *e cols.* 2008) e cardíaco (Hesselink *e cols.* 2004). Juntos, esses resultados mostram que polimorfismos em *ABCB1* explicam, de maneira limitada, a variabilidade na dose requerida dos inibidores de calcineurina.

5.2. Efeito de variáveis demográficas, clínicas e genéticas na C_0 /dose de tacrolimus e ciclosporina

O impacto de variáveis demográficas, clínicas e genéticas na C_0 /dose de FK e CSA foi avaliado através de uma análise de regressão múltipla. Primeiramente, foi realizada uma análise univariada para selecionar as variáveis que seriam incluídas na análise multivariada.

A análise univariada realizada para FK mostrou o genótipo de *CYP3A5* como a única variável com efeito significativo na C_0 /dose na 1ª semana e nos 1º e 2º meses após transplante. Pacientes homozigotos mutantes apresentaram maior C_0 /dose quando comparados com pacientes homozigotos selvagens ou heterozigotos. No 3º mês, além do

genótipo de *CYP3A5*, os polimorfismos isolados e o número de cópias do haplótipo selvagem também apresentaram efeito significativo na C_0 /dose de FK e foram incluídos na análise multivariada. O genótipo de *CYP3A5* foi a única variável que se manteve significativa ($P = 2,2 \cdot 10^{-7}$) após a análise e o efeito de polimorfismos em *CYP3A5* na C_0 /dose de FK pode ser explicado pela grande influência que os mesmos têm na determinação da dose de FK. Apesar de terem sido apontados pela análise univariada como possíveis determinantes da C_0 /dose de FK, os polimorfismos de *ABCB1* não apresentaram valores significativos para se manter no modelo. Conforme descrito recentemente por Bandur e colaboradores (2008), o haplótipo de *ABCB1* não possui efeito significativo nos parâmetros farmacocinéticos de FK, mas está associado ao risco de rejeição aguda. Segundo os autores, a concentração de imunossupressores no interior dos linfócitos de portadores de haplótipos de *ABCB1* que aumentam a atividade de P-gp pode ser menor, apesar de as concentrações plasmáticas serem normais (Bandur *e cols.*, 2008). O modelo proposto nesse trabalho é capaz de explicar 21% da variação de C_0 /dose de FK observada na população estudada.

A análise univariada realizada para CSA mostrou que polimorfismos em *CYP3A5* não têm efeito significativo na determinação da C_0 /dose nos tempos estudados. Já os genótipos/haplótipos de *ABCB1* apresentaram efeito significativo nos 2º e 3º meses após transplante. Para esses tempos, foi observado que a C_0 /dose de CSA é maior nos pacientes homozigotos mutantes (para cada um dos polimorfismos estudados) e que ela reduz de acordo com o aumento no número de cópias do haplótipo selvagem de *ABCB1*. Nos 2º e 3º meses as variáveis superfície corporal e dose de PRED (apenas no 3º mês) também se associaram significativamente com a C_0 /dose de CSA. O efeito de PRED na C_0 /dose de CSA pode ser explicado pela interação medicamentosa descrita entre corticosteróides e imunossupressores (Shimada *e cols.*, 2002). Para o 2º mês após o transplante, apenas a superfície corporal se manteve significativa após análise multivariada ($P = 0,002$). Já a análise multivariada realizada para o 3º mês apresentou a superfície corporal, a dose de PRED e o número de cópias do haplótipo selvagem de *ABCB1* como determinantes significativos da C_0 /dose de CSA. Essas variáveis são capazes de explicar 17% da variação de C_0 /dose observada.

Para investigar se a interação farmacocinética descrita entre os imunossupressores (Podder *e cols.*, 2001; Bai *e cols.*, 2004; Cattaneo *e cols.*, 2004) tem algum efeito na C_0 /dose de FK ou CSA, foram incluídos em nosso estudo 103 pacientes tratados concomitantemente com SRL. Os resultados mostraram que o uso concomitante de SRL não interfere na C_0 /dose de FK ou CSA.

