



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSSANA BATISTA DE OLIVEIRA GODOY CAMARGO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES
DO BIOMETABOLISMO, DE RESISTÊNCIA A DROGAS E
DO RECEPTOR DA VITAMINA D EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

ROSSANA BATISTA DE OLIVEIRA GODOY CAMARGO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES
DO BIOMETABOLISMO, DE RESISTÊNCIA A DROGAS E
DO RECEPTOR DA VITAMINA D EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilce Mara de Syllos Cólus
Co-orientador: Dr. Marcelo Tempesta de Oliveira

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

| | |
|-------|--|
| C172i | <p>Camargo, Rossana Batista de Oliveira Godoy. Investigação de variantes genéticas nos genes do biometabolismo, de resistência a drogas e do receptor da vitamina D em pacientes transplantados renais / Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo . – Londrina, 2013. 77f. : il.</p> <p>Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Rins – Transplante – Teses. 2. Imunologia de transplantes – Teses. 3. Genes de resposta imune – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. 5. Drogas – Metabolismo – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.61:577.27</p> |
|-------|--|

ROSSANA BATISTA DE OLIVEIRA GODOY CAMARGO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES DO
BIOMETABOLISMO, DE RESISTÊNCIA A DROGAS E DO
RECEPTOR DA VITAMINA D EM PACIENTES TRANSPLANTADOS
RENAIS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Valter Augusto Della Rosa
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de Fevereiro de 2013.

A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.

(Aristóteles, 350 aC)

Ao meu esposo Tadeu
e aos meus filhos César e Lilian

AGRADECIMENTOS

A DEUS, luz que conduz a todos nós.

À Profa. Dra. ILCE MARA DE SYLLOS CÓLUS, orientadora desta dissertação, a minha gratidão por sua dedicação e paciência. A mestre que nos ensina a todo instante que o saber vai além das escolas, mora no mundo, mora na gente e na etapa final deste trabalho aumenta em nós o peso de nossos corações.

Ao Prof. Dr. ALTAIR JACOB MOCELIN, a minha admiração por sua dedicação, caráter e amor aos pacientes durante toda a sua vida profissional.

À Dr^a TIEMI MATSUO, que realizou as análises estatísticas, o meu carinho e agradecimento por sua atenção.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. VINICIUS DAHER ÁLVARES DELFINO e Profa. Dra. ROBERTA LOSI-GUEMBAROVSKI, pelas contribuições e esclarecimentos neste trabalho.

À Dra. TERESA TIÉ OSHIRO MOCELIN e à NELZA TSURUDA, do laboratório de Histocompatibilidade Histocom do Instituto do Rim, pela amizade, incentivo do trabalho e auxílio na coleta dos dados dos pacientes.

Aos amigos do curso de pós-graduação do Laboratório de Oncogenética e Mutagênese do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela amizade e auxílio neste trabalho, em especial a minha gratidão carinhosa à **HELLEN KUASNE** por todo empenho neste trabalho; ANDRÉ H. LENGERT, ANA FLÁVIA SPECIAN, ADELINE LIMBERGER, DANIELE SARTORI, DIEGO LUIS RIBEIRO, DIMITRIUS T. PRAMIO, GUSTAVO R.M. BARCELOS, HELLEN KUASNE, HELOISA LIZOTI CILIÃO, JULIANA MARA SERPELONI, LUCAS M. BENÍCIO, MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA, MARIANA B. DOS REIS, MARILESA F. DE SOUZA, MARESSA C. MALIN, MILENE N. DE OLIVEIRA E PRISCILA YURI OKAMURA.

À equipe de trabalho do Laboratório de Histocompatibilidade do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

À CRISTIANE RABELLO VAZ, do Ambulatório do Instituto do Rim de Londrina pela ajuda e cooperação com os prontuários dos pacientes.

À CLAUDIA BERNADINO e FABIANA RABELO VIEIRA do Instituto do Rim de Londrina pela cooperação com os prontuários dos pacientes e também no agendamento dos pacientes.

À SANDRA LOPEZ e MADALENA PIKINA do Laboratório Clinilab, pela coleta do material sanguíneo dos pacientes.

Às enfermeiras IVONE OSHIRO, MARIA REGINA GASTALDI e SILVANA FOLGATO do Ambulatório do Instituto do Rim de Londrina, pelo auxílio com a coleta do material sanguíneo dos pacientes.

A todos os pacientes, pelo exemplo de luta e conquista da vida e a todos os doadores que realizaram um ato de amor, consentindo na doação de órgãos.

Agradecemos ao Instituto do Rim de Londrina e toda sua equipe por ter nos proporcionado o contato com os pacientes e a coleta de sangue e de dados; à Fundação Araucária de Apoio à Pesquisa Tecnológica do Paraná e ao Ministério da Saúde pelo auxílio concedido (Projeto PPSUS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela concessão de bolsa produtividade a Ilce Mara de Syllos Cólus.

CAMARGO, Rossana Batista de Oliveira Godoy. **Investigação de variantes genéticas nos genes do biometabolismo, de resistência a drogas e do receptor da vitamina D em pacientes transplantados renais.** (Dissertação) Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

No âmbito do transplante renal, o processo de rejeição, apesar de ter apresentado grande melhora devido ao aperfeiçoamento de drogas imunossupressoras, ainda é uma preocupação atual. Deste modo, são essenciais estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo, que aumentem a taxa de sucesso e melhorem a qualidade de vida dos pacientes. Sabe-se que indivíduos que possuem alelos que levam à produção de proteínas alteradas em determinadas funções biológicas, podem responder de forma diferencial ao tratamento medicamentoso, sendo mais suscetíveis aos seus efeitos deletérios. Na tentativa de determinar alterações genéticas que possam estar diretamente envolvidas no processo de rejeição, este estudo buscou identificar polimorfismos do nucleotídeo único (SNPs) em genes do biometabolismo, resistência a drogas e receptor hormonal, com o objetivo de encontrar marcadores genéticos que possam estar relacionados com episódios de rejeição renal em pacientes submetidos a terapia imunossupressora. Um total de 188 pacientes em monitoramento pós transplante renal foram selecionados e avaliados quanto a presença de polimorfismos genéticos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *MDR1*, *GCLC*, *GCLM* e *VDR* por PCR em tempo real (RT-qPCR -ensaios Taqman), PCR multiplex e PCR alelo específica. A análise estatística foi estimada por um modelo de regressão de Poisson. As variantes *G/T* ou *T/T* do gene *CYP3A5* (rs 4646453) foram associadas com uma chance maior de episódios de rejeição nos pacientes renais transplantados, cuja estimativa foi de 1,72 (I.C.95%: 1,04-2,83). O uso da droga imunossupressora tacrolimo associado ao fato de ter recebido o enxerto de doador HLA idêntico são fatores de proteção com RR=0,389 para os episódios de rejeição (I.C.95%: 0,189-0,802). O não uso do imunossupressor tacrolimo aumentou o risco dos episódios de rejeição em 1,81 vezes (I.C.95%: 1,13-2,92) e o não uso de corticóide aumentou o risco dos episódios de rejeição em 5,62 vezes (I.C.95%: 3,4-9,09). O risco para episódios de rejeição quando o paciente apresentou algum evento cardiovascular foi 1,72 vezes maior (I.C.95%: 1,15- 2,75). Não houve correlação entre o risco dos episódios de rejeição e os outros polimorfismos avaliados. Este estudo buscou auxiliar na caracterização da suscetibilidade populacional a episódios de rejeição em transplantados renais, porém, estudos futuros ainda são necessários para a definição de um painel de marcadores genéticos que possam ser úteis para prevenir a rejeição, culminando com a melhora da conduta terapêutica e com a qualidade de vida dos transplantados renais no mundo.

Palavras chave: Imunossupressão. Transplante renal. Polimorfismo genético. Gene *CPY3A5*. Doença cardiovascular. HLA.

CAMARGO, Rossana Batista de Oliveira Godoy. **Investigation of genetic variants in genes of biometabolism, drug resistance and vitamin D receptor in kidney transplant patients.** (Dissertação) Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

As part of kidney transplant, the process of rejection, despite having greatly improved due to the development of immunosuppressant drugs, is still a current concern. Thus, studies are crucial for a better understanding of the mechanisms involved in this process, increasing the success rate and improving the quality of life of patients. It is known that individuals who have alleles that lead to the production of altered proteins in certain biological functions, may respond in a differential way to drug treatment, being more susceptible to the rejection. In an attempt to determine the genetic changes that may be directly involved in the rejection process, this study aimed to identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the genes of biometabolism, drug resistance, and hormone receptors, with the goal of finding genetic panels that may be related to episodes of kidney rejection in patients undergoing immunosuppressive therapy. A total of 188 patients in monitoring after renal transplantation were selected and evaluated for genetic polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *MDR1*, *GCLC*, *GCLM* and *VDR* genes by RT-qPCR (Taqman assays), multiplex PCR and allele specific PCR. Statistical analysis was estimated by a regression model of Poisson. The variants *G/T* or *T/T* of the gene *CYP3A5* (rs 4646453) were associated with an increased risk of rejection episodes in renal transplantation patients, whose estimative was 1.72 (I.C.95%: 1.04-2.83). The use of immunosuppressive drug tacrolimo and have received the graft of identical HLA donor, when associated, were protective factors with relative risk (RR) of 0.389 for incident of rejection (I.C.95%: 0.189-0.802). The non use of immunosuppressive drug tacrolimo increased the risk of rejection episodes in 1.91 fold (I.C.95%: 1.13-2.92), the non use of corticoids increased the risk of rejection episodes in 5.62 folds (I.C.95%: 3.4-9.09). The risk on rejection episodes in patients presenting any cardiovascular event was 1.72 fold higher (I.C.95%: 1,15- 2,75). There was no correlation between the risk of rejection episodes and the other polymorphisms evaluated. This study tried to help in the characterization of populational susceptibility to the rejection episodes process in renal transplantation individuals, however future studies will be necessary for the definition of a panel of genetic markers that may be useful to prevent rejection leading to the improved therapeutic and quality of life of renal transplant patients worldwide.

Keywords: Immunosuppression. Kidney transplant. Genetic polymorphism. *CPY3A5* gene. Cardiovascular disease. HLA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ensaio de genotipagem usando sondas Taqman (Manual da *Applied Biosystem*)..... 34
- Figura 2** – Padrão de bandas da variante polimórfica rs1048943 do gene *CYP1A1*..... 35
- Figura 3**– Padrão de bandas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (*CYP1A1*: controle interno)..... 35

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Sequência de DNA contendo a transição estudada, SNP ID, tipo de mutação e ensaio utilizado | 42 |
| Tabela 2 – Características clínico epidemiológicas dos pacientes renais transplantados e relação com o uso de imunossupressores | 44 |
| Tabela 3 – Distribuição dos pacientes com episódios de rejeição (n=59), de acordo com as variáveis clínico-epidemiológicas; valores de p, risco relativo e intervalos de confiança a 95% obtidos da análise estatística | 45 |
| Tabela 4 – Distribuição dos pacientes com episódios de rejeição de acordo com a presença dos genótipos, valor de p, Risco Relativo e Intervalo de Confiança a 95% | 46 |
| Tabela 5 – Distribuição dos pacientes com episódios de rejeição de acordo com o imunossupressor recebido, valores de p, Risco relativo e Intervalo de confiança a 95%..... | 47 |
| Tabela 6 – Resultado da regressão de Poisson para o desfecho episódios de rejeição em função dos fatores estatisticamente significativos..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|--|
| ABCB1 (MDR1) | Resistência a Múltiplas Drogas |
| CSA | Ciclosporina |
| CYP 450 | Citocromo P450 |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| GSTT1 | Glutathione S-Transferase T1 |
| GSTM1 | Glutathione S-Transferase M1 |
| GCLM | Glutamato-cisteína ligase, subunidade modificada |
| GCLC | Glutamato-cisteína ligase, subunidade catalítica |
| HLA | Antígeno Leucocitário Humano |
| IC | Intervalo de Confiança |
| MMF | Micofenolato de Mofetil |
| mTOR | Alvo da rapamicina em mamíferos |
| OR | Razão de chance (Odds Ratio) |
| OKT3 | Anticorpo monoclonal específico anti-CD3 |
| PAH | Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial hidrogênio iônico |
| RR | Risco Relativo |
| SNP | Polimorfismo de Nucleotídeo Único |
| UGT2B7 | Uridina glucuronosiltransferase 2B7 |
| VDR | Receptor Vitamina D |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 TRANSPLANTE RENAL | 13 |
| 1.2 RESPOSTA IMUNE E IMUNOSSUPRESSÃO | 14 |
| 1.3 GENES DO BIOMETABOLISMO DE DROGAS | 17 |
| 1.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS | 20 |
| 2 OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 29 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3 METODOLOGIA | 30 |
| 3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO | 30 |
| 3.1.1 Casuística | 30 |
| 3.2 ANÁLISE DAS VARIANTES ALÉLICAS POLIMÓRFICAS | 30 |
| 3.2.1 Extrações de DNA Genômico..... | 30 |
| 3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 31 |
| 3.2.3 Detecção e Quantificação de Ácidos Nucléicos por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) – Ensaio Taqman | 32 |
| 3.2.4 Análise Estatística dos Dados | 36 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO (ARTIGO) | 37 |
| RESUMO..... | 38 |
| INTRODUÇÃO | 39 |
| METODOLOGIA | 41 |
| RESULTADOS | 43 |
| DISCUSSÃO | 48 |
| REFERÊNCIAS..... | 55 |
| 5 AGRADECIMENTOS | 60 |
| REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO | 61 |
| APÊNDICES | 69 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSPLANTE RENAL

O transplante renal entrou para a história da humanidade devido aos avanços na medicina e à contribuição de vários pesquisadores. Tullius (2013), em um artigo especial dedicado ao médico cirurgião Joseph E. Murray, o considera mais do que um cirurgião pioneiro na área do transplante renal, devido ao fato dele ter tido, ao longo de sua vida, uma curiosidade científica e ter conduzido seu trabalho com uma abordagem humanitária. Atualmente o transplante renal constitui uma das terapias de substituição aplicadas no tratamento de pacientes com doença renal crônica e oferece uma melhor qualidade de vida quando comparada à hemodiálise (Chapman, 2011).

O diagnóstico da doença renal é estabelecido por parâmetros clínicos e laboratoriais. Os métodos mais comumente utilizados para estimar a função renal incluem a determinação do nível da creatinina sérica, da depuração da creatinina e da uréia e equações que estimam a função renal baseadas na concentração sérica e urinária da creatinina e da uréia, respectivamente (Vella e Brennan, 2011). A indicação de diálise ou transplante para os pacientes com insuficiência renal crônica geralmente se faz quando a estimativa da taxa de filtração glomerular estiver abaixo de 8 mL/minuto (Ramos e Brennan, 2012).

No Brasil, foram realizados 3.851 transplantes renais pelo SUS no ano de 2010 e 4.430 em 2011, sem considerar os transplantes duplos de pâncreas e rim. Estimava-se que 5.236 transplantes de rim seriam realizados pelo SUS até o final de 2012 (DATASUS- Ministério da Saúde - 2012).

Os pacientes submetidos a transplante fazem o uso de terapia imunossupressora, obedecendo ao protocolo de tratamento que consta no Regulamento Técnico Vigente do Sistema Nacional de Transplantes. Este protocolo visa o estabelecimento do estado de imunossupressão, que se refere ao tratamento utilizado no momento do transplante ou imediatamente antes deste. O estabelecimento do estado de imunossupressão (Peri-transplante) pode ser obtido por meio da terapia de indução (com anticorpos policlonais ou monoclonais) ou pelo uso dos imunossupressores convencionais. Já a terapia de manutenção, que se refere ao esquema do imunossupressor utilizado posteriormente ao transplante, é utilizada para prevenir o desenvolvimento da rejeição aguda e crônica do enxerto (DATASUS- Ministério da Saúde - (2012)).

Anteriormente ao transplante renal, o paciente deve estar ciente dos riscos da perda do enxerto e das complicações pós-transplante decorrentes do uso inadequado, insuficiente ou não supervisionado dos medicamentos imunossupressores. Exames clínicos, laboratoriais, de imagens e outros, são realizados nos pacientes transplantados de acordo com o protocolo de cada serviço e, segundo a necessidade de cada caso, para o monitoramento das possíveis rejeições (Wilkinson, 2010).

1.2 RESPOSTA IMUNE E IMUNOSSUPRESSÃO

O conhecimento da resposta imune tem um papel fundamental na história dos transplantes, seja de órgãos sólidos ou de tecidos. A importância central do sistema imunológico nos transplantes é bem descrita quanto à compatibilidade HLA (*Human Leukocyte Antigen*) do receptor e de seu doador (Dausset e Svejgaard, 1997).

Os testes laboratoriais no pré transplante permitem a melhor escolha do par doador-receptor para o sucesso do mesmo. Através da tipificação HLA do receptor e seu doador, há a probabilidade de se encontrar HLA idênticos, haploidênticos e HLA distintos. Este teste deve ser acompanhado de testes de histocompatibilidade, como a prova cruzada, que deverão contraindicar ou liberar o transplante, pois permitem identificar anticorpos presentes no soro do receptor, objetivando, com esses critérios seletivos, o sucesso pleno do transplante realizado (Terasaki e McClelland, 1964).

A resposta imune ao enxerto compreende uma primeira fase em que acontece a sensibilização do receptor aos antígenos externos e uma fase subsequente, quando se verifica uma resposta agressiva ao enxerto por meio dos vários mecanismos efetores (Sabatine e Aunchincloss, 1966).

A rejeição hiper aguda ocorre quando o receptor apresenta anticorpos dirigidos contra o antígeno do doador transplantado, manifesta-se nas primeiras 24hs do pós transplante ou mesmo durante a cirurgia, causando a perda rápida e irreversível do órgão transplantado (Wilkinson, 2010). Com o advento de novos imunossupressores e dos testes de histocompatibilidade com os quais podemos detectar os anticorpos presentes no soro do receptor, este tipo de rejeição é praticamente nula. O teste da microlinfotoxicidade foi desenvolvido por Terasaki e McClelland em 1964 e após sua padronização internacional, é aplicado até hoje (Terasaki e McClelland, 1964; Ceka *et al.*, 2010).

A rejeição aguda ocorre dentro das primeiras semanas do transplante, podendo acontecer a qualquer momento no curso do pós transplante e sendo mais comum nos

três primeiros meses. As rejeições agudas são, predominantemente mediadas pela via direta, explicada pela grande quantidade de células passageiras apresentadoras de antígenos presentes na fase inicial do transplante, particularmente células dendríticas, as quais são capazes de provocar os sinais co estimulatórios para a ativação de células T (Halloran, 2004). É o tipo mais comum de rejeição precoce.

A rejeição crônica ocorre ao longo da evolução do transplante, levando à perda funcional lenta e progressiva do rim transplantado (Terasaki, Lachmann *et al.*, 2006). Os imunossuppressores administrados sozinhos ou combinados possibilitam, para a maioria dos pacientes, a prevenção da rejeição do órgão (Danovitch, 2010).

A imunossupressão clínica foi iniciada no começo dos anos 50 com o uso de glicocorticóides associados à azatioprina e globulinas antilinfocitárias, que permaneceram como as principais drogas imunossupressoras até o começo dos anos 80. Em 1972 foi descoberto o imunossupressor ciclosporina (CSA) e, de acordo com Borel (1977), a acentuada atividade imunossupressora da ciclosporina foi comprovada em muitos modelos experimentais, tanto para imunidade humoral como celular, em diversas espécies animais. A seguir, em 1980, a CSA foi utilizada no primeiro transplante e passou a ser comercializada a partir de 1983 e, sem dúvida, foi um dos principais adventos da história da transplantação humana. A partir dos anos 90, agentes químicos como o tacrolimo e o micofenolato de mofetil passaram a ser utilizados como imunossuppressores (Danovitch, 2010).

A utilização de diferentes combinações de drogas imunossupressoras propiciou a obtenção de taxas de rejeição cada vez menores. Como consequência, a importância da segurança e da tolerabilidade das drogas imunossupressoras se tornou assunto cada vez mais discutido, especialmente com relação à preservação da função do enxerto e redução dos fatores de risco cardiovascular, associados com a sobrevida do enxerto e do paciente (Kaplan e Meier-Kriesche, 2004).

As drogas imunossupressoras podem ser subdivididas em grupos, conforme suas características estruturais (biológica e química), de acordo com os locais de ação (na membrana celular, no citoplasma, no núcleo) ou conforme sua ação molecular (bloqueio da síntese ou ação de citocinas e bloqueio da síntese de nucleotídeos (Danovitch, 2010).

Os imunossuppressores mais utilizados no pós transplante renal são os inibidores da calcineurina, sendo eles, a ciclosporina e/ou tacrolimo, e os inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), sirolimo e/ou everolimo, micofenolato de mofetil e azatioprina, os quais apresentam características farmacocinéticas variáveis (Halloran, 2004).

Os inibidores da calcineurina impedem a formação de anticorpos deletérios ao enxerto, pois atuam junto às imunofilinas. Estas constituem uma família de proteínas de ligação com fármacos imunossupressores, mediando, assim, sua ação. Ao ligar-se aos seus receptores de proteínas intracelulares, as imunofilinas bloqueiam seletivamente a ativação transcricional de genes relacionados com a defesa através das células T, via transdução de sinal (O'keefe, Tamura *et al.*, 1992).

Outro mecanismo é a inibição de mTOR (*mammalian target of rapamicin*), em que imunossupressores como o sirolimo ligam-se à imunofilina FKBP12 formando um complexo biologicamente ativo que inibe a atividade enzimática da mTOR. Esta enzima controla a atividade enzimática de diversas proteínas envolvidas na transdução de sinais de ativação e proliferação derivados de receptores de membrana de linfócitos, principalmente de Il-2 e dos receptores de co-estimulação linfocitário CD-28, inibindo, por fim, a proliferação celular (O'keefe, Tamura *et al.*, 1992).

As drogas imunossupressoras podem causar toxicidade, algumas com maior e outras com menor grau de nefrotoxicidade, o que está diretamente relacionado com sua metabolização (Ware, 2012). Desta forma, faz-se necessário um monitoramento terapêutico das drogas imunossupressoras dos pacientes renais transplantados. Este monitoramento é realizado pelo médico responsável, que controla e acompanha o paciente com o auxílio de exames clínicos e laboratoriais.

No Instituto do Rim de Londrina (PR), após a alta hospitalar, os pacientes normalmente são acompanhados três vezes por semana em ambulatório para seguimento clínico, avaliação da função renal e ajuste da medicação imunossupressora. As consultas tornam-se gradativamente menos frequentes e, nos casos de evolução sem complicações, passam a ser realizadas a cada dois ou três meses ao final de um ano (Mocelin, 1996).

Em alguns casos podem ocorrer efeitos colaterais específicos para cada uma das drogas administradas, como por exemplo, a nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina e pelo tacrolimo. Em 1983, desde que foi introduzida na prática clínica, a ciclosporina tornou-se a principal droga imunossupressora utilizada nos transplantados. Vários estudos comprovam a sua eficiência na sobrevivência do enxerto. Contudo, seu manejo, em relação a outros imunossupressores é um dos mais difíceis, devido à sua estreita margem terapêutica e às variações interindividuais em sua absorção e metabolismo (Ware, 2012).

O imunossupressor micofenolato de mofetil é uma das principais opções em transplantes de órgãos sólidos. Seu principal metabólito é o glucoronídeo fenólico, que é excretado pela urina. Porém, é observada na literatura a ocorrência de resultados conflitantes

em relação às doses deste imunossupressor no plasma do receptor renal, revelando uma grande variabilidade entre os pacientes. Uma possível explicação para esta variabilidade encontrada é a diferença interindividual de cada paciente, seja para a função hepática, renal, níveis séricos de albumina, hemoglobina, massa corporal, exposição concomitante a medicamentos e polimorfismos genéticos em enzimas responsáveis pelo metabolismo e transporte de drogas (Barraclough, Staatz *et al.*, 2009).

1.3 GENES DO BIOMETABOLISMO DE DROGAS

A maioria dos fármacos possui caráter lipofílico e, em pH fisiológico, permanecem não ionizados ou parcialmente ionizados. Devido a estas características, os mesmos tenderiam a permanecer no organismo, já que seriam reabsorvidos nos rins após a filtração glomerular. Visando eliminar estas substâncias exógenas, o organismo pode lançar mão de sistemas enzimáticos utilizados normalmente para a degradação de substâncias endógenas. Deste modo, a biotransformação é a transformação enzimática dos fármacos em metabólitos com características mais hidrofílicas, tendo como objetivo facilitar a excreção pelo organismo (Hatagima, 2002; Nebert e Russell, 2002; Ferreira e Rocha, 2004).

O órgão onde ocorre a maioria das reações de biotransformação é o fígado, por apresentar várias enzimas ou complexos enzimáticos especializados (Xu, Li *et al.*, 2005). Essas enzimas de biotransformação desempenham um importante papel no metabolismo de xenobióticos (compostos exógenos não comuns ao organismo). Há uma ampla variabilidade interindividual nos níveis de atividade dessas enzimas e o exemplo disso pode ser observado tanto em exposições terapêuticas, ocupacionais, e até mesmo através da dieta alimentar. Entre as enzimas de biotransformação destacam-se as mono-oxigenases do complexo enzimático CYP, as redutases e as transferases (Xu, Li *et al.*, 2005).

A biotransformação dos fármacos pode ser dividida em duas fases. A fase I consiste nas reações de oxidação, redução e hidrólise, ocasionando sempre uma modificação estrutural do fármaco, o que, na maioria das vezes pode levar à sua inativação. No caso de administração de pró-fármacos, a fase I vai ser fundamental para gerar a substância farmacologicamente ativa. Na fase II, conhecida como fase de conjugação, ocorrem reações de conjugação do fármaco com substâncias endógenas, visando facilitar sua excreção. Os processos das fases I e II são independentes, ou seja, o fármaco pode sofrer apenas reações de fase I ou de fase II, ou as duas, sequencialmente. Geralmente as reações de fase I introduzem na molécula um grupo relativamente reativo, como o grupo hidroxila, e este grupo funcional

servirá, então, como alvo para o sistema conjugado, que fixará a ele um substituto maior, como um grupo glicuronil, sulfato ou acetil (Lu, 1998; Gattás e Soares-Vieira, 2000; Nebert e Russell, 2002).

As enzimas de fase I, complexo CYP450, constituem uma superfamília de heme-enzimas (com um grupo prostético heme, ou grupo ferro-porfirina) que ocorrem em praticamente todos os organismos vivos, das bactérias aos mamíferos (o nome é originado do característico pico de absorção espectral em 450 nm quando reagido em seu estado FeII com o Co). As enzimas mono-oxigenases catalizam reações nas quais um átomo de oxigênio da molécula de O₂ é incorporado na molécula do substrato orgânico e o outro átomo é reduzido a H₂O. São as principais enzimas responsáveis pela biotransformação de fármacos no organismo humano, estando presentes, principalmente, no retículo endoplasmático agranular (fração microssômica) dos hepatócitos, podendo também ser encontradas em outros órgãos, como pulmões e rins (Lamba, Lin *et al.*, 2002; Nebert e Russell, 2002).

Um dos aspectos interessantes das enzimas do complexo do CYP450 é que, além de poder catalisar várias reações de oxidação (hidroxilação, desalquilação, epoxidação, oxigenação de heteroátomos), elas também podem biotransformar um grande número de xenobióticos de caráter lipofílico. Os xenobióticos são então convertidos em formas mais solúveis, o que ajuda na sua excreção pelos rins. Além disso, os grupos hidroxilas gerados são, algumas vezes, conjugados enzimaticamente (ligados covalentemente) a substâncias polares, como o ácido glucurônico, glicina, sulfato e acetato, que aumentam mais ainda a solubilidade (Nelson, Koymans *et al.*, 1996; Lu, 1998; Confort-Froes, 2004).

Os seres humanos expressam várias isoformas (enzimas de um mesmo organismo que são estrutural e cataliticamente similares, mas geneticamente distintas) de CYP450. Estas catalizam o mesmo tipo de reação, apresentando afinidade por substratos diferentes e biotransformando-os, portanto, em fármacos distintos. Além disso, as isoformas diferem na sua distribuição pelo organismo e na regulação de sua atividade, apresentando diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores. Estes últimos são utilizados para a determinação da atividade de cada isoforma e, por isso, são também substratos das mesmas (Confort-Froes, 2004).

Cada isoforma possui atividade catalítica para um amplo espectro de substratos. A capacidade em biotransformar múltiplos substratos é responsável por um grande número de interações medicamentosas associadas com a inibição destes. A inibição da biotransformação de fármacos por competição por uma mesma enzima pode elevar a

concentração plasmática de algumas drogas e levar a sintomas clínicos importantes (Cheung, 2008).

As isoformas identificadas em seres humanos são classificadas de acordo com as convenções da biologia molecular e identificadas por um número arábico indicando a família (membros de uma mesma família são os que apresentam mais de 40% de aminoácidos idênticos), seguido de uma letra maiúscula, que indica a subfamília (55% de aminoácidos idênticos) e outro número representando o gene na subfamília, por exemplo: CYP1A2. As enzimas CYP envolvidas na biotransformação de drogas em seres humanos pertencem às famílias 1, 2, 3 e 4 (Nelson, Koymans *et al.*, 1996).

Aproximadamente 70% das enzimas hepáticas são constituídas pelas isoformas CYP1A2, CYP2A6, CYP3A, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6 e CYP2E1. Entre estes, CYP3A (CYP3A4 e CYP3A5) e CYP2C (principalmente CYP2C9 e 2C19) são as subfamílias mais abundantes (Lin e Lu, 1998).

De acordo com a atividade enzimática de cada isoforma, pode-se dividir a população em dois grupos distintos: os metabolizadores extensivos e os metabolizadores pobres. Os primeiros possuem a isoforma com atividade normal, não apresentando problemas para biotransformar os fármacos. Os metabolizadores pobres têm a atividade da isoforma diminuída ou nula, podendo levar a diferenças significativas na posologia de alguns fármacos.

Além da atividade enzimática do sistema CYP450 (Fase I), há também a atividade enzimática da Fase II da metabolização hepática, com destaque para as enzimas Glutathionas S-transferases (GSTs), N-acetiltransferases (NATs), Glucuronil transferases (UGTs), entre outras. A redução na atividade enzimática dessas enzimas leva, conseqüentemente, à diminuição da detoxificação dos agentes metabólitos e ao aumento da exposição à droga.

As GSTs são enzimas de Fase II do biometabolismo, que detoxificam vários agentes quimioterápicos e/ou seus metabólitos por sua conjugação com a glutathiona. As GSTs envolvidas na detoxificação incluem GSTT1, GSTM1, GSTP1 e GSTA1 (Hayes, Flanagan *et al.*, 2005). A classe μ inclui pelo menos cinco genes que codificam igual número de enzimas: *GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4* e *M5*.

As enzimas UGTs constituem uma super família de várias isoenzimas associadas à membrana do retículo endoplasmático das células hepáticas e de outros tecidos, tais como intestino delgado, colon, pele, cérebro, baço e mucosa nasal. A localização microsomal confere-lhes o acesso direto aos produtos formados pela ação das enzimas do sistema CYP450, na Fase I da biotransformação hepática (Kiang, Ensom *et al.*, 2005).

A glucuronidação é uma das principais vias da biotransformação de xenobióticos em todos os mamíferos. Esta reação requer como co-substrato o UDP-ácido glucurônico e é catalizada pelas enzimas UGTs (Zhang, Tolonen *et al.*, 2011). No homem foram identificadas diversas UGTs, divididas em duas famílias (UGT1 e UGT2) e três subfamílias (UGT1A, UGT2A e UGT2B), responsáveis pela glucuronidação de pelo menos 35% dos fármacos sujeitos à Fase II da metabolização hepática. São igualmente suscetíveis à inibição e/ou indução por diversos fármacos, com a consequente alteração das interações farmacocinéticas (Zhang, Tolonen *et al.*, 2011).