Em resumo, esse trabalho mostra que nenhum polimorfismo estudado tem efeito na dose diária de CSA, que haplótipo de *ABCB1* está associado a C_0 /dose de CSA no 3º mês após o transplante e que o genótipo de *CYP3A5* está fortemente relacionado com a dose e a C_0 /dose de FK, já na primeira semana após o transplante. Devido à relação existente entre o tempo que se leva para atingir a C_0 alvo e o prognóstico de rejeição aguda, os resultados aqui apresentados sugerem que a genotipagem prévia para *CYP3A5* pode contribuir para a individualização da terapia com imunossupressores e na melhoria da evolução clínica dos transplantes.

6. CONCLUSÕES

Em relação a dose requerida de FK e CSA:

- Indivíduos homozigotos selvagens para *CYP3A5* receberam doses de FK significativamente maiores que indivíduos homozigotos mutantes já na 1ª semana após transplante;
- Do 1º ao 3º mês após transplante, também foi observada diferença significativa na dose de FK entre homozigotos selvagens e heterozigotos. Esse é o primeiro artigo a descrever essa diferença;
- O polimorfismo 2677G>T/A e o haplótipo de *ABCB1* tiveram efeito significativo na dose requerida de FK no 3º mês após transplante;
- Os genótipos de *CYP3A5* e *ABCB1* não tiveram efeito na dose requerida de CSA;

Em relação a C_0 /dose de FK e CSA:

- Para FK, o genótipo de *CYP3A5* foi a única variável com efeito significativo na C_0 /dose da 1ª semana ao 2º mês após o transplante;
- Para FK, a análise multivariada realizada para o 3º mês após transplante apontou o genótipo de *CYP3A5* como o único determinante da C_0 /dose;
- Para CSA, a análise multivariada realizada para o 2º mês após o transplante não apontou variáveis genéticas como determinantes significativos da C_0 /dose;
- Para CSA, a análise multivariada realizada para o 3º mês após o transplante apontou a superfície corporal, a dose de PRED e o haplótipo de *ABCB1* como determinantes da C_0 /dose.
- O uso concomitante de SRL não teve efeito significativo na determinação da C_0 /dose de CSA e FK.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida S, Zandoná MR, Franken N, Callegari-Jacques SM, Osório-Wender MC, Hutz MH. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(6):346-51.
- Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Sep 15;91(18):1588-90.
- Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jul;14(7):1889-96.
- Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Büchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C, Marquet P. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 May;75(5):422-33.
- Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant*. 2005 Mar;5(3):595-603.
- Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, et al. 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*. 1989 Jun 25;264(18):10388-95.
- Bai S, Stepkowski SM, Kahan BD, Brunner LJ. Metabolic interaction between cyclosporine and sirolimus. *Transplantation*. 2004 May 27;77(10):1507-12.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N, Hall J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 1999 Sep;66(3):288-94.
- Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2008 Nov 15;86(9):1206-13.
- Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int*. 1996 Oct;50(4):1089-100. Review.
- Cattaneo D, Merlini S, Pellegrino M, Carrara F, Zenoni S, Murgia S, Baldelli S, Gaspari F, Remuzzi G, Perico N. Therapeutic drug monitoring of sirolimus: effect of concomitant immunosuppressive therapy and optimization of drug dosing. *Am J Transplant*. 2004 Aug;4(8):1345-51.
- Choi JH, Lee YJ, Jang SB, Lee JE, Kim KH, Park K. Influence of the CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Korean subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2007 Aug;64(2):185-91.
- Cholerton S, Daly AK, Idle JR. The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci*. 1992 Dec;13(12):434-9. Review.

- Cohen D, Galbraith C. General health management and long-term care of the renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis*. 2001 Dec;38(6 Suppl 6):S10-24. Review.
- Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Ansermot N, Fathi M, Pascual M, Eap CB. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008a Apr;18(4):307-15.
- Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, Thummel KE. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006 May;34(5):836-47.
- Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol*. 2001 Feb;59(2):386-92.
- Edwards G. Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity?. *Filaria J*. 2003 Oct 24;2 Suppl 1:S8.
- Elens L, Capron A, Kerckhove VV, Lerut J, Mourad M, Lison D, Wallemacq P, Haufroid V. 1199G>A and 2677G>T/A polymorphisms of ABCB1 independently affect tacrolimus concentration in hepatic tissue after liver transplantation. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Oct;17(10):873-83.
- Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics*. 2008 Mar;9(3):267-76.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):487-91. Review.

- Finta C, Zaphiropoulos PG. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. *Gene*. 2000 Dec 30;260(1-2):13-23.
- Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL Jr, Bhat K, Kim RB, Wilkinson GR. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics*. 2003 Oct;13(10):595-606.
- Foote CJ, Greer W, Kiberd BA, Fraser A, Lawen J, Nashan B, Belitsky P. MDR1 C3435T polymorphisms correlate with cyclosporine levels in de novo renal recipients. *Transplant Proc*. 2006 Nov;38(9):2847-9.
- Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW, MacPhee IA. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation*. 2006 Sep 15;82(5):705-8.
- Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Nov 18;54(10):1295-310. Review.
- Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, Masuda S, Uesugi M, Hosohata K, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Uemoto S, Inui K. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 May;18(5):413-23.
- García-Martín E, Martínez C, Pizarro RM, García-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, Agúndez JA. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Mar;71(3):196-204.
- Garsa AA, McLeod HL, Marsh S. CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing. *BMC Med Genet*. 2005 May 9;6:19.

Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA, Wojnowski L. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*. 2001 Mar;11(2):111-21.

Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw-Hill, 2003; 10ª edição.

Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD. Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. Contribution of the cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol*. 1994 Jul 5;48(1):173-82.

Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000 Mar 2;342(9):605-12.

Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics*. 2004 Mar;14(3):147-54.

Haufroid V, Wallemacq P, Van Kerckhove V, Elens L, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Mourad M. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant*. 2006 Nov;6(11):2706-13.

Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and

- MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003 Sep;74(3):245-54.
- Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T, van der Werf M, Weimar W, Mathot RA. 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.* 2004 Dec;76(6):545-56.
- Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression?. *Pharmacogenomics.* 2005 Jun;6(4):323-37. Review.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, Budde K, Kuypers DR, Pisarski P, Le Meur Y, Mamelok RD, van Gelder T. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 Apr;18(4):339-48.
- Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, Huang JD. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos.* 2001 Mar;29(3):268-73.
- Hu YF, Qiu W, Liu ZQ, Zhu LJ, Liu ZQ, Tu JH, Wang D, Li Z, He J, Zhong GP, Zhou G, Zhou HH. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 Nov;33(11):1093-8.
- Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc.* 1954 Aug;70(2):266-73.
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski

- L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2001 Dec;11(9):773-9.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Síntese de Indicadores Sociais 2005*. São Paulo: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005.
- Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(9):553-76. Review.
- Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris RE, Benet LZ, Christians U. Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar;33(1-2):514-5.
- Kalow W, Maykut MO. The interaction between cholinesterases and a series of local anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther*. 1956 Apr;116(4):418-32.
- Kreutz R, Zürcher H, Kain S, Martus P, Offermann G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics*. 2004 Oct;14(10):665-71.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG; Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*. 2003 Aug;13(8):481-94. Erratum in: *Pharmacogenetics*. 2003 Nov;13(11):701.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and

- characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):383-91.
- Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Dec;82(6):711-25.
- Kuypers DR, Vanrenterghem Y. Time to reach tacrolimus maximum blood concentration, mean residence time, and acute renal allograft rejection: an open-label, prospective, pharmacokinetic study in adult recipients. *Clin Ther.* 2004 Nov;26(11):1834-44.
- Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Nov 18;54(10):1271-94. Review.
- Le Meur Y, Djebli N, Szelag JC, Hoizey G, Toupance O, Rérolle JP, Marquet P. CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Jul;80(1):51-60.
- Li D, Lu W, Zhu JY, Gao J, Lou YQ, Zhang GL. Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients. *J Clin Pharm Ther.* 2007 Oct;32(5):505-15.
- Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, Schuetz EG, Thummel KE. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol.* 2002 Jul;62(1):162-72.
- Liu TC, Lin SF, Chen TP, Chang JG. Polymorphism analysis of CYP3A5 in myeloid leukemia. *Oncol Rep.* 2002 Mar-Apr;9(2):327-9.