A natureza dos grupos funcionais presentes nas moléculas é o principal determinante do destino metabólico do composto e, no caso da glucuronidação, os compostos mais suscetíveis a esta reação são os que contêm os grupos –OH, –COOH, –NH₂, –NH e –SH. Além dos diversos xenobióticos e metabólitos oriundos da Fase I da metabolização hepática, são também substratos para a glucuronidação vários compostos endógenos como a bilirrubina, o estradiol 17 beta, a progesterona, a testosterona, o cortisol e a tiroxina (Zhang, Tolonen *et al.*, 2011).

Muitas das enzimas presentes nos seres humanos, como citocromos P450, GSTs, N-acetiltransferases e Glucuronil transferases, além de serem constituídas por isoformas, também são polimórficas, isto é, existem diversas variantes para os genes que codificam essas enzimas na população (Weinshilboun, 2003; Confort-Froes, 2004).

1.4 POLIMORFISMO GENÉTICO

O impacto da variabilidade genética no metabolismo enzimático de drogas é conhecido há mais de cem anos. Com o estudo do material genético, na década de 1950, surgiu a genética bioquímica humana, com o objetivo de explicar a variabilidade genética na resposta a drogas. A partir de então, se desenvolveu a farmacogenética, que visa avaliar o efeito dessas alterações genéticas na resposta individual aos medicamentos. Na década de 1990, com o desenvolvimento do projeto genoma humano, foi possível a identificação de diversas alterações genéticas que, em conjunto, podem explicar o efeito de drogas no organismo. Surgiu assim, a farmacogenômica, que tem sido aplicada na oncologia para identificar SNPs presentes nas regiões promotoras ou codificadoras de genes que codificam proteínas relacionadas com o metabolismo e/ou o transporte de drogas e que correlacionam com uma melhor ou pior resposta ao tratamento, e para determinar mutações ou perfis de

expressão gênica de tumores capazes de indicar uma resposta pior ou melhor ao tratamento (Parmigiani e Camargo, 2004).

Estima-se que, entre 25% e 95% da variação interindividual na resposta a drogas ocorra pela presença de polimorfismos genéticos (Confort-Froes, 2010).

Considera-se um polimorfismo uma alteração genética na qual o alelo raro está presente em mais de 1% da população. Seres humanos têm 99,5% de semelhança no seu genoma e um polimorfismo ocorre a cada 500 a 2000 nucleotídeos. Há vários tipos de polimorfismos e os mais estudados são SNP, (*single nucleotide polymorphism*), que representam a mudança de um nucleotídeo na sequência que compõe um gene (Sachidanandam, Weissman *et al.*, 2001; Confort-Froes, 2004; Ferreira e Rocha, 2004). Em 2008, foi determinada a existência de 12 milhões de SNPs no genoma humano, além de grande quantidade de outros tipos de variações genéticas (Brockmüller e Tzvetkov, 2008). Dentre estes SNPs, pelo menos 500 mil ocorrem em genes estruturais, sendo que entre um e dez mil apresentam importância na área médica (Confort-Froes, 2010). As outras variações podem ser as deleções, ou seja, a ausência de um gene ou de parte de um gene; as inserções, que são a adição de um nucleotídeo extra (ou mais) na sequência de um gene; as repetições, que são cópias extras de sequências de nucleotídeos dentro dos genes, e as duplicações e ampliações, que representam duas ou mais cópias de um mesmo gene (Sachidanandam, Weissman *et al.*, 2001).

Os polimorfismos podem ocorrer tanto nas regiões do DNA que serão transcritas em RNA mensageiro e que poderão levar à produção de uma proteína, como também em regiões não-transcritas do gene, mas que podem regular o processo de transcrição. Os polimorfismos nas regiões codificadoras podem ser sinônimos ou não sinônimos. Os sinônimos ocorrem se a substituição dos pares de base dentro de um códon não alterar o aminoácido codificado e os não-sinônimos ocorrem se a substituição do par de bases resultar na substituição de um aminoácido. Quando não sinônimos, os polimorfismos podem ser funcionalmente relevantes por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro ou a tradução de proteínas (Confort-Froes, 2010).

Os mecanismos moleculares que causam os polimorfismos genéticos podem ocorrer por (1) ausência completa de codificação do gene para a enzima; (2) perda ou diminuição da expressão do gene, em razão da presença de mutações na região reguladora; (3) presença de mutações nos limites entre o éxon e íntron do gene, de maneira a promover um *splicing* incorreto do pré-RNA mensageiro; (4) mutação na sequência de aminoácidos não

críticos, causando mudança na atividade enzimática ou mutação em aminoácidos críticos, originando uma enzima inativa (Confort-Froes, 2010).

Polimorfismos em enzimas de biotransformação resultam em diferenças entre as taxas de metabolismo de certas drogas entre os indivíduos. Por exemplo, nos casos em que uma variante de um citocromo P450 possui atividade reduzida ou nula, doses consideradas padrão de uma droga, e que a enzima normalmente metaboliza, poderão fazer a biodisponibilidade da droga alcançar níveis tóxicos (Parkinson, 2001). De modo oposto, se uma variante de citocromo P450 possui atividade aumentada, doses maiores da droga deverão ser administradas para alcançar os efeitos terapêuticos desejados (Phillips e Van Bebber, 2005). Entretanto, se a droga é metabolizada em um produto tóxico, isso poderá resultar em uma reação adversa. Diversas variantes de citocromo P450 conhecidas possuem suas especificidades de substratos alteradas e, assim, produzem metabólitos diferenciados, que também podem causar efeitos colaterais deletérios (Parkinson, 2001; Obligation, Murray *et al.*, 2006; Roy, Barama *et al.*, 2006).

Alelos que causam diminuição, aumento, alteração qualitativa do metabolismo de drogas têm sido descritos para muitas enzimas desses complexos. As distribuições desses alelos diferem bastante entre os grupos étnicos e, assim, provavelmente surgiram para permitir que cada grupo se adaptasse às toxinas particulares de seus hábitos diários (dieta, exposição ambiental, terapêutica, etc) (McLeod e Evans, 2001).

Uma avaliação do mecanismo de “clearance” metabólico de 315 drogas diferentes revelou que 56% são eliminadas primariamente por meio de várias isoformas de CYPs; CYP3A4 foi a mais importante (50%), seguida por CYP2D6 (20%), CYP2C9 e CYP2C19 (15%) e o restante era biotransformado por CYP2E1, CYP1A2, CYP2A6 entre outras, de modo que pode-se estimar que 90% das reações de oxidação das drogas em seres humanos podem ser atribuídas a estas sete enzimas principais. O conceito de que a maioria das oxidações de drogas é catalizada por um pequeno número de enzimas é importante na prevenção e identificação das possíveis interações medicamentosas envolvendo a biotransformação dos fármacos (Bertz e Granneman, 1997).

O gene *CYP1A1* está mapeado em 15q22-24 (Hildebrand, Stallings *et al.*, 1985) e consiste em 7 éxons e 6 íntrons (Evans, 1993). O gene é induzido por substâncias como a dioxina e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). O produto deste gene é o hidrocarboneto de aril hidrolase, responsável pela oxidação de PAHs em produtos fenólicos e epóxidos. Polimorfismos no domínio catalítico ou nos reguladores do gene *CYP1A1*, têm se

mostrado importantes biomarcadores por estarem envolvidos na indução do mesmo (Daly, Cholerton *et al.*, 1993; Pavanello e Clonfero, 2000).

Foram descritos 15 polimorfismos de nucleotídeos únicos em *CYP1A1* que caracterizam as variantes alélicas: *1A, *1B, *1C, *2A, *2B, *2C, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11. Um dos polimorfismos bastante estudado é originado de uma mutação de ponto (A 4889 →G) no exon 7 do gene *CYP1A1* (Hayashi, Watanabe *et al.*, 1991). Tal mutação leva à substituição do aminoácido isoleucina (Ile) por valina (Val) no resíduo 462, resultando em dois genótipos homozigotos (A/A e G/G) e um heterozigoto (A/G). A presença do genótipo raro (G/G) confere um aumento de pelo menos três vezes na atividade catalítica da enzima (Pavanello e Clonfero, 2000; Coughlin e Hall, 2002). Existem evidências convincentes de que uma atividade aumentada de CYP1A1 pode levar à toxicidade, o que pode ser exemplificado por meio do metabolismo do benzo(a)pireno (Brooks, Gooderham *et al.*, 1999).

O gene *CYP3A4* humano consiste de 13 éxons e localiza-se em 7q21.1 (Inoue, Inazawa *et al.*, 1992). Este gene está presente predominantemente no tecido hepático e sua expressão é controlada pela transcrição de fatores como receptor de pregnolona, receptor de xenobióticos e glicocorticóides (Ogg, Williams *et al.*, 1999). A enzima CYP3A4 metaboliza mais de 50% das drogas usadas clinicamente, entre elas, Triazolam, Midazolam, Rifampicina, e Ciclosporina (Coughlin e Hall, 2002), além de participar da oxidação de alguns esteróides, como a testosterona, lipídios e carcinógenos, como os pesticidas organofosforados (Nelson, Koymans *et al.*, 1996). Já foram identificados mais de 39 SNPs neste gene (Gao, Zhang *et al.*, 2008).

Um dos polimorfismos mais estudados no gene *CYP3A4* é a presença da variante alélica *CYP3A4*1B*, uma transição adenina-guanina (A→G) na região promotora 5'(5'PR) (posição -290), localizada na sequência conhecida como elemento específico da nifedipina. A presença desta variante está associada com a diminuição da expressão ou da atividade da enzima CYP3A4. Uma alta variabilidade na frequência deste polimorfismo é observada entre os diferentes grupos étnicos (Coughlin e Hall, 2002). A frequência é maior em indivíduos negros (60%) do que em caucasianos (40%). É interessante dizer que o alelo raro não foi encontrado em chineses e japoneses (Ball, Scatina *et al.*, 1999; Sata, Sapone *et al.*, 2000).

CYP3A4 e CYP3A5 são as principais isoenzimas responsáveis pelo metabolismo hepático da ciclosporina (Tedesco e Haragsim, 2012). Um estudo de genotipagem do gene *CYP3A5* de pacientes renais transplantados sugeriu que a presença dos alelos *CYP3A5*3* requerer baixas doses de inibidores da calcineurina para se atingir a

concentração ideal da dose desejada. Os autores também sugerem uma nefrotoxicidade causada pelo imunossupressor tacrolimo quando associado com os genótipos *CYP3A4*1* e *CYP3A5*1* e *CYP3A4*1B* e *CYP3A5*1* (Kuypers, De Jonge *et al.*, 2007).

Zhu *et al.* (2012) afirmaram que as enzimas CYP3A4 e CYP3A5 são as principais responsáveis pela biotransformação do imunossupressor tacrolimo; logo, a presença de polimorfismos nestes genes merece certa atenção, pois a atividade enzimática dependerá dos genótipos dos pacientes renais transplantados que fazem uso deste inibidor da calcineurina (Roy, Barama *et al.*, 2006).

Vicari-Christensen *et al.* (2009) descreveram as concentrações de doses medicamentosas em relação aos genótipos do gene *CYP3A5* de pacientes renais transplantados, corroborando estudos anteriores que indicam uma terapia imunossupressora individualizada, que minimize as reações adversas dos imunossupressores.

As GSTs constituem importante parte do processo do sistema de detoxificação celular, por catalizarem a reação de conjugação do glutatião (GSH) com diferentes espécies de compostos eletrofilicos, tornando-os mais facilmente excretáveis. Provavelmente esse sistema evoluiu para proteger as células contra os metabólitos reativos (Confort-Froes, 2010) e polimorfismo em quaisquer dos genes das GSTs produz alterações significativas no metabolismo de drogas (Singh, Manchanda *et al.*, 2009).

Deleções polimórficas nos genes que codificam as GSTs, como por exemplo, *GSTT1* e *GSTM1* são bastante comuns na população em geral (Cotton, Sharp *et al.*, 2000; Gattás, Kato *et al.*, 2004).

O gene *GSTM1* está mapeado em 1p13.3, é polimórfico na população humana, apresentando quatro variantes *GSTM1*A*, *GSTM1*B*, *GSTM1*C* e *GSTM1*0*. Os dois primeiros não têm, aparentemente, diferenças com relação ao tipo de substrato, e o alelo *C é muito raro. A variante *0 (alelo nulo) causa perda da atividade da enzima na forma homocigota, que está associada com redução da eficiência da ligação a substratos genotóxicos, incluindo epóxidos derivados de PAHs e aflatoxinas (Hayes e Pulford, 1995; Gattás, Kato *et al.*, 2004).

A frequência do genótipo nulo (*GSTM1*0*) varia significativamente em diferentes populações, dependendo do grupo étnico a que ele pertence (Board, Coggan *et al.*, 1990). Widersten *et al.* (1991) relataram diferentes frequências para este genótipo: 58% em chineses, 52% em ingleses, 48% em japoneses, 43% em franceses e um valor significativamente menor em nigerianos (22%).

Outros estudos relataram que a ausência do gene *GSTMI* ocorre em 23 a 48% em populações africanas, 33 a 63% em populações asiáticas, 51 a 54% na população australiana (Cotton, Sharp *et al.*, 2000), 41,7% na população norte-americana (Seidegård, Pero *et al.*, 1990) e 55% na população brasileira (Arruda, Grignolli *et al.*, 1998). Especificamente no norte do Paraná, 48,86% da população apresentou genótipo *GSTMI* nulo, sendo 47,88% em caucasianos (Losi-Guembarovski, D'Arce *et al.*, 2002).

Do mesmo modo que o gene *GSTMI*, o gene *GSTT1*, com um tamanho de 8,1 kb e mapeado em 22q11.2, se apresenta polimórfico por deleção (alelo selvagem normal *GSTT1*1*, alelo nulo *GSTT1*O*). Esta consiste na deleção total ou parcial do gene, resultando na perda de atividade da enzima GSTT1 (Rossit, Cabral *et al.*, 1999). Este gene é expresso nas células do fígado, pulmão, rins, cérebro, músculo esquelético, coração, intestino, baço e próstata (Pavanello e Clonfero, 2000).

As frequências do genótipo nulo descritas na literatura são menores do que as descritas para o gene *GSTMI*. Há indicações de que a única exceção ocorra em asiáticos, que apresentam uma frequência do genótipo *GSTT1*-nulo variando de 46 a 58% em chineses e de 42 a 46% em coreanos (Geisler e Olshan, 2001).

Em uma amostra da população brasileira, as frequências descritas foram de 26,3% em negros, 22,3% em brancos e 17,2% em mulatos (Gattás, Kato *et al.*, 2004). Outro estudo mostrou uma frequência de, respectivamente, 18,5% e 19% em indivíduos brancos descendentes de caucasianos e em africanos (Arruda, Grignolli *et al.*, 1998). As consequências biológicas do genótipo *GSTT1* nulo são difíceis de prever, uma vez que a enzima apresenta propriedades tanto de detoxificação quanto de ativação de muitos poluentes ambientais (Hayes e Pulford, 1995).

O gene *GSTP1*, localizado em 11q13, codifica a isoenzima P1, que está envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de alguns PAHs, apresentando maior concentração nos pulmões, esôfago e placenta (Moscow, Townsend *et al.*, 1988). Board *et al.* (1990) descreveram três diferentes alelos para *GSTP1*, sendo estes denominados *GSTP1a* (ou *GSTP1*A*), que é o alelo selvagem, *GSTP1b* (*GSTP1*B*) e *GSTP1c* (*GSTP1*C*). A variante *GSTP1*B* apresenta uma transição A→G no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val). O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima *GSTP1* para a ligação de eletrofilos reativos, e a substituição Ile105→Val105 nas variantes *GSTP1*B* e *GSTP1*C* afeta a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da proteína codificada (Pandya, Srivastava *et al.*, 2000)

Além das Glutathione S-transferases, destacam-se ainda como enzimas da fase II do biometabolismo as diversas *uridine 5- diphosphate glucuronosyltransferase* (UGTs), divididas em duas famílias (UGT1 e UGT2) e o gene *GCLC* (*glutamate-cysteine ligase, modifier subunit*).