- Loh PT, Lou HX, Zhao Y, Chin YM, Vathsala A. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2008 Jun;40(5):1690-5.
- MacPhee IA and Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation.* 2008 Jan 27;85(2):163-5.
- Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation.* 2002 Dec 15;74(11):1486-9.
- MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2004 Jun;4(6):914-9.
- Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation.* 2005 Feb 27;79(4):499-502.
- Mai I, Perloff ES, Bauer S, Goldammer M, Johne A, Filler G, Budde K, Roots I. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2004 Nov;58(5):548-53.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jan;75(1):13-33. Review.

- Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther.* 2006 Oct;112(1):184-98. Review.
- Matas AJ, Gillingham KJ, Chavers BM, Nevins T, Kashtan C, Mauer SM, Payne WD, Gruessner R, Najarian JS. The importance of early cyclosporine levels in pediatric kidney transplantation. *Clin Transplant.* 1996 Dec;10(6 Pt 1):482-6.
- Medina-Pestana JO, Vaz ML, Park SI. Organ transplant in Brazil. *Transplant Proc.* 2002 Mar;34(2):441-3.
- Medina-Pestana JO. Organization of a high-volume kidney transplant program--the "assembly line" approach. *Transplantation.* 2006 Jun 15;81(11):1510-20.
- Miao LY, Huang CR, Hou JQ, Qian MY. Association study of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms with sirolimus trough concentration and dose requirements in Chinese renal transplant recipients. *Biopharm Drug Dispos.* 2008 Jan;29(1):1-5.
- Min DI, Ellingrod VL. Association of the CYP3A4*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit.* 2003 Jun;25(3):305-9.
- Min DI, Ellingrod VL, Marsh S, McLeod H. CYP3A5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit.* 2004 Oct;26(5):524-8.
- Mirghani RA, Sayi J, Aklillu E, Allqvist A, Jande M, Wennerholm A, Eriksen J, Herben VM, Jones BC, Gustafsson LL, Bertilsson L. CYP3A5 genotype has significant effect on quinine 3-hydroxylation in Tanzanians, who have lower total CYP3A activity than a Swedish population. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Sep;16(9):637-45.

- Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, De Meyer M, Malaise J, Eddour DC, Lison D, Squifflet JP, Haufroid V. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation*. 2005 Oct 15;80(7):977-84.
- Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb;60(2):265-71. Review.
- Ng FL, Holt DW, MacPhee IA. Pharmacogenetics as a tool for optimising drug therapy in solid-organ transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. 2007 Sep;8(13):2045-58. Review.
- Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA, van Hooff JP, van Dieijen-Visser MP, Bekers O. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Aug;21(4):427-35.
- Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, Casey G, Witte JS. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Oct;8(10):901-5.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):177-82.
- Podder H, Stepkowski SM, Napoli K, Kahan BD. Pharmacokinetic interactions between sirolimus and cyclosporine exacerbate renal dysfunction. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar;33(1-2):1086.

- Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2009 Apr;31(2):187-97.
- Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, Zhong LJ, Liang HQ, Ma CL, Zhang L, Zhong MK. Association of MDR1, CYP3A4*18B, and CYP3A5*3 polymorphisms with cyclosporine pharmacokinetics in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Nov;64(11):1069-84.
- Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Aug 19;90(16):1225-9. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 1999 Jun 16;91(12):1082.
- Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, Caliebe A, Dechant M, Braun F, Kunzendorf U, Cascorbi I. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;81(2):228-34.
- Rivory LP, Qin H, Clarke SJ, Eris J, Duggin G, Ray E, Trent RJ, Bishop JF. Frequency of cytochrome P450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000 Aug;56(5):395-8.
- Roy JN, Lajoie J, Zijenah LS, Barama A, Poirier C, Ward BJ, Roger M. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab Dispos.* 2005 Jul;33(7):884-7.
- Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Sep;16(9):659-65.

- Salzano FM, Bortolini MC (2002). The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000 Jan;67(1):48-56.
- Schuetz JD, Molowa DT, Guzelian PS. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Nov 1;274(2):355-65.
- Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics*. 1994 Feb;4(1):11-20.
- Shimada T, Terada A, Yokogawa K, Kaneko H, Nomura M, Kaji K, Kaneko S, Kobayashi K, Miyamoto K. Lowered blood concentration of tacrolimus and its recovery with changes in expression of CYP3A and P-glycoprotein after high-dose steroid therapy. *Transplantation*. 2002 Nov 27;74(10):1419-24.
- Suarez-Kurtz G, Perini JA, Bastos-Rodrigues L, Pena SD, Struchiner C. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. *Pharmacogenomics*. 2007 Oct;8(10):1299-306.
- Suarez-Kurtz G, Pena SD. Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Curr Drug Targets*. 2006 Dec;7(12):1649-58. Review.
- Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and population admixture: implications for drug development and prescription *Nat Rev Genet* 6 ,30 Sep 2005.

- Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Apr;26(4):196-201. Review.
- Thervet E, Anglicheau D, Legendre C, Beaune P. Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation. *Ther Drug Monit.* 2008 Apr;30(2):143-50. Review.
- Thompson EE, Kuttub-Boulos H, Witonsky D, Yang L, Roe BA, Di Rienzo A. CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants. *Am J Hum Genet.* 2004 Dec;75(6):1059-69.
- Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T, Kato T. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2004 Oct 27;78(8):1182-7.
- Uesugi M, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y, Inui K. Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Feb;16(2):119-27.
- Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, Kohnle M, Zanker B, Land W, Morales JM, Andrés A, Schäfer A, Stevenson P. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar;31(1-2):296-8.
- USRDS (United States Renal Data System) 2004 Annual Data Report. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 2004. Chapter 13. 218–224.
- Utecht KN, Hiles JJ, Kolesar J. Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* 2006 Dec 1;63(23):2340-8. Review.

- van Duijnhoven EM, Boots JM, Christiaans MH, Stolk LM, Undre NA, van Hooff JP. Increase in tacrolimus trough levels after steroid withdrawal. *Transpl Int*. 2003 Oct;16(10):721-5.
- von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. 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*. 2001 Jun;47(6):1048-52.
- Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, Olopade OI, Weber BL, Rebbeck TR. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Hum Mutat*. 1998;12(4):289.
- Wang W, Zhang XD, Guan DL, Lü YP, Ma LL, Hu XP, Zhang P, Wang Y, Chen X. Relationship between MDR1 polymorphism and blood concentration of cyclosporine A. *Chin Med J (Engl)*. 2005 Dec 20;118(24):2097-100.
- Wang Y, Wang C, Li J, Wang X, Zhu G, Chen X, Bi H, Huang M. Effect of genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine concentration during the early stage after renal transplantation in Chinese patients co-treated with diltiazem. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009 Mar;65(3):239-47.
- Watkins WM. Pharmacology and pharmacokinetics of new antimalarials. *Med Trop (Mars)*. 1995;55(4 Suppl):33-6. Review.
- Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, Li-hua W, Ting-bo L, Song-feng Y, Sheng Y. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl*. 2006 May;12(5):775-80.

- Westlind A, Löfberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 May 27;259(1):201-5.
- Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, Honaker MR, Alloway RR, Meibohm B. The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 2003 Jun;43(6):555-64.
- Yoo SJ, Kahan BD. Combination treatment with sirolimus and cyclosporin in clinical renal transplantation: a comprehensive review. *Drugs Today* 2001; 37: 385–400.
- Yu SF, Wu LH, Zheng SS. Genetic factors for individual administration of immunosuppressants in organ transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006 Aug;5(3):337-44.
- Zeigler-Johnson C, Friebe T, Walker AH, Wang Y, Spangler E, Panossian S, Patacsil M, Aplenc R, Wein AJ, Malkowicz SB, Rebbeck TR. CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2004 Nov 15;64(22):8461-7.
- Zhang X, Liu ZH, Zheng JM, Chen ZH, Tang Z, Chen JS, Li LS. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clin Transplant*. 2005 Oct;19(5):638-43.
- Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q, Wang W. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc*. 2005 Jan-Feb;37(1):178-81.

Sítios na internet:

www.pharmgkb.org

www.refargen.org.br

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.ibge.gov.br

ANEXO I



São Paulo, 27 de julho de 2007
CEP 1036/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) HELIO TEDESCO SILVA JUNIOR

Co-Investigadores: Jose Osmar Medina Pestana; Claudia Rosso Felipe; Guilherme Suarez- Kurtz; Ana Beatriz Santoro

Disciplina/Departamento: Nefrologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Grupo de farmacogenômica do INCA.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Farmacogenética do transplante renal: influência de polimorfismos em CYP3A5 e ABCB1"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo de polimorfismo farmacogenéticos em pacientes transplantados renais.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco mínimo, desconforto leve com coleta de sangue.

OBJETIVOS: Investigar a prevalência de polimorfismos nos genes CYP3A5 e ABCB1 em pacientes brasileiros submetidos a transplante renal.

RESUMO: Estudo de farmacogenética com colaboração entre o Hospital do Rim e Hipertensão da FOR/UNIFESP e o INCA (Instituto Nacional de Câncer). Serão recrutados 300 pacientes que foram submetidos a transplante renal na Instituição, entre 1998 e 2006. Os pacientes serão convocados para serem informados sobre o estudo e aos que desejarem participar será solicitado o preenchimento de um questionário demográfico e a assinatura do TCLE. Desses pacientes será colhida uma amostra de sangue (3mL) para a genotipagem dos polimorfismos em estudo - CYP3A5 e ABCB1. Os pacientes serão divididos em 4 grupos: G1 (n=100) pacientes que receberam tacrolimo, prednisona e azatioprina; G2 (n=100) pacientes que receberam ciclosporina, prednisona e azatioprina; G3 (n=50), pacientes que receberam tacrolimo, prednisona e sirolimo; e G4 (n=50), pacientes que receberam ciclosporina, prednisona e sirolimo. Dados demográficos, doses e concentrações das drogas imunossupressoras, rejeição aguda serão obtidos diretamente do prontuário médico. O DNA será extraído das amostras de sangue total dos pacientes e a genotipagem dos polimorfismos em CYP3A5 será realizado pela técnica de PCR-RFLP e dos polimorfismos em ABCB1 por minisequenciamento (snap-shot). Os procedimentos para essas genotipagens já estão padronizados no Grupo de Farmacogenômica do INCA. A tipagem para marcadores de ancestralidade (AIMs) será feita empregando-se um conjunto de indels (inserções e deleções) previamente validado na população brasileira. Serão obtidas de todos os pacientes incluídos nos estudos as doses e as respectivas concentrações de ciclosporina, tacrolimo e sirolimo, realizadas conforme rotina local do tratamento do transplante. As concentrações destas drogas serão



rotineiramente determinadas por kits específicos comercializados. A análise dos resultados serão as frequências alélica e genotípica determinadas por contagem. As frequências genotípicas esperadas serão calculadas através da equação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e será avaliada a influência dos polimorfismos nos genes CYP3A5 e ABCB1.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: estudar os fatores genéticos envolvidos tanto na farmacocinética como farmacodinâmica dos medicamentos imunossupressores ciclosporina, tacrolimo e sirolimo.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos de coleta de dados de prontuários e estudo farmacogenômico já padronizado pela equipe.