O gene *UGT2B7* (*UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide 7*) localiza-se no cromossomo 4q13.2 e polimorfismos neste gene têm sido associados com alterações no metabolismo de drogas. As UGTs atravessam o trato intestinal e farão parte do primeiro passo do metabolismo pré-hepático, pois a principal função da glucuronidação é aumentar a polaridade dos compostos, facilitando sua detoxificação e eliminação. (Monaghan, Clarke *et al.*, 1994; Eissing, Lippert *et al.*, 2012). Strassburg *et al.* (2001) estudaram as atividades de diferentes (UGTs) em seres humanos que receberam os imunossupressores tacrolimo e ciclosporina e demonstraram atividade de glucuronidação no trato gastrointestinal da enzima UGT2B7.

O gene *GCLC* (*glutamate-cysteine ligase, modifier subunit*) localiza-se no cromossomo 1q22.1. Também conhecida como gamma-glutamilcisteína sintetase, a enzima é o primeiro produto da síntese da glutathione, e é constituída de duas subunidades, uma cadeia pesada e a outra regulatória. Variações nas suas formas têm sido relacionadas a vários tipos de anemia hemolítica (Gipp, Chang *et al.*, 1992; Detchaporn, Kukongviriyapan *et al.*, 2012).

A literatura tem mostrado que não existe uma droga que seja totalmente livre de reações adversas. No entanto, à medida que as enzimas que participam do metabolismo de drogas, assim como suas variantes são caracterizadas, métodos rápidos e mais baratos de genotipagem são desenvolvidos. Isto possibilitará, em médio prazo, a adaptação do tratamento com drogas às características genéticas individuais, contribuindo para a diminuição gradativa do uso de tratamento generalizado para a população.

Gene *ABCB1*: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1.

O gene *ABCB1*, anteriormente conhecido como gene *MDR1* em seres humanos, está localizado no cromossomo 7q21.1 (Callen, Baker *et al.*, 1987), e é membro da super família de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC). As proteínas ABC transportam várias moléculas através das membranas extra e intracelulares e a glicoproteína P (gpP), codificada pelo gene *ABCB1* foi o primeiro transportador ABC implicado na resistência a multidroga. Esta glicoproteína é um transportador de efluxo dependente de ATP, que age sobre uma ampla variedade de substratos e constitui um mecanismo de proteção do organismo

contra xenobióticos. A gpP atua reduzindo, assim, a exposição das células e tecidos a substâncias potencialmente tóxicas (Fromm, 2002).

A resistência a múltiplas drogas (MDR) foi primeiramente observada em cânceres humanos (Kessel, Hall *et al.*, 1965; Kessel, Botterill *et al.*, 1968). Uma das características inicialmente observadas no fenótipo MDR de células cancerosas foi a resistência cruzada a drogas que não apresentam relação estrutural ou funcional. Os trabalhos mostraram que as células que apresentavam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, apresentavam também um aumento na expressão da glicoproteína P (gpP - P significa permeabilidade). A gpP é frequentemente superexpressa em células de câncer, levando a um bombeamento de drogas para fora dessas células mais rapidamente do que podem entrar. Isto promove uma baixa concentração de drogas na célula cancerosa e reduz a eficiência das drogas na morte dessas células (Disponível em <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1>).

Embora a gpP tenha sido inicialmente detectada em células tumorais, também é expressa em células de tecidos normais (Dean e Allikmets, 2001). Ela está envolvida na alteração de biodisponibilidade de diversas drogas, afetando a absorção pelo trato gastrointestinal e excreção através dos rins e fígado, sendo também expressa no pulmão e nas barreiras hematoencefálica e hemato-testicular. No trato gastrointestinal, a primeira barreira de defesa do corpo contra exposição a drogas e toxinas é a gpP, que apresenta um gradiente de expressão crescente do estômago em direção ao duodeno e está presente na membrana apical do epitélio (Thiebaut, Tsuruo *et al.*, 1987; Thörn, Finnström *et al.*, 2005).

O gene *ABCB1* apresenta um grande número de polimorfismos e um número cada vez maior de estudos mostra que alguns destes podem afetar a expressão e atividade da gpP. Tais variações genéticas neste gene foram associadas à não resposta ao tratamento com certas drogas em pacientes com câncer (Fisher, Puztai *et al.*, 2013).

Gene VDR (Receptor da vitamina D)

O receptor de vitamina (VDR) para *1 α ,25-dihidroxitamin D (1 α ,25(OH)2D*), a forma ativa da vitamina D, é expresso em diversas células e, quando ativado, forma dímero e recruta outros fatores de transcrição, regulando diversos genes alvos (Ahn, Albanes *et al.*, 2009; Donkena e Young, 2011). O gene *VDR*, localizado no cromossomo 12 q13.11, codifica o hormônio receptor nuclear para vitamina D3 e funciona também como receptor para o ácido retinóico e biliar. O receptor pertence à família dos

fatores de regulação transcricional e mostra sequências similares para os receptores hormonais da tiróide e esteróides.

Dentre os cinco polimorfismos mais estudados deste gene, está o rs1544410 (Holick, 2007). Esse polimorfismo localiza-se no íntron 8 e possui um forte desequilíbrio de ligação com um polimorfismo do fragmento correspondente à cauda poli(A) na região 3' UTR. Como essa região está ligada à estabilidade do mRNA, este polimorfismo pode afetar os níveis de mRNA do gene *VDR* (Morrison, Qi *et al.*, 1994; Habuchi, Suzuki *et al.*, 2000).

As drogas imunossupressoras têm uma estreita faixa terapêutica e uma variabilidade muito grande na resposta interindividual. A presença de polimorfismos nos genes do metabolismo de drogas medicamentosas é mais dramática para as que possuem índice terapêutico baixo, ou seja, aquelas em que a dose terapêutica é muito próxima da dose tóxica (Brockmöller e Tzvetkov, 2008; Cheung, 2008).

O conhecimento atual sobre o impacto de polimorfismos genéticos nos genes que codificam enzimas metabolizadoras, nos genes de resistência a drogas e genes de receptores hormonais ainda não é suficiente para a farmacogenômica recomendar a personalização dos regimes imunossupressores em transplantados renais. Deste modo, uma investigação de diversos polimorfismos, visando encontrar painéis genéticos que diferenciem indivíduos mais suscetíveis à rejeição e à toxicidade celular, associada com o metabolismo local é necessária.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar algumas variações genéticas individuais que podem tornar os pacientes transplantados renais submetidos à terapia imunossupressora mais ou menos suscetíveis aos episódios de rejeição do enxerto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar pacientes transplantados que apresentaram episódios de rejeição com aqueles que não apresentaram episódios de rejeição, quanto à presença de variantes genéticas nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *MDR1*, *GCLC*, *GCLM* e *VDR*, envolvidos na metabolização de drogas imunossupressoras, resistência a drogas e receptor da vitamina D;
- Verificar possíveis associações dos polimorfismos estudados com aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes e com episódios de rejeição.
- Procurar determinar marcadores genéticos que possam futuramente constituir um painel a ser testado previamente à administração das drogas imunossupressoras, com intuito preventivo em relação a episódios de rejeição de órgãos, contribuindo para a individualização da terapia imunossupressora.

3 METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Casuística

Um estudo prognóstico com modelo conceitual de coorte foi realizado na Universidade Estadual de Londrina tendo como parceiro o Instituto do Rim de Londrina-PR.

Antes do início do estudo o protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE No. 0211.0.268.000-09, Apêndice 1). Os pacientes do presente estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice 2) e responderam a um Questionário relacionado ao estilo de vida (Apêndice 3).

A amostra dos pacientes foi constituída por 188 receptores submetidos a transplantes renais realizados no período de 23 de janeiro de 1981 a 10 de setembro de 2011 em Londrina-Paraná (Brasil). Foram incluídos todos os transplantes realizados no período que apresentaram sobrevida de enxerto igual ou superior a seis meses. Todos os transplantados foram atendidos no Instituto do Rim de Londrina pelas mesmas equipes clínica e cirúrgica durante o período do estudo, com protocolo de imunossupressão e acompanhamentos padronizados.

Os dados dos pacientes foram obtidos por meio do questionário aplicado aos mesmos (Apêndice 3), de consulta aos prontuários (Serviço de Arquivos Médicos do Instituto do Rim de Londrina) e do acompanhamento ambulatorial no Instituto do Rim de Londrina.

3.2 ANÁLISE DAS VARIANTES ALÉLICAS POLIMÓRFICAS

3.2.1 Extração do DNA Genômico

Após o preenchimento do questionário e assinatura do TCLE, a coleta de sangue de cada paciente foi realizada por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis, e o sangue coletado foi colocado em tubos contendo anticoagulante ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose) específico para a técnica de extração do DNA.

A extração de DNA sanguíneo foi realizada por meio da técnica de “Salting out” (Miller, Dykes *et al.*, 1988), como se segue. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm e o plasma aspirado. Foi adicionada solução de lise de hemáceas (solução A: 0,32 M de sucrose; 10 mM de tris-HCl pH-7,5; 5 mM de MgCl₂; 1% de Triton X-100) e a amostra mantida no gelo por 30 min. Em seguida foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado. O procedimento foi repetido, o sobrenadante retirado e as células ressuspensas em solução de lise de leucócitos (solução B: 10 mM de tris-HCl; pH-7,5; 5 mM de NaCl; 2 mM de EDTA, pH8,0). Foram adicionados SDS a 20% (duodecil sulfato de sódio) e proteinase K (20 mg/ml) e mantido a 37°C por cerca de 18 horas. Foi acrescentado NaCl a 6 M e a amostra centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. O DNA foi ressuspendido com etanol 100%, submetido à lavagem com etanol 70% e ressuspendido em solução TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA).

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Neste trabalho foram utilizadas técnicas baseadas em PCR. A PCR é um método que envolve a síntese enzimática *in vitro* de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA fita simples). Estes oligonucleotídeos iniciadores, também chamados de *primers*, são sintetizados artificialmente, de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A desnaturação consiste na separação das duplas fitas de DNA, por meio de elevação da temperatura entre 92° a 95°C. Na etapa de anelamento a temperatura é rapidamente reduzida, dependendo do tamanho e da sequência do iniciador utilizado, o que permite a hibridização DNA/DNA de cada iniciador com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão, envolvendo a adição de nucleotídeos e utilizando como molde a sequência-alvo. Deste modo, várias cópias desta sequência alvo são realizadas em cada um dos diversos ciclos da reação, em uma escala geométrica (Mullis e Brickell, 1992).

Os *primers* e/ou sondas utilizados neste estudo foram adquiridos da empresa Applied Biosystem ou desenhados baseados em trabalhos da literatura. A Tabela 1 apresenta as sequências de DNA contendo a transição estudada, assim como informações adicionais sobre os polimorfismos estudados.

Tabela 1 – Sequência de DNA contendo a transição estudada, SNP ID, tipo de mutação e ensaio utilizado.

| Gene | SNP ID | Alteração | Sequência (5'→ 3') | Tipo de mutação | Ensaio |
|---------------|------------|-----------|--|----------------------|------------------|
| <i>CYP1A1</i> | rs1048943 | A/G | GCAAGCGGAAGTGTATCGGTGAGACC[A/G]T TGCCCGCTGGGAGGTCTTTCTCTT | Missense | Alelo-específica |
| <i>CYP3A4</i> | rs12721627 | C/G | GATGTTCACTCCAAATGATGTGCTA[C/G]TGA TCACATCCATGCTGTAGGCCCC | Missense | Taqman |
| <i>GSTT1</i> | - | Deleção | - | Deleção | Multiplex |
| <i>GSTM1</i> | - | Deleção | - | Deleção | Multiplex |
| <i>GSTP1</i> | rs1695 | A/G | CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC[A/G]TC TCCCTCATCTACACCAACTATGT | Missense | Taqman |
| <i>UGT2B7</i> | rs7662029 | A/G | TTGTGTCAAATGGACTGCAGAAACA[A/G]GA TCTGTCACTGCTACTGTCTGGA | Transição (intron) | Taqman |
| <i>GCLC</i> | rs41303970 | A/G | AGGCGTGTGCAAGGGTGATTGGGTC[A/G]CA GTTGAGGGGAGCAGCTCGGAGA | Transição (intron) | Taqman |
| <i>GCLM</i> | rs17883701 | C/T | GGAAAAATAACTATTAATACTCTTT[C/T]TCC TCCATCTCCCCTCCTCTGATG | Transição (intron) | Taqman |
| <i>MDR1</i> | rs2032582 | C/T/A | TATTTAGTTTGACTCACCTCCCAG[C/A]ACC TTCTAGTTCTTTCTTATCTTTT TATTTAGTTTGACTCACCTCCCAG[C/T]ACC TTCTAGTTCTTTCTTATCTTTT | Transversão (intron) | Taqman |
| <i>VDR</i> | rs1544410 | C/T | GAGCAGAGCCTGAGTATTGGAATG[C/T]GC AGGCTGTCTGTGGCCCCAGGAA | Transição (intron) | Taqman |
| <i>CYP3A5</i> | rs4646453 | G/T | CAAAAATTCTCATCTTCCTGGAATA[A/C]TTC CTGCACATTTTCAGAACAAGGC | Transversão (intron) | Taqman |

3.2.3 Detecção e Quantificação de Ácidos Nucléicos por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) – Ensaio Taqman

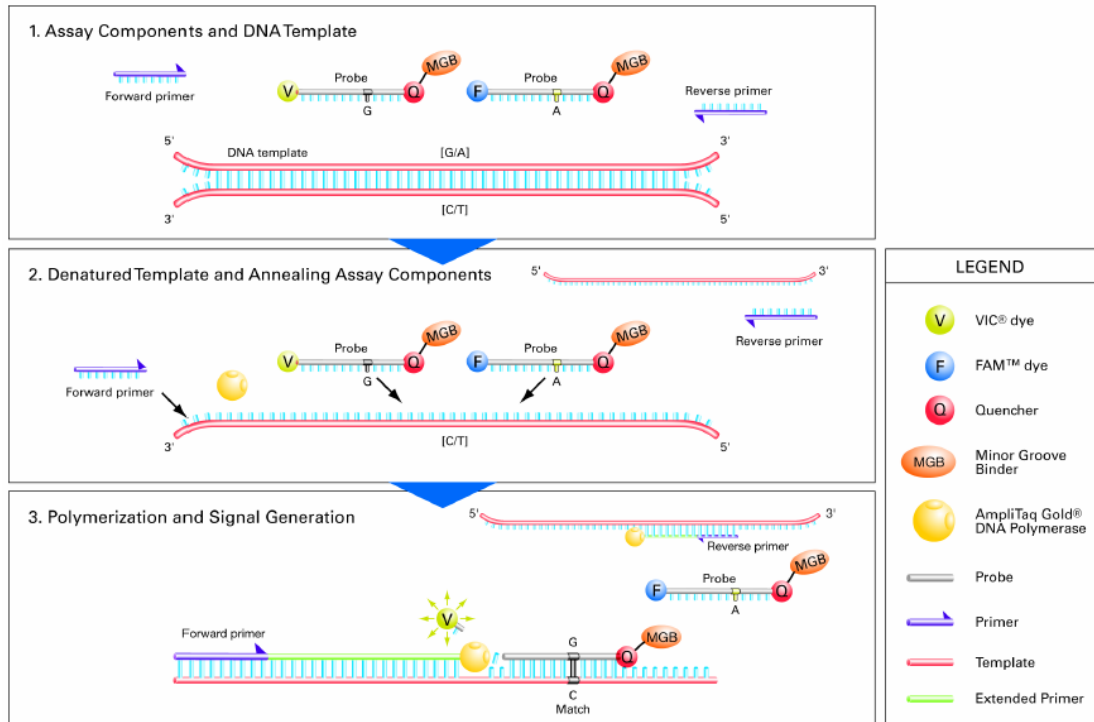
Experimentos de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) são baseados no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de amplificação pela reação em cadeia da polimerase. Nos ensaios de genotipagem para a análise dos diferentes polimorfismos, realizamos a RT-qPCR utilizando o sistema *TaqMan* (*Applied Biosystems*). Este sistema é baseado na atividade exonucleásica 5' da Taq DNA polimerase e utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação (Holland, Abramson *et al.*, 1991).

A disponibilidade destas sondas fluorescentes permitiu o desenvolvimento de um método em tempo real para detecção somente de produtos de amplificação específicos. Uma sonda (oligonucleotídeo) contém um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3' (Figura 1). Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* por meio da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos

primers e é clivada por meio da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase, enquanto o *primer* é estendido (Figura 1). Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*. A ação da enzima remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde. Assim, a inclusão da sonda não inibe o processo geral da PCR. As moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido. No presente estudo foram utilizadas sondas do tipo TaqMan MGB para os ensaios de discriminação alélica. As sondas TaqMan MGB contêm um *quencher* não-fluorescente na extremidade 3'. Deste modo, instrumentos de detecção de fluorescência SDS podem medir as contribuições do corante *reporter* mais precisamente, pois o *quencher* não fluoresce. Outra vantagem é que as sondas TaqMan MGB apresentam diferenças maiores nos valores de temperatura de *melting* (T_m) entre as sondas específicas e não específicas, o que fornece uma discriminação alélica mais precisa. As sondas ainda podem ser marcadas com corantes *reporter* distintos e distinguíveis, os quais permitem a amplificação de duas sequências distintas em um mesmo tubo de reação (corante VIC para um alelo e FAM para outro alelo, por exemplo). Este método possui alta especificidade e sensibilidade, já que é necessária tanto a hibridização específica entre os *primers* e o alvo, quanto a hibridização específica da sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente (Applied Biosystems, 2010).

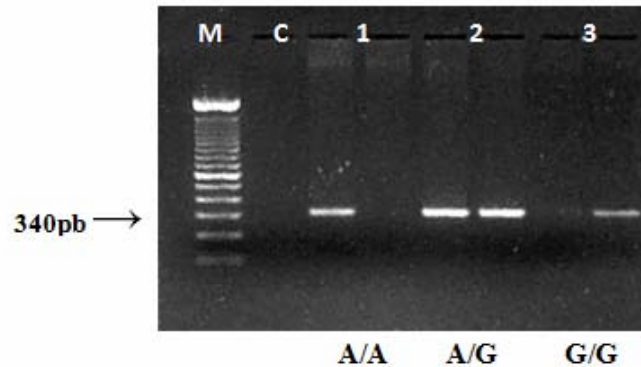
Nos experimentos deste estudo foi usado um corante fluorescente (ROX^{TM}) que funciona como uma referência passiva, o que evita alterações na quantificação do produto devido a uma possível evaporação da amostra. Desta forma, a emissão de fluorescência do corante repórter foi normalizada em função da emissão de fluorescência desta referência (ΔR_n): o sinal normalizado foi determinado pela equação $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, onde R_n^+ representa a razão entre o sinal do repórter em qualquer ciclo e o sinal basal do *quencher* e R_n^- representa a razão entre o sinal basal do *reporter* e o sinal basal do *quencher*. O *threshold* (limiar) foi estabelecido como sendo o valor de 10 vezes o desvio padrão da emissão basal média calculada para o primeiro ciclo. Assim, o C_t (*threshold cycle*) foi definido pelo número de ciclos no qual o sinal de fluorescência tornou-se significativamente diferente do sinal basal, ou seja, indica um resultado positivo para amplificação da amostra de ácido nucléico. A especificidade da amplificação foi avaliada pelo tamanho dos *amplicons* e pela curva de dissociação gerada ao final de cada reação de amplificação (Wilkening e Bader, 2004).

Figura 1 – Ensaio de genotipagem usando sondas Taqman (Manual da *Applied Biosystem*)



A variante polimórfica *CYP1A1*2B* (rs1048943 A>G) foi avaliada por meio da reação de PCR alelo-específica, utilizando-se um termociclador da marca *Thermo electron corporation* (Loccus Biotecnologia). O volume total da reação foi de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 2 mM MgCl₂, 2 mM de cada dNTP, 10 pMol de cada primer, 1,25U de *AmpliTaq* DNA polimerase e água ultra pura estéril. Nesta reação foi utilizado controle negativo (água ultra pura estéril). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta, utilizando-se um sistema de captura e imagem da marca Loccus Biotecnologia (modelo L PIX-ST). A reação de amplificação deste fragmento gerou um produto de 340pb, que pode ser visualizado na forma de uma ou duas bandas no gel, dependendo se o indivíduo possuía o genótipo prevalente (A/A), heterozigoto (A/G) ou raro (G/G) (Figura 2).

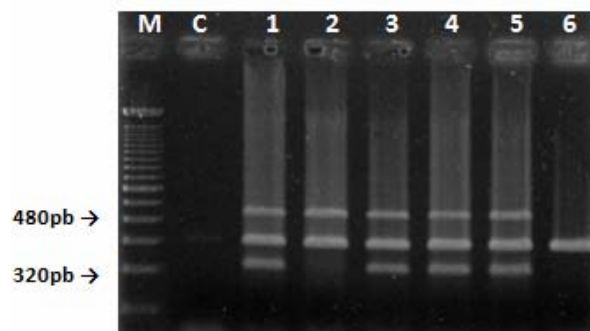
Figura 2 – Padrão de bandas da variante polimórfica rs1048943 do gene *CYP1A1*.



1: homozigoto prevalente (A/A); 2: heterozigoto (A/G); 3: homozigoto raro (G/G); C: controle negativo (água); M: marcador de peso molecular DNA Ladder (100 pb).

As variantes polimórficas *GSTM1*O* e *GSTT1*O* foram avaliadas por meio de PCR *Multiplex*, em termociclador marca *Thermo electron corporation* (Loccus Biotecnologia). A PCR foi feita em um volume total de reação de 25 μ L, contendo 100ng de DNA, tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 2 mM $MgCl_2$, 2 mM de cada dNTP, 10 pMol de cada primer, 1,25U de *AmpliTaq* DNA polimerase e água ultra pura estéril. Nesta reação foram utilizados controles negativo (água ultra pura estéril) e positivo (gene *CYP1A1*), que origina um fragmento não polimórfico de 312 pb. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta, utilizando-se um sistema de captura e imagem da marca Loccus Biotecnologia (modelo L PIX-ST). Os fragmentos de 215 pb e 480 pb foram observados nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos, respectivamente. A ausência de amplificação das variantes *GSTM1*O* (215 pb) ou *GSTT1*O* (480 pb), na presença do controle interno, indica os respectivos genótipos nulos para cada variante ou para ambas (Figura 3).

Figura 3 – Padrão de bandas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (*CYP1A1*: controle interno).



1, 3, 4 e 5 indivíduos *GSTT1*+ e *GSTM1*+
 2: indivíduo *GSTT1*+
 6: indivíduo *GSTM1* e *GSTT1* nulo
 C: controle negativo (água + reagentes)
 M: marcador de 100 pb.

3.2.4 Análise Estatística dos Dados

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas e a suscetibilidade à rejeição, foram comparados o total de pacientes que apresentaram episódios de rejeição com pacientes que não apresentaram episódios de rejeição, utilizando-se análise univariada e multivariada.

Na análise univariada uma estimativa do risco relativo (RR) com 95% de intervalo de confiança foi obtida pela comparação do número de indivíduos com genótipos raros, prevalentes e heterozigotos do grupo de pacientes que rejeitou o enxerto com o grupo de pacientes que não rejeitou. Os testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher também foram realizados na análise univariada e foram considerados estatisticamente significativos apenas os resultados com valor de p menor ou igual a 0,05.

Para a análise multivariada dos genótipos combinados com as características clínicas e patológicas, um modelo de regressão de Poisson foi adotado. O critério de seleção de variáveis adotado foi o método *backward*, que inicialmente incorpora todas as variáveis no modelo e na sequência uma variável por vez pode ser eliminada, desde que não seja significativa no modelo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO (ARTIGO)

ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *CYP3A5* E DE ASPECTOS CLÍNICOS COM EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO RENAL EM PACIENTES TRANSPLANTADOS

Godoy Camargo RBO¹, Mocelin AJ², Kuasne H³, Souza MF³, Matsuo T⁴, Oliveira MT³, Lengert AH³, Cilião HL³, Nóbrega MO³, Barcelos, GRM⁵; Barbosa, FJr⁵; Cólus IMS^{3*}.

Palavras chave: Imunossupressão. Transplante renal. Polimorfismo genético. Gene *CPY3A5*. Doença cardiovascular. HLA.

Artigo a ser submetido à revista:

Nephrology Dialysis Transplantation

Fator de impacto: 3.3

RESUMO

¹ Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Londrina PR, Brasil

² Instituto do Rim de Londrina, Londrina PR, Brasil

³ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Londrina PR, Brasil

⁴ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Estatística, Londrina PR, Brasil

⁵ Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto SP, Brasil.

*.Correspondência para:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
Laboratório de Mutagênese e Oncogenética
Departamento de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina, Paraná, Brasil
CEP: 86.057-970
Telefone: 55.43.3371-4608
e-mail: colus@sercomtel.com.br

Introdução. O processo de rejeição, apesar de ter alcançado grandes avanços devido ao desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras mais potentes, ainda é uma preocupação na área do transplante renal. A fim de se obter uma imunossupressão adequada, cogita-se o uso de uma terapia com base nas necessidades individuais do paciente. Este estudo buscou identificar polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes do biometabolismo, resistência a drogas e receptor da vitamina D, com o objetivo de encontrar painéis genéticos que possam estar relacionados com episódios de rejeição renal em pacientes submetidos à terapia imunossupressora. **Materiais e Métodos.** Foram selecionados 188 pacientes em monitoramento pós-transplante renal. Foram avaliados polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *MDR1*, *GCLC*, *GCLM* e *VDR* por RT-qPCR (ensaios Taqman), PCR multiplex e PCR alelo específica. A análise estatística foi realizada por meio de análise de regressão univariada e por um modelo de regressão de Poisson. **Resultados.** As variantes *G/T* ou *T/T* do gene *CYP3A5**1E, g.17163G>T (rs 4646453) foram associadas com uma chance maior de episódios de rejeição nos pacientes renais transplantados, cuja estimativa foi de 1,72 (I.C.95%: 1,04-2,83). Não houve associação entre o risco de episódios de rejeição e os outros polimorfismos avaliados. O uso da droga imunossupressora tacrolimo associado ao fato do paciente ter recebido o enxerto de doador HLA idêntico são fatores de proteção, com RR=0,389 para os episódios de rejeição (I.C.95%: 0,189-0,802). O não uso do imunossupressor tacrolimo e de corticóide aumentaram o risco de rejeição em, respectivamente, 1,811 vezes (I.C.95%: 1,13-2,92) e 5,62 vezes (I.C.95%: 3,4-9,09). O risco para episódios de rejeição quando o paciente apresentou algum evento cardiovascular foi 1,72 vezes maior (I.C.95%: 1,15- 2,75). **Conclusão.** Neste estudo, variantes no gene *CYP3A5* foram associadas a episódios de rejeição nos pacientes renais transplantados. Este é o primeiro passo para identificação de painéis de marcadores que possam contribuir para genotipagem pré-transplante e prever episódios de rejeição.

INTRODUÇÃO

No Brasil, foram realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2011, 4.430 transplantes renais, sem considerar os transplantes duplos de pâncreas e rim e estimava-se que até o final de 2012 seriam realizados 5.236 transplantes de rim pelo SUS (DATASUS-Ministério da Saúde - [1]).

A maior complicação do transplante renal é a rejeição e, de acordo com a avaliação clínica e o seu aparecimento, é classificada em hiper aguda, aguda e crônica [2].

Os episódios de rejeição são evitados por meio de terapia imunossupressora, que consegue controlar a sobrevida do enxerto do paciente receptor. Este quadro tem melhorado ao longo das últimas décadas, em parte como resultado da introdução de novos fármacos imunossupressores. Estes geralmente são utilizados no pós-transplante, como os inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimo) e de mTOR (sirolimo, everolimo, micofenolato de mofetil e azatioprina), que podem ser administrados sozinhos ou combinados, possibilitando a prevenção da rejeição ao órgão transplantado nos pacientes [3].

Na prática, não existem imunossupressores que sejam totalmente livres de reações adversas. Concentrações subterapêuticas podem aumentar o risco de rejeição aguda, enquanto uma overdose pode aumentar o risco de infecções e câncer [4]. Muitos têm sido associados com um risco aumentado de doenças, como eventos cardiovasculares e câncer [5].

Algumas drogas imunossupressoras como a ciclosporina são difíceis de serem manejadas devido à sua estreita margem terapêutica e às variações interindividuais em sua absorção e metabolismo [6, 7]. Observa-se que quando um grupo de pacientes recebe a mesma dose de imunossupressores, estes, quando analisados clinicamente por exames laboratoriais, apresentam no sangue diferentes concentrações da droga [4].

De acordo com Kalow *et al.* [8], este processo pode envolver variações genéticas significativas, sendo estimado para a população em geral, que 20 a 95% da variabilidade dos efeitos das drogas sejam devidos à ocorrência de fatores genéticos. Portanto, é cada vez mais importante o estudo de variantes genéticas em genes responsáveis pelo biometabolismo de drogas imunossupressoras, pois segundo Pavanello e Clonfero [9], polimorfismos no domínio catalítico ou nos reguladores desses genes têm se mostrado importantes biomarcadores por estarem envolvidos na indução dos mesmos.

Os genes *CYP3A4* e *CYP3A5* codificam as principais isoenzimas responsáveis pelo metabolismo hepático da ciclosporina e do tacrolimo logo, a presença de polimorfismos nestes genes merece atenção, dada a atividade enzimática referente aos genótipos dos

pacientes renais transplantados [7, 10]. Um dos polimorfismos mais estudados no gene *CYP3A4* é a presença da variante alélica *CYP3A4*1B*, uma transição adenina-guanina (A→G) na região promotora 5'(5'PR) (posição-290), localizada na sequência conhecida como elemento específico da nifedipina. A presença desta variante está associada com a diminuição da expressão ou da atividade da enzima *CYP3A4* [7, 11].

Estudo de genotipagem do gene *CYP3A5* de pacientes transplantados renais sugeriu que a presença dos alelos *CYP3A5*3* está associada à necessidade de baixas doses de inibidores da calcineurina para se atingir a concentração ideal da dose desejada. Este estudo também sugeriu uma nefrotoxicidade causada pelo imunossupressor tacrolimo quando associado com os genótipos *CYP3A4*1* e *CYP3A5*1* [12].

Vicari-Christensen *et al.* [13] relacionaram as concentrações de doses medicamentosas com os genótipos do gene *CYP3A5* de pacientes renais transplantados, corroborando estudos anteriores que indicam uma terapia imunossupressora individualizada, que minimize as reações adversas dos imunossupressores.

A resistência a múltiplas drogas (MDR) foi primeiramente observada em cânceres humanos [14, 15]. Uma das características inicialmente observada no fenótipo MDR de células cancerosas foi a resistência cruzada a drogas que não apresentam relação estrutural ou funcional. O gene *ABCB1*, conhecido também como gene *MDR1* em seres humanos, codifica para a glicoproteína P (gpP), envolvida na alteração de biodisponibilidade de diversas drogas, afetando a absorção pelo trato gastrointestinal e excreção através dos rins e fígado [16]. O gene *MDR1* apresenta um grande número de polimorfismos e um número cada vez maior de estudos mostra que alguns destes podem afetar a expressão e atividade da gpP [17].

O gene *VDR* localiza-se no cromossomo 12q13.11 e codifica o hormônio receptor nuclear para vitamina D3 [18]. Dentre os cinco polimorfismos mais estudados deste gene está o rs1544410, que possui um forte desequilíbrio de ligação com um polimorfismo do fragmento correspondente à cauda poli(A) na região 3' UTR. Como essa região está ligada à estabilidade do mRNA, este polimorfismo pode afetar os níveis de mRNA do gene *VDR* [19, 20] e, conseqüentemente, o seu produto final.

O conhecimento atual sobre o impacto de polimorfismos genéticos nos genes que codificam enzimas metabolizadoras, nos genes de resistência a drogas e receptores hormonais ainda não é suficiente para a farmacogenômica recomendar a personalização dos regimes imunossupressores em transplantados renais. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar determinados polimorfismos genéticos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *MDR1*, *GCLC*, *GCLM* e *VDR*, visando encontrar painéis

genéticos que diferenciem indivíduos mais suscetíveis a episódios de rejeição do enxerto pós transplante renal, assim como suas possíveis associações com algumas características clínico epidemiológicas dos pacientes.