TCLE: apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 26/7/2008 e 26/7/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

ANEXO II

Farmacogenética do transplante renal: influência de polimorfismos em CYP3A5 e ABCB1

Informações ao paciente:

Você realizou um transplante renal e, para evitar que seu sistema de defesa rejeite o rim transplantado, você faz uso de medicamentos chamados imunossupressores.

Esses medicamentos devem ser utilizados diariamente e as doses são checadas a cada visita, baseado nos resultados de exame de sangue que você realiza. Quando a quantidade de medicamento está muito elevada no sangue, seu médico reduz a dose do remédio para evitar que você tenha efeitos colaterais. Por outro lado, quando você tem pouca quantidade de medicamento no sangue, a dose é aumentada para que você não tenha rejeição.

Por causa disso, o tratamento é individualizado. Para cada paciente, é necessária uma dose diferente dos medicamentos, pois cada pessoa absorve os remédios de uma forma diferente.

O motivo disso vem sendo estudado através de estudos chamados farmacogenéticos. Estes estudos avaliam genes (que são pedaços do DNA dos pacientes). Os genes variam entre as pessoas o que faz com que cada pessoa seja diferente da outra. Através de uma única coleta de sangue, é possível verificar se os pacientes possuem genes que vão determinar se a absorção dos medicamentos será boa ou ruim e também a forma como esses medicamentos poderão funcionar.

Tendo essas informações, é possível prever a dose mais indicada de cada medicamento para cada paciente. No entanto, para isso acontecer ainda são necessárias muitas pesquisas que irão, no futuro, auxiliar os médicos em tratamentos como o seu.

Você está sendo convidado a participar de um estudo que vai analisar genes de 300 pacientes transplantados renais que fazem uso de medicamentos para evitar a rejeição.

Você não terá benefício com a participação nesse estudo. Você será um voluntário que irá contribuir para termos mais informações sobre o seu tratamento

Sua participação no estudo é **VOLUNTÁRIA**. Você não é obrigado a participar. Mesmo que decida participar do estudo, você pode desistir a qualquer momento, sem que isso prejudique seu tratamento aqui no hospital. Caso não queira participar do estudo, você irá continuar em uso de seu tratamento atual, sem nenhuma mudança.

Se aceitar participar desse estudo, colheremos uma amostra de sangue para análises de seus genes. As demais informações necessárias para o estudo serão obtidas de seu prontuário médico. A amostra de sangue será utilizada apenas para as finalidades desse estudo.

Durante todo o período que participar do estudo, manteremos sigilo em relação à sua identidade. Nossa equipe de pesquisa terá acesso aos seus dados e, caso seja necessário também as autoridades regulatórias (Comitê de Ética do hospital, o Comitê Nacional de Ética). Ao final do estudo, os resultados poderão ser publicados, mas sua identidade nunca será revelada.

Qualquer dúvida a respeito do estudo ou sobre sua saúde, você pode entrar em contato com o médico responsável Dr Helio Tedesco no telefone 50878113 ou com a farmacêutica coordenadora do estudo Claudia Rosso Felipe, no telefone 50878110. Caso tenha dúvidas ou queira se informar melhor quanto aos direitos dos voluntários de pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa da UNIFESP, que também está acompanhando a evolução desse estudo. Tel: 55397162.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____,
declaro que li e entendi as informações contidas nesse formulário e concordo em
participar do estudo.