METODOLOGIA

Seleção da Amostra, Coleta de Dados Clínicos e de Material Biológico

Um estudo prognóstico com modelo conceitual de coorte foi realizado na Universidade Estadual de Londrina tendo como parceiro o Instituto do Rim de Londrina-PR. Neste estudo foram utilizadas 188 amostras de DNA obtidas a partir de sangue periférico provenientes de pacientes submetidos a transplante renal. Entre os pacientes, 58% eram do sexo masculino e 42% do sexo feminino, sendo a média de idade de $46,6 \pm 13$ anos.

O seguimento de todos os pacientes é realizado periodicamente pelo Instituto do Rim de Londrina (PR - Brasil) e varia de 1 a 20 anos, quando os pacientes transplantados renais passam por avaliações clínico laboratoriais a cada visita para avaliação funcional do transplante (exceto aqueles que perderam o enxerto) e de suas condições gerais.

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE No. 0211.0.268.000-09), Paraná - Brasil. Os pacientes do presente estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam a um Questionário relacionado ao estilo de vida e histórico de exposição ocupacional. A partir da análise das avaliações clínicas e exames de diagnóstico contidos nos prontuários dos pacientes, foi possível fazer o levantamento referente ao uso do imunossupressor e as doenças desenvolvidas por cada um dos pacientes transplantados. As doenças frequentemente desenvolvidas foram catarata, gastrite, doença cardiovascular, verrugas, câncer e diabetes.

Análise das Variantes Alélicas Polimórficas

A extração de DNA sanguíneo foi realizada por meio da técnica de “Salting out” [21]. Neste trabalho, técnicas baseadas em PCR foram utilizadas para os ensaios de genotipagem para a análise dos diferentes polimorfismos, tendo a maioria sido realizada por RT-qPCR, utilizando-se o sistema TaqMan (Applied Biosystems) [22]. A variante polimórfica *CYP11A1**2B (rs1048943 A>G) foi avaliada por meio da reação de PCR alelo-específica [23],

enquanto variantes polimórficas *GSTMI*O* e *GSTTI*O* foram avaliadas por meio de PCR Multiplex [24]. A análise do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* foi realizada por PCR-RFLP de acordo com o protocolo de Harries *et al.* [25]. A Tabela 1 lista todos os polimorfismos avaliados neste estudo e seus respectivos métodos, assim como as sequências e transições ou deleções investigadas.

Tabela 1 – Sequência de DNA contendo a transição estudada, SNP ID, tipo de mutação e ensaio utilizado.

| Gene | SNP ID | Alteração | Sequência (5' → 3') | Tipo de mutação | Ensaio |
|---------------|------------|-----------|--|-----------------------------|------------------|
| <i>CYP1A1</i> | rs1048943 | A/G | GCAAGCGGAAGTGTATCGGTGAGACC[A/G]T TGCCCGCTGGGAGGCTTTCTCTT | Missense | Alelo-específica |
| <i>CYP3A4</i> | rs12721627 | C/G | GATGTTCACTCCAAATGATGTGCTA[C/G]TG ATCACATCCATGCTGTAGGCCCC | Missense | Taqman |
| <i>GSTTI</i> | - | Deleção | - | Deleção | Multiplex |
| <i>GSTMI</i> | - | Deleção | - | Deleção | Multiplex |
| <i>GSTP1</i> | rs1695 | A/G | CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC[A/G]TC TCCCTCATCTACACCAACTATGT | Missense | Taqman |
| <i>UGT2B7</i> | rs7662029 | A/G | TTGTGTCAAATGGACTGCAGAAACA[A/G]GA TCTGTCACTGCTACTGTCTGGA | Transição (intron) | Taqman |
| <i>GCLC</i> | rs41303970 | A/G | AGGCGTGTGCAAGGGTGATTGGGTC[A/G]CA GTTGAGGGGAGCAGCTCGCGAGA | Transição (intron) | Taqman |
| <i>GCLM</i> | rs17883701 | C/T | GGAAAAATAACTATTAATACTCTTT[C/T]TC CTCCATCTCCCCCTCCTCTGATG | Transição (intron) | Taqman |
| <i>MDR1</i> | rs2032582 | C/T/A | TATTTAGTTGACTCACCTCCCAG[C/A]ACC TTCTAGTTCTTTCTTATCTTTC TATTTAGTTGACTCACCTCCCAG[C/T]ACC TTCTAGTTCTTTCTTATCTTTC | Transversã o (intron) | Taqman |
| <i>VDR</i> | rs1544410 | C/T | GAGCAGAGCCTGAGTATTGGGAATG[C/T]GC AGGCCTGTCTGTGGCCCCAGGAA | Transição (intron) | Taqman |
| <i>CYP3A5</i> | rs4646453 | G/T | CAAAAATTCTCATCTTCCTGGAATA[A/C]TTC CTGCACATTTTCAGAACAAGGC | Transversã o (intron) | Taqman |

Análise Estatística dos Dados

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas e a suscetibilidade à rejeição, foram comparados o total de pacientes que apresentaram episódios de rejeição com pacientes que não apresentaram episódios de rejeição, utilizando-se análises univariada e multivariada.

Na análise univariada uma estimativa do risco relativo (RR) com 95% de intervalo de confiança foi obtida pela comparação do número de indivíduos com genótipos raros, prevalentes e heterozigotos do grupo de pacientes que rejeitaram o enxerto com o grupo de pacientes que não rejeitaram. Os testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher também foram

realizados na análise univariada e foram considerados estatisticamente significativos apenas os resultados com valor de p menor ou igual a 0,05.

Para a análise multivariada dos genótipos combinados com as características clínicas e patológicas do grupo de pacientes que apresentou episódios de rejeição, foi adotado o modelo de regressão de Poisson, utilizando-se o critério de seleção das variáveis pelo método *Backward* de seleção de variáveis, que inicialmente incorpora todas as variáveis no modelo e em seguida uma variável por vez pode ser eliminada, desde que não seja significativa no modelo.

RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta as principais características clínico epidemiológicas dos 188 participantes deste estudo. O grupo étnico prevalente foi de origem caucasiana (79,2%), seguido por afrodescendentes (20,7%); 110 (58,5%) pacientes eram do sexo masculino e 78 (41,4) do sexo feminino; quatorze (7,4%) apresentaram-se como tabagistas e 30 (15,9%) como etilistas. Na Tabela 2 também estão listadas as enfermidades que mais comumente acometeram os pacientes transplantados renais deste estudo, destacando-se as neoplasias (35% da amostra apresentaram verrugas e 5% cânceres, principalmente de pele), o diabetes, presente em 45 pacientes (24%) e as doenças cardiovasculares, presentes em 27 pacientes (14%).

A coleta de informações clínicas relacionadas com o uso de drogas imunossupressoras e com os episódios de rejeição do enxerto indicou que, de todos os pacientes, 94 (50%) faziam uso diário do imunossupressor micofenolato de mofetil, 76 (40,4%) usavam tacrolimo, enquanto 58 (30,8%) faziam uso de azatioprina, 42 (22%) usavam ciclosporina e 18 (9,57%) usavam sirolimo. A maioria dos pacientes 187 (99,4%) fazia uso de corticóides (Tabela 2).

Dos pacientes investigados no estudo, 59 (31%) apresentaram episódios de rejeição, enquanto 129 (69%) pacientes não rejeitaram o órgão até o momento. Na análise estatística univariada apresentaram um risco relativo estatisticamente significativo para episódios de rejeição os pacientes de pele não branca, os que receberam enxerto de doadores falecidos (compatibilidade HLA) e aqueles que apresentavam doença cardiovascular (Tabela 3). Os resultados do estudo indicaram ausência de associação entre os polimorfismos genéticos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT2B7*, *MDR1*, *GCLC*, *GCLM* e *VDR* e episódios de rejeição (Tabela 4). Quando avaliado o tipo de imunossupressão a que o paciente

foi exposto, foi verificado que apenas o uso da ciclosporina apresentou associação com rejeição ($p=0,028$), com risco de 1,651 (I.C.95%: 1,080-2,525) (Tabela 5).

As variáveis epidemiológicas, clínicas e a presença dos genótipos foram avaliadas pelas análises de regressão de Poisson de múltiplas variáveis com variância robusta e pelo método de Backward para seleção de variáveis. O modelo de regressão de Poisson foi aplicado de uma maneira conjunta aos dados genotípicos dos pacientes que apresentaram episódios de rejeição (com exceção dos genes *CYP1A1* e *CYP3A4*).

Os resultados do presente estudo sugeriram que o tipo de doador HLA idêntico foi um fator de proteção com $RR=0,389$ para os episódios de rejeição (I.C.95%: 0,189-0,802); a presença dos genótipos *G/T* ou *T/T* (alelo T) do gene *CYP3A5* caracterizou-se em aumento do risco para episódios de rejeição (1,72; I.C.95%: 1,04-2,83); o não uso do imunossupressor tacrolimo e o não uso de corticóide aumentaram o risco de rejeição em, respectivamente, 1,81 vezes (I.C.95%: 1,13- 2,92) e 5,62 vezes (I.C.95%: 3,45-9,09). O risco para episódios de rejeição quando o paciente apresentou algum evento cardiovascular foi 1,72 vezes maior (I.C.95%: 1,15 a 2,75) (Tabela 6).

Tabela 2 – Características clínico epidemiológicas dos pacientes renais transplantados e relação com o uso de imunossupressores

| Variáveis | Total <i>n</i> = 188 | Ciclosporina <i>n</i> = 42 | Tracolimo <i>n</i> = 76 | Sirolimo <i>n</i> = 18 | Azatioprina <i>n</i> = 58 | Micofenolato de Mofetil <i>n</i> = 94 | Corticóide <i>n</i> = 187 |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|---|------------------------------|
| Sexo | | | | | | | |
| Masculino | 110 (58) | 27 (64) | 38 (50) | 08 (44) | 40 (69) | 52 (55) | 110 (59) |
| Feminino | 78 (42) | 15 (36) | 38 (50) | 10 (56) | 18 (31) | 42 (45) | 77 (41) |
| Cor da pele | | | | | | | |
| Branca | 149 (79) | 31 (74) | 66 (87) | 15 (83) | 43 (74) | 80 (85) | 148 (79) |
| Não branca | 39 (21) | 11 (26) | 10 (13) | 03 (17) | 15 (26) | 14 (15) | 39 (21) |
| Doador | | | | | | | |
| Idêntico | 41 (22) | 04 (10) | 09 (12) | 01 (05) | 22 (38) | 13 (14) | 41 (22) |
| Haplo | 83 (44) | 22 (52) | 35 (46) | 13 (72) | 21 (36) | 51 (54) | 82 (44) |
| Falecido | 64 (34) | 16 (38) | 32 (42) | 04 (23) | 15 (26) | 30 (32) | 64 (34) |
| Tabagismo | 14 (07) | 01 (02) | 04 (05) | 02 (11) | 04 (07) | 04 (04) | 14 (07) |
| Etilismo | 30 (16) | 07 (16) | 06 (08) | 04 (22) | 13 (24) | 13 (14) | 30 (16) |
| Catarata | 03 (01) | 01 (02) | 01 (01) | 01 (05) | 01 (02) | 03 (03) | 03 (01) |
| Gastrite | 14 (07) | 03 (07) | 03 (04) | 02 (11) | 05 (08) | 06 (06) | 14 (07) |
| Doença | 27 (14) | 06 (14) | 11 (14) | 03 (16) | 08 (14) | 12 (13) | 27 (14) |
| Cardiovascular | | | | | | | |
| Verrugas | 67 (35) | 21 (50) | 14 (18) | 07 (46) | 33 (57) | 21 (22) | 67 (36) |
| Câncer | 10 (05) | 03 (07) | 03 (04) | 01 (05) | 03 (05) | 03 (03) | 10 (05) |
| Diabetes | 45 (24) | 13 (31) | 20 (26) | 03 (16) | 13 (22) | 31 (33) | 45 (24) |

Valor em parênteses corresponde à percentagem em relação ao *n* de cada coluna.

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes com episódios de rejeição (n=59), de acordo com as variáveis clínico-epidemiológicas; valores de p, risco relativo e intervalos de confiança a 95% obtidos da análise estatística.

| Variáveis | Episódios de rejeição | | N total | Valor de p | RR | I.C. 95% RR | |
|-----------------------|-----------------------|-------|------------|---------------|-------|-------------|----------|
| | N | % | | | | Lim.inf. | Lim.sup. |
| Sexo | | | | | | | |
| Masculino | 37 | 33,6% | 110 | 0,429° | 1,193 | 0,767 | 1,853 |
| Feminino | 22 | 38,2% | 78 | | 1,000 | - | - |
| Cor da pele | | | | | | | |
| Branca | 41 | 27,5% | 149 | 0,026°* | 0,596 | 0,389 | 0,914 |
| Não branca | 18 | 46,2% | 39 | | 1,000 | - | - |
| Doador | | | | | | | |
| Idêntico | 7 | 17,1% | 41 | 0,040°* | 1,000 | - | - |
| Haplo | 26 | 31,3% | 83 | | 1,835 | 0,870 | 3,869 |
| Falecido | 26 | 40,6% | 64 | | 2,379 | 1,139 | 4,971 |
| Tabagismo | | | | | | | |
| Sim | 3 | 21,4% | 14 | 0,404† | 0,666 | 0,239 | 1,857 |
| Não | 56 | 32,2% | 174 | | 1,000 | - | - |
| Etilismo | | | | | | | |
| Sim | 10 | 33,3% | 30 | 0,802° | 1,075 | 0,616 | 1,876 |
| Não | 49 | 31,0% | 158 | | 1,000 | - | - |
| Catarata | | | | | | | |
| Sim | 12 | 30,0% | 40 | 0,832° | 0,945 | 0,557 | 1,603 |
| Não | 47 | 31,8% | 148 | | 1,000 | - | - |
| Gastrite | | | | | | | |
| Sim | 28 | 38,4% | 73 | 0,101° | 1,423 | 0,936 | 2,162 |
| Não | 31 | 27,0% | 115 | | 1,000 | - | - |
| Cardiovascular | | | | | | | |
| Sim | 14 | 51,9% | 27 | 0,013°* | 1,855 | 1,0195 | 2,881 |
| Não | 45 | 28,0% | 161 | | 1,000 | - | - |
| Verrugas | | | | | | | |
| Sim | 23 | 34,3% | 67 | 0,517° | 1,154 | 0,751 | 1,773 |
| Não | 36 | 29,8% | 121 | | 1,000 | - | - |
| Câncer | | | | | | | |
| Sim | 4 | 40,0% | 10 | 0,546† | 1,295 | 0,587 | 2,853 |
| Não | 55 | 30,9% | 178 | | 1,000 | - | - |
| Diabetes | | | | | | | |
| Sim | 15 | 33,3% | 45 | 0,746° | 1,083 | 0,670 | 1,752 |
| Não | 44 | 30,8% | 143 | | 1,000 | - | - |

RR= Risco Relativo

* $P \leq 0,05$

° Valor de p do teste de qui-quadrado

† Valor de p do teste exato de Fisher

Valores em parênteses correspondem à porcentagem de cada variável em relação ao n total.

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes com episódios de rejeição de acordo com a presença dos genótipos, valor de p, Risco Relativo e Intervalo de Confiança a 95%

| Variáveis | Episódios de rejeição | | N Total | Valor de p | RR | I.C. 95% RR | |
|---------------|-----------------------|-------|------------|---------------|-------|-------------|----------|
| | N | % | | | | Lim.inf. | Lim.sup. |
| CYP3A5 | | | | | | | |
| G/G | 50 | 29,8% | 168 | 0,165° | 0,661 | 0,386 | 1,132 |
| G/T ou T/T | 9 | 45,0% | 20 | | 1,000 | - | - |
| GSTM1 | | | | | | | |
| Presente | 28 | 30,8% | 91 | 0,861° | 0,963 | 0,630 | 1,470 |
| Nulo | 31 | 32,0% | 97 | | 1,000 | - | - |
| GSTT1 | | | | | | | |
| Presente | 46 | 31,5% | 146 | 0,946° | 1,018 | 0,611 | 1,697 |
| Nulo | 13 | 31,0% | 42 | | 1,000 | - | - |
| GSTP1 | | | | | | | |
| A/A ou A/G | 52 | 30,6% | 170 | 0,471° | 0,787 | 0,422 | 1,465 |
| G/G | 7 | 38,9% | 18 | | 1,000 | - | - |
| UGT2B7 | | | | | | | |
| A/A | 6 | 25,0% | 24 | 0,471° | 1,000 | - | - |
| A/G ou G/G | 53 | 32,3% | 164 | | 1,108 | 0,374 | 1,601 |
| GCLC | | | | | | | |
| C/C ou C/T | 58 | 31,4% | 185 | 0,942† | 0,941 | 0,187 | 4,726 |
| T/T | 1 | 33,3% | 3 | | 1,000 | - | - |
| GCLM | | | | | | | |
| C/C ou C/T | 54 | 30,5% | 177 | 0,300† | 0,671 | 0,339 | 1,331 |
| T/T | 5 | 45,5% | 11 | | 1,000 | - | - |
| VDR | | | | | | | |
| C/C | 27 | 34,6% | 78 | 0,421° | 1,000 | - | - |
| C/T ou T/T | 32 | 29,1% | 110 | | 0,922 | 0,754 | 1,127 |
| MDR1 | | | | | | | |
| G/G | 29 | 31,9% | 91 | 0,890° | 1,000 | - | - |
| G/T ou T/T | 30 | 30,9% | 97 | | 0,986 | 0,813 | 1,197 |

RR= Risco Relativo

° Valor de p do teste de qui-quadrado

† Valor de p do teste exato de Fisher

Valor em parênteses corresponde a percentagem de cada genótipo em relação ao *n* total.

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes com episódios de rejeição de acordo com o imunossupressor recebido, valores de p, Risco relativo e Intervalo de confiança a 95%.

| Variáveis | Episódios de rejeição | | N total | Valor de p | RR | I.C. 95% RR | |
|---------------------|-----------------------|--------|------------|----------------------|--------|-------------|----------|
| | N | % | | | | Lim.inf. | Lim.sup. |
| Ciclosporina | | | | | | | |
| Sim | 19 | 45,2% | 42 | 0,028 ^o * | 1,651* | 1,080 | 2,525 |
| Não | 40 | 27,4% | 146 | | 1,000 | - | - |
| Tacrolimo | | | | | | | |
| Sim | 18 | 23,7% | 76 | 0,061 ^o | 0,647 | 0,404 | 1,037 |
| Não | 41 | 36,6% | 112 | | 1,000 | - | - |
| Sirolimo | | | | | | | |
| Sim | 5 | 27,8% | 18 | 0,729 ^o | 0,874 | 0,402 | 1,902 |
| Não | 54 | 31,8% | 170 | | 1,000 | - | - |
| Azatioprina | | | | | | | |
| Sim | 17 | 29,3% | 58 | 0,682 ^o | 0,907 | 0,567 | 1,453 |
| Não | 42 | 32,3% | 130 | | 1,000 | - | - |
| MMF | | | | | | | |
| Sim | 28 | 29,8% | 94 | 0,637 ^o | 0,903 | 0,591 | 1,380 |
| Não | 31 | 33,0% | 94 | | 1,000 | - | - |
| Corticóide | | | | | | | |
| Sim | 58 | 31,0% | 187 | 0,138 [†] | 0,310 | 0,250 | 0,384 |
| Não | 1 | 100,0% | 1 | | 1,000 | - | - |

RR= Risco Relativo

^o Valor de p do teste de qui-quadrado

[†] Valor de p do teste exato de Fisher

* $P \leq 0,05$

Tabela 6 – Resultado da regressão de Poisson para o desfecho episódios de rejeição em função dos fatores estatisticamente significativos.

| Variáveis | Valor de p | RR | I.C. 95% RR | |
|-----------------------|------------|-------|-------------|-----------|
| | | | Lim. inf. | Lim. sup. |
| Doador | | | | |
| HLA idêntico | - | 1,000 | - | - |
| HLA haplo | 0,243 | 0,772 | 0,500 | 1,192 |
| HLA falecido | 0,011 | 0,389 | 0,189 | 0,802 |
| Gene CYP3A5 | | | | |
| G/G | 0,033 | 1,000 | - | - |
| G/T ou T/T | | 1,718 | 1,044 | 2,825 |
| Tacrolimo | | | | |
| Sim | 0,014 | 1,000 | - | - |
| Não | | 1,812 | 1,126 | 2,915 |
| Corticóide | | | | |
| Sim | <0,001 | 1,000 | - | - |
| Não | | 5,618 | 3,448 | 9,091 |
| Cardiovascular | | | | |
| Sim | 0,010 | 1,718 | 1,149 | 2,752 |
| Não | | 1,000 | - | - |

RR= Risco Relativo

DISCUSSÃO

Pacientes renais transplantados fazem uso de terapia imunossupressora ao longo de sua vida para assegurar a permanência do enxerto e apresentam uma condição especial referente aos estudos da farmacogenômica, visto que estes pacientes fazem o uso de drogas combinadas que são metabolizadas por uma série de enzimas polimórficas. Quando a droga imunossupressora é administrada, esta é primeiro absorvida na parede intestinal, onde a presença de diferentes proteínas pode determinar a quantidade final da droga que irá passar para o sangue [7, 13]. Posteriormente, a droga é metabolizada no fígado por um complexo enzimático que se apresenta polimórfico na população, resultando em variações interindividuais no metabolismo de drogas [4, 26].

A principal razão da perda do enxerto é a lesão crônica, caracterizada pelo declínio progressivo da função do rim. A incompatibilidade HLA estimula a produção de anticorpos, os quais estão relacionados com a perda tardia do enxerto [27]. Avanços nas terapias imunossupressoras e o monitoramento dos pacientes diminuíram os episódios de rejeições

agudas em transplantes de órgãos sólidos. No entanto, cerca de 10% a 30% de todos os pacientes transplantados sofrem episódios de rejeição aguda no primeiro ano após o transplante [28]. No presente estudo, dos 188 pacientes transplantados renais avaliados, 59 (31%) apresentaram episódios de rejeição do enxerto.

A análise estatística univariada indicou que indivíduos não brancos apresentaram um risco relativo maior para rejeição do que os indivíduos brancos. Neste estudo foi solicitado aos pacientes que se auto identificassem quanto à cor da pele, pois no Brasil a população é altamente heterogênea, tendo, segundo Suarez-Kurtz [29], significativos graus de ancestralidade européia e africana, seguida de ancestralidade ameríndia, o que dificulta análises que englobem esta variável. Dutra [30] mostrou que indivíduos negros apresentavam maior porcentagem de rejeição quando comparados com os de cor branca. Ianhez [31] afirmou que esta diferença seria decorrente de questões sócio econômicas da população negra e mulata. Os dados do presente estudo confirmam os achados de Dutra [30] e Ianhez [31], pois além dos indivíduos de pele não branca terem apresentado maior risco para rejeição, eles são maioria na população que recebe atendimento em hospitais públicos brasileiros, onde muitas vezes não há acesso a exames laboratoriais necessários para um bom acompanhamento pré e pós transplante. Dados recentes do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), compilados do Ministério da Saúde no Brasil, mostram que o Brasil não é um país de maioria branca e, apesar de tanto as mulheres quanto os negros e pardos apresentarem necessidades semelhantes às dos homens brancos, estes são a maioria dos receptores, gerando inúmeras desigualdades referentes à cor e sexo quanto ao recebimento de enxertos no sistema nacional de transplantes de órgãos [32]. Portanto, os achados da análise univariada do presente estudo quanto à associação da cor da pele com os episódios de rejeição parecem estar relacionados mais a estas questões sócio econômicas do que às genéticas.

Doenças cardiovasculares são as principais complicações fatais da doença renal crônica, tanto para pacientes em terapia renal substitutiva quanto para aqueles em tratamento conservador [5]. O transplante renal consegue corrigir algumas disfunções que acentuam e levam ao aparecimento da doença cardiovascular, como a hipertensão arterial, diabetes mellitus e hiperdispedelímia, porém, o uso de imunossupressores como os inibidores da calcineurina e corticóides pode também favorecer o desenvolvimento da doença. A hipertensão arterial é frequente nos transplantados em geral e tem um aumento significativo com o uso da ciclosporina [33]. Canzanello *et al.* [34] relataram em estudos de transplantes de fígado, a menor incidência da doença cardiovascular com o uso de tacrolimo quando comparado com o uso de ciclosporina. Outro fator de risco para o desenvolvimento da doença

cardiovascular em transplantados é o tabagismo. No presente estudo, a porcentagem de pacientes renais transplantados com hábito tabagista foi baixa, não permitindo este tipo de análise.

No presente estudo, dos 59 pacientes que apresentaram episódios de rejeição, 27 (14%) apresentaram também doença cardiovascular, sendo as mais comuns o comprometimento da função diastólica, que foi detectada em 17 (62%) pacientes e a disfunção do ventrículo esquerdo, observada em 10 pacientes (37%). As enfermidades foram confirmadas em 59,2% dos pacientes por meio de exames específicos, como por exemplo, a ecodopplercardiografia. O risco para episódios de rejeição quando o paciente apresentou algum evento cardiovascular foi 1,72 vezes maior (I.C. 95%: 1,15 - 2,75), como mostra a Tabela 6. Não é de nosso conhecimento que outros trabalhos da literatura tenham descrito esta associação, pois geralmente as doenças cardiovasculares em pacientes transplantados são relacionadas com mortalidade e não com episódios de rejeição. Portanto, estudos futuros são necessários para confirmar este achado.

Dentre as principais drogas imunossupressoras mais utilizadas na terapia pós-transplante estão o micofenolato de mofetil, o tacrolimo e a ciclosporina. Os dados obtidos dos prontuários dos pacientes do presente estudo confirmam isto, pois 94 (50,7%) dos pacientes faziam uso de micofenolato mofetil, 76 (40,4%) de tacrolimo, enquanto 42 (22%) usavam ciclosporina diariamente.

Embora apresentem diferenças estruturais, os imunossupressores ciclosporina e tacrolimo possuem mecanismos de ação celular semelhantes. Ambos são inibidores da calcineurina e, como resultado desta inibição, a transcrição dos genes de ativação de células T é suprimida, o que inibe a produção de interleucina-2 (IL-2) e muitas outras citocinas, como a interleucina-3 (IL-3), interferon- γ (INF- γ), e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) [3]. O mecanismo de inibição de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ocorre por meio de quinases reguladoras da proliferação celular, que bloqueiam a divisão das células, evitando a passagem destas da fase G1 para S do ciclo celular [3].

Em um estudo realizado em transplantados de fígado com o uso do imunossupressor tacrolimo, os pacientes apresentaram melhores resultados quando comparados ao uso de ciclosporina durante o primeiro ano após o transplante [35]. Apesar da introdução da ciclosporina na terapêutica imunossupressora ter sido importantíssima para a melhora da sobrevida do enxerto renal, esta droga juntamente com os corticosteróides e o tacrolimo está implicada com o desenvolvimento da hipertensão pós transplante [36]. No entanto, alguns autores relatam que os receptores renais que faziam uso do tacrolimo apresentaram menor

ocorrência de hipertensão que os que usavam ciclosporina e, conseqüentemente, menor risco de episódios de rejeição [36, 37]. Nossos dados confirmam os relatos da literatura, pois a avaliação dos diferentes imunossupressores aos quais os pacientes foram expostos mostrou que apenas o uso de ciclosporina apresentou risco de 1,651 (I.C.95%: 1,080-2,525) para episódios de rejeição. Resultado contrário foi obtido para o uso do imunossupressor tacrolimo e corticóides, pois o não uso desses medicamentos aumentou o risco de episódios de rejeição em, respectivamente, 1,81 vezes (I.C.95%: 1,13 - 2,92) e 5,62 vezes (I.C.95%: 3,45 - 9,09).

As drogas imunossupressoras têm uma estreita faixa terapêutica e uma variabilidade muito grande na resposta interindividual, o que levou os estudos de farmacogenômica a investigarem mais sobre o assunto, principalmente no que diz respeito à concentração das doses desses medicamentos, biomarcadores que indiquem maior risco de rejeição, como também sobre as proteínas envolvidas no processo da farmacodinâmica [4, 38].

Atualmente o estudo de biomarcadores vem ganhando destaque na área de transplantes, sendo os testes de triagem genéticos para o antígeno leucocitário humano (HLA) realizados para os pacientes receptores anteriormente ao transplante, os melhores biomarcadores no pré-transplante [27]. Os resultados do presente estudo confirmam este fato, pois o tipo de doador HLA idêntico se mostrou um fator de proteção com RR=0,389 para os episódios de rejeição (I.C.95%: 0,189 - 0,802).

O fato do antígeno leucocitário humano não prever a rejeição aguda ou crônica, tem estimulado pesquisas baseadas em análises genéticas visando a identificação de possíveis biomarcadores nesta área [39]. De acordo com Ware [6], genotipagem nos genes do biometabolismo pode auxiliar na adequação das doses de drogas imunossupressoras de uma maneira indivíduo-específica, evitando tanto episódios de rejeição quanto toxicidade pós transplante.

Dentre as principais enzimas do biometabolismo, as pertencentes à subfamília CYP3A são as principais responsáveis pela eliminação metabólica de medicamentos, quando comparadas com outras enzimas de biotransformação [40]. Como tais enzimas estão localizadas no fígado e intestino delgado, contribuem para o primeiro passo do metabolismo de drogas. Dentre as diversas drogas utilizadas no pós transplante, os inibidores da calcineurina (CNIs), inibidores do alvo da rapamicina (mTOR) e os corticoesteróides são todos metabolizados por enzimas oxidativas da subfamília CYP3A do citocromo P450 [26, 41] e são substratos para a P-glicoproteína (Pgp) [42, 43].

As principais enzimas do biometabolismo que têm sido investigadas como potenciais marcadores em transplantados renais são as CYP3A4 e CYP3A5, principalmente por seus

históricos no metabolismo de diversas drogas. Neste estudo, dos três genes pertencentes à super família CYP450 avaliados, dois (*CYP11A1* e *CYP3A4*) não foram associados a uma maior suscetibilidade aos episódios de rejeição renal. Para o gene *CYP3A4*, apenas um polimorfismo com uma MAF (*minor allele frequency*) muito baixa foi analisado e nenhum genótipo raro ou heterozigoto foi encontrado nos pacientes transplantados renais estudados. No entanto, no presente estudo, a presença dos alelos *G/T* ou *T/T* na posição 17163 do gene *CYP3A5* (rs4646453) caracterizou-se em risco para episódios de rejeição do enxerto, com uma estimativa de 1,72 (I.C.95%: 1,04 - 2,83).

Polimorfismos no gene *CYP3A5* têm sido alvo de diversos estudos. Shi *et al.* [44] avaliaram a troca A6986G (rs776746) e identificaram este polimorfismo como um provável marcador molecular para uso clínico em transplantes hepáticos. Este polimorfismo causa um defeito na região de *splicing* e é altamente avaliado em diversos estudos. Tavira *et al.* [45] e Ro *et al.* [46] avaliaram o papel do polimorfismo rs776746 na variabilidade da dosagem de tacrolimo em transplantados renais e indicaram uma relação deste polimorfismo com episódios de rejeição. Kuehl *et al.* [47] concluíram que pacientes transplantados renais portadores do alelo A de *CYP3A5* expressavam níveis normais da enzima, enquanto pacientes com o alelo G não expressavam níveis adequados da enzima. Tais resultados sugerem que pacientes portadores do alelo G requerem diferentes doses de drogas imunossupressoras para manterem o efeito da droga adequado.

Como o polimorfismo rs776746 já tem sua função bem caracterizada e um amplo envolvimento com rejeição de enxertos em diversos órgãos, no presente estudo foi avaliada a variante polimórfica rs4646453. Embora este polimorfismo seja menos conhecido na literatura, nosso objetivo foi avaliar se variantes de um mesmo gene podem acarretar em função semelhante e maior risco de episódios de rejeição.

Tavira *et al.* [45] estudaram polimorfismos de 16 genes do biometabolismo na farmacocinética do imunossupressor tacrolimo em transplantados renais e não encontraram associação entre as variantes dos genes *CYP11A1*, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com episódios de rejeição do enxerto. Por outro lado, um estudo realizado por Singh *et al.* [48] demonstrou que pacientes com deleções em *GSTM1* e *GSTT1* apresentaram, respectivamente, maior risco para rejeição e perda da função do enxerto, sem no entanto, ter sido observada associação entre os genótipos de *GSTM1* e *GSTT1* e os efeitos nefrotóxicos causados pelo uso de imunossupressores. Os dados do presente estudo estão de acordo com [45], pois não foram observadas associações entre polimorfismos dos genes do biometabolismo *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP3A4*, *UGT2B7*, *GCLC* e *GCLM* na amostra dos transplantados renais avaliada. No

entanto, entre os SNPs estudados por Tavira *et al.* [45], estes indicaram que o polimorfismo (rs776746) do gene *CYP3A5* poderia ser utilizado como uma ferramenta farmacogenética preditora para a dosagem adequada de tacrolimo em transplantados renais, prevenindo, assim, toxicidade ou rejeição.

Zheng *et al.* [38], em um estudo com pacientes pediátricos submetidos a transplantes cardíacos, verificaram que a manutenção da concentração sanguínea da droga imunossupressora tacrolimo estava associada com a presença de genótipos específicos de *ABCB1* e *CYP3A5*, já que portadores de tais genótipos requeriam doses maiores de tacrolimo para manter a concentração sanguínea normal do medicamento. Tais resultados mostraram a aplicabilidade de polimorfismos em *ABCB1* e *CYP3A5* na terapia imunossupressora. No presente estudo, o polimorfismo do gene *ABCB1* (rs 2032582) não mostrou associação com rejeição renal (OR: 0,986 e IC.95%: 0,81 - 1,19).

Ozel *et al.* [49] demonstraram a importância de se genotipar alguns polimorfismos do gene *VDR* em pacientes pós transplante, já que estes são úteis no monitoramento do surgimento de osteoporose nesses indivíduos. Apesar da osteoporose não ter sido confirmada por meio de exames específicos em muitos dos pacientes do presente estudo, todos foram genotipados para o polimorfismo rs1544410 do gene *VDR* e avaliada sua possível associação com episódios de rejeição do enxerto ou com o uso de algum tipo de imunossupressor. Os resultados obtidos não foram significativos para rejeição.

As UGT's constituem uma superfamília de várias isoenzimas, tendo a subfamília *UGT2B7* um papel significativo na glucuronidação de muitas drogas clinicamente importantes. Portanto, variações na função enzimática de *UGT2B7* poderiam potencialmente impactar diferentes respostas individuais às drogas que são substratos desta enzima [50]. Congiu *et al.* [51] relataram funções alteradas nas *UGT2B7* causadas por polimorfismos genéticos, tais como níveis alterados de expressão de mRNA. No entanto, associação significativa entre as variantes de *UGT2B7* e respostas a drogas em seres humanos não tem sido muito explorada em situações clínicas.

A transição G/A -842 na região promotora do gene *UGT2B7* tem sido associada a um aumento na metabolização do ácido micofenólico em AcMPAG, um metabólito tóxico para a célula em pacientes transplantados renais [52]. Gensburger *et al.* [53] não relataram associação entre *UGT2B7* G/A-842 e a ocorrência de disfunções gastrointestinais relacionadas com o imunossupressor MMF em receptores de transplantes renais. Um estudo realizado com 67 pacientes transplantados renais sugeriu que pacientes com a variante T na posição 802 do gene *UGT2B7* (rs7439366) eram protegidos dos efeitos gastrointestinais adversos da droga

micofenolato de mofetil, independentemente da formulação do ácido micofenólico ou do inibidor da calcineurina concomitantemente administrado [54].

De acordo com nossos resultados, não houve associação positiva correlacionando o imunossupressor micofenolato de mofetil com os genótipos avaliados e gastrite. Foram considerados diagnóstico para gastrite os exames laboratoriais confirmatórios de endoscopia e ultrassonografia especializadas.

O polimorfismo rs7662029 (A/G -327) presente na região promotora do gene *UGT2B7* foi avaliado e os genótipos A/G e G/G não foram relacionados com um maior risco de episódios de rejeição. Op den Buijsch *et al.* [52] avaliaram outros três polimorfismos de *UGT2B7* (G/A -79; T/C -66; C/T 816) em transplantados renais chineses e não encontraram evidências quantitativas relacionadas aos níveis de tacrolimo no sangue dos pacientes. Embora no presente estudo não tenha sido quantificado o imunossupressor no sangue dos pacientes, é interessante observar que outros polimorfismos em *UGT2B7* podem estar relacionados com concentrações de tacrolimo e rejeição renal, já que, segundo Strassburg *et al.* [55], o imunossupressor tacrolimo é metabolizado principalmente por *UGT2B7*. Esta afirmação é discutível na literatura, pois outros autores como Kamdem *et al.* [26] e Cheung [4] afirmaram que a metabolização do tacrolimo seria realizada principalmente por *CYP3A4* e *CYP3A5*.

Os dados do presente estudo demonstraram que o não uso do tacrolimo foi associado a episódios de rejeição, assim como a presença dos genótipos G/T ou T/T do gene *CYP3A5*1E*, g.17163G>T (rs4646453) foi associada a um maior risco de episódios de rejeição renal em pacientes que faziam uso da droga tacrolimo. No entanto, não houve associação de rejeição com nenhum genótipo analisado do gene *UGT2B7*. Estes achados tendem a confirmar que diferenças interindividuais na expressão de enzimas *CYP3A* interferem no metabolismo do tacrolimo e que as variantes alélicas do gene *CYP3A5* influenciam na dose necessária deste imunossupressor para sua metabolização [47, 56].

Hesselink *et al.* [57] afirmaram que, embora exista uma evidência substancial da patogenia da nefrotoxicidade causada pelos inibidores da calcineurina, ainda são necessárias novas avaliações de polimorfismos genéticos em associação com dados obtidos de transplantes renais, para fornecer ferramentas indispensáveis para a melhora da conduta clínica e para se alcançar a terapia individualizada.

Os dados do presente estudo, após analisar diversos polimorfismos genéticos, permitem-nos indicar o gene *CYP3A5* como biomarcador genético molecular a ser utilizado na prática clínica, pois suas variantes apresentaram associação com os episódios de rejeição

em pacientes transplantados renais brasileiros. Este achado, somado aos dados da literatura, contribuirá, em médio prazo, para que marcadores genético-moleculares possam ser utilizados para minimizar os efeitos tóxicos das drogas imunossupressoras, assim como contribuir para, futuramente, se alcançar a terapia individualizada dos pacientes transplantados. No entanto, temos clareza de que o conhecimento atual sobre o impacto dos polimorfismos genéticos de genes codificadores de enzimas metabólicas, enzimas de resistência a drogas e receptores hormonais sobre os resultados clínicos em transplante renal ainda está longe de ser suficiente para a recomendação da personalização dos regimes imunossupressores nos pacientes e que muitos estudos ainda deverão ser realizados para se atingir este objetivo.

REFERÊNCIAS

1. DATASUS. DATASUS- Ministério da Saúde. 2012. Available in: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pt_sas_666_transplante_renal_2012_.pdf
2. Racusen LC, Haas M. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1(3):415-20.
3. Danovitch G. Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. In: Wilkins W. *Handbook of Kidney Transplantation*. 5 th ed. Philadelphia, 2010, 77-126.
4. Cheung C. Pharmacogenetics and Renal Transplantation. In: Trzcińska, M. *Kidney Transplantation – New Perspectives*. Croacia: InTech, 2008, 147-162.
5. Bucharles SG, Varela AM, Barberato SH, *et al.* Assessment and management of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *J Bras Nefrol* 2010;32(1):118-25.
6. Ware N. The role of genetics in drug dosing. *Pediatr Nephrol* 2012;27(9):1489-98.
7. Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review. *J Transplant* 2012;2012:230386.
8. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998;8(4):283-9.
9. Pavanello S, Clonfero E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res* 2000;463(3):285-308.
10. Zhu L, Song HT, Wang QH, *et al.* Effect of CYP3A4*18B, CYP3A5*3 gene polymorphism on dosage and concentration of tacrolimus in renal transplant patients. *Yao Xue Xue Bao* 2012;47(7):878-83.

11. Hashimoto H, Toide K, Kitamura R, *et al.* Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem* 1993;218(2):585-95.
12. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, *et al.* 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;82(6):711-25.
13. Vicari-Christensen M, Repper S, Basile S, *et al.* Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. *Prog Transplant* 2009;19(3):277-84.
14. Kessel D, Hall TC, Roberts D, *et al.* Uptake as a determinant of methotrexate response in mouse leukemias. *Science* 1965;150(3697):752-4.
15. Kessel D, Botterill V, Wodinsky I. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res* 1968;28(5):938-41.
16. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361-98.
17. Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* 2006;25(4):231-59.
18. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357(3):266-81.
19. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367(6460):284-7.
20. Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, *et al.* Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. *Cancer Res* 2000;60(2):305-8.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
22. Holland PM, Abramson RD, Watson R, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(16):7276-80.
23. Drakoulis N, Cascorbi I, Brockmüller J, *et al.* Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin Investig* 1994;72(3):240-8.
24. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, *et al.* A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107(2):229-33.

25. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, *et al.* Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18(4):641-4.
26. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, *et al.* Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 2005;51(8):1374-81.
27. Terasaki P, Lachmann N, Cai J. Summary of the effect of de novo HLA antibodies on chronic kidney graft failure. *Clin Transpl* 2006:455-62.
28. Hertz MI, Aurora P, Christie JD, *et al.* Scientific Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2009 Annual Reports. *J Heart Lung Transplant* 2009;28(10):989-92.
29. Suarez-Kurtz G, Pena SD, Struchiner CJ, *et al.* Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. *Front Pharmacol* 2012;3:191.
30. Dutra MM, Lopes AA, Miranda EA, *et al.* The influence of race on kidney graft survival. *Transplant Proc* 1999;31(7):3021-2.
31. Ianhez L. *Peculiaridades do transplante renal nos países em desenvolvimento intransplante de órgãos e tecidos*. Sao Paulo: Sarvier; 1997.
32. IPEA (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada), 2012. Available in: http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2688:catid=28&Itemid=23
33. Deray G, Benhmida M, Le Hoang P, *et al.* Renal function and blood pressure in patients receiving long-term, low-dose cyclosporine therapy for idiopathic autoimmune uveitis. *Ann Intern Med* 1992;117(7):578-83.
34. Canzanello VJ, Schwartz L, Taler SJ, *et al.* Evolution of cardiovascular risk after liver transplantation: a comparison of cyclosporine A and tacrolimus (FK506). *Liver Transpl Surg* 1997;3(1):1-9.
35. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, *et al.* Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9340):1119-25.
36. Pinheiro M, Alves C. Hipertensão arterial na diálise e no transplante renal. *J Bras Nefrol*; 2003, 142-148.
37. Aker S, Ivens K, Guo Z, *et al.* Cardiovascular complications after renal transplantation. *Transplant Proc* 1998;30(5):2039-42.
38. Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, *et al.* Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* 2004;44(2):135-40.
39. Roedder S, Gao X, Sarwal MM. The pits and pearls in translating operational tolerance biomarkers into clinical practice. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17(6):655-62.

40. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, *et al.* Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(10):1271-94.
41. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, *et al.* In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004;68(9):1889-902.
42. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, *et al.* Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993;268(9):6077-80.
43. Miller DS, Fricker G, Drewe J. p-Glycoprotein-mediated transport of a fluorescent rapamycin derivative in renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(1):440-4.
44. Shi Y, Li Y, Tang J, *et al.* Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients. *Gene* 2013;512(2):226-31.
45. Tavira B, Coto E, Garcíá EC, *et al.* Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(5):825-33.
46. Ro H, Min SI, Yang J, *et al.* Impact of tacrolimus intraindividual variability and CYP3A5 genetic polymorphism on acute rejection in kidney transplantation. *Ther Drug Monit* 2012;34(6):680-5.
47. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27(4):383-91.
48. Singh R, Manchanda PK, Kesarwani P, *et al.* Influence of genetic polymorphisms in GSTM1, GSTM3, GSTT1 and GSTP1 on allograft outcome in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2009;23(4):490-8.
49. Ozel L, Ata P, Ozel MS, *et al.* Risk factors for osteoporosis after renal transplantation and effect of vitamin D receptor Bsm I polymorphism. *Transplant Proc* 2011;43(3):858-62.
50. Turgeon D, Carrier JS, Lévesque E, *et al.* Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology* 2001;142(2):778-87.
51. Congiu M, Mashford ML, Slavin JL, *et al.* UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug Metab Dispos* 2002;30(2):129-34.
52. Op den Buijsch R, Cheung C, Wong K, *et al.* Influence of allelic variants of uridine diphosphateglucuronosyltransferase (UGT) 2B7 on the tacrolimus exposure. In Op den Buijsch R. *Pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in renal ransplant patients*. Universitaire Pers Maastricht, 2007, 151-162.
53. Gensburger O, Van Schaik RH, Picard N, *et al.* Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20(9):537-43.

54. Yang JW, Lee PH, Hutchinson IV, *et al.* Genetic polymorphisms of MRP2 and UGT2B7 and gastrointestinal symptoms in renal transplant recipients taking mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2009;31(5):542-8.
55. Strassburg CP, Barut A, Obermayer-Straub P, *et al.* Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by a differentially expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. *J Hepatol* 2001;34(6):865-72.
56. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;360(9340):1155-62.
57. Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit* 2010;32(4):387-93.

5 AGRADecIMENTOS

Ao Programa PPSUS (Pesquisas para o Sistema Único de Saúde) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo suporte financeiro. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de produtividade a I.M.S.Cólus. Ao Instituto do Rim de Londrina pelo apoio e parceria.

REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

- AHN, J. et al. Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 769-76, May 2009. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255064> >.
- Applied Biosystems (Manual), 2012 Disponível em: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040027.pdf
- ARRUDA, V. R. et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin Genet**, v. 54, n. 3, p. 210-4, Sep 1998. ISSN 0009-9163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788723> >.
- BALL, S. E. et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. **Clin Pharmacol Ther**, v. 66, n. 3, p. 288-94, Sep 1999. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10511065> >.
- BARRACLOUGH, K. A. et al. Therapeutic monitoring of mycophenolate in transplantation: is it justified? **Curr Drug Metab**, v. 10, n. 2, p. 179-87, Feb 2009. ISSN 1389-2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275552> >.
- BERTZ, R. J.; GRANNEMAN, G. R. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. **Clin Pharmacokinetic**, v. 32, n. 3, p. 210-58, Mar 1997. ISSN 0312-5963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9084960> >.
- BOARD, P. et al. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. **Pharmacol Ther**, v. 48, n. 3, p. 357-69, 1990. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2084706> >.
- BOREL, J. F. et al. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. **Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1017-25, Jun 1977. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/328380> >.
- BROCKMÖLLER, J.; TZVETKOV, M. V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 64, n. 2, p. 133-57, Feb 2008. ISSN 0031-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18224312> >.
- BROOKS, R. A. et al. The mutagenicity of benzo[a]pyrene in mouse small intestine. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 1, p. 109-14, Jan 1999. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9934857> >.
- CALLEN, D. F. et al. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. **Hum Genet**, v. 77, n. 2, p. 142-4, Oct 1987. ISSN 0340-6717. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3477522> >.

CEKA, J. et al. Histocompatibility Testing, Crossmatching and Immune Monitoring. In: WILKINS, W. A. (Ed.). **Handbook of Kidney Transplantation**. 5ª Edição. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2010. p.36-60.

CHAPMAN, J. R. The consequences of successful transplantation. **Lancet**, v. 378, n. 9800, p. 1357-9, Oct 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000122> >.

CHEUNG, C. Pharmacogenetics and Renal Transplantation. In: TRZCIŃSKA, M. **Kidney Transplantation – New Perspectives**. 1ª Edição, Croacia: InTech, 2008. p.147-162.

CONFORT-FROES, N