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Nome da testemunha*: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

** Para pacientes com deficiência auditiva, visual ou analfabetos.*

Nome do profissional da equipe responsável pela obtenção do termo de
consentimento:

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

ANEXO III

FARMACOGENÉTICA DO TRANSPLANTE RENAL

QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO

1	IDENTIFICAÇÃO	Nº de controle:
----------	----------------------	---

1.01 Data da Entrevista: dd/mm/aaaa	1.02 Origem :
1.03 N° da matrícula:	
1.04 Nome:	1.05 Tipo: ☐ 1. paciente ☐ 2. voluntário sadio/controle
1.06 Nome do entrevistador:	

2	DADOS PESSOAIS
----------	-----------------------

2.01 Endereço:	
2.02 Bairro:	
2.03 Cidade:	2.04 Estado: (sigla)
2.05 Cep: -	2.06 Telefone: - (DDD) - 0000-0000
2.07 Celular: -	
2.08 E-mail:	

2.10 Data de nascimento	Dia Mês Ano	2.11 Idade: anos
-------------------------	---	--

2.12 Local do nascimento (estado) :
--

2.13 Sexo: ☐ 1. Masculino ☐ 2. Feminino

2.14 Peso: Altura:
--

3	DADOS ÉTNICOS
----------	----------------------

3.01 Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça?	
☐ 1. Branca	☐ 4. Amarela
☐ 2. Parda	☐ 5. Indígena
☐ 3. Preta	☐ 6. Sem declaração

3.02 Na sua opinião, qual é a cor ou raça dos seus pais?

1. Mãe

2. Pai

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

3.03 Na sua opinião, qual é a cor ou raça dos seus avós maternos?

1. Avó

2. Avô

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

3.04 Na sua opinião, qual é a cor ou raça dos seus avós paternos?

1. Avó

2. Avô

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

3.05 Classificação de cor ou raça feita pelo entrevistador:

☐ 1. Branca

☐ 4. Amarela

☐ 2. Parda

☐ 5. Indígena

☐ 3. Preta

☐ 6. Sem declaração

4

USO DE MEDICAMENTOS ALÉM DO TRATAMENTO IMUNOPRESSOR

As próximas perguntas são sobre o uso de medicamentos (NÃO INCLUIR O ESQUEMA TERAPÊUTICO ESPECÍFICO PARA O TRANSPLANTE RENAL)

4.01 Faz uso de algum medicamento atualmente:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de uso
1) _____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____
3) _____	_____	_____	_____
4) _____	_____	_____	_____

4.02 Fez uso crônico de algum medicamento:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de uso	Quando parou
1) _____	_____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____	_____
3) _____	_____	_____	_____	_____
4) _____	_____	_____	_____	_____

4.03 Faz uso de algum fitoterápico, homeopatia, chá ou outro produto natural atualmente:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de uso
1) _____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____
3) _____	_____	_____	_____
4) _____	_____	_____	_____

5

DOENÇAS CRÔNICAS

5.01 Possui alguma doença crônica?

- ☐ 1. Diabetes
- ☐ 2. Pressão Alta
- ☐ 3. Insuficiência Cardíaca
- ☐ 4. Gastrite/úlcera
- ☐ 5. Tireóide
- ☐ 6. Asma/Bronquite
- ☐ 7. Febre Reumática
- ☐ 8. Outras – especifique _____

Assinatura do entrevistador

Curriculum Vitae

Nome: Ana Beatriz de Menezes Santoro

Nascimento: 28/03/1981

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

- Graduação em Ciências Biológicas, Bacharelado Genética pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999 a 2003
- Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003 a 2004
- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004 a 2009

Comunicação em Congresso

- 6 comunicações em congressos nacionais

Publicações

1. ESTRELA R. ; **SANTORO A.**; BARROSO P. ; TUYAMA M. ; SUAREZ-KURTZ G. . CYP3A5 Genotype Has No Impact on Plasma Trough Concentrations of Lopinavir and Ritonavir in HIV-infected Subjects. Clin Pharmacol Ther, Fevereiro 2008 (*in press*).

2. REIS, M. M. ; **SANTORO, A.** ; SUAREZ-KURTZ, G. . Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. Pharmacogenetics, v. 13, n. 6, p. 371-373, 2003.

de MIRANDA, J. ; **SANTORO, A.** ; ENGELENDER, S. ; WOLOSKE, H. . Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis. Gene, v. 256, p. 183-188, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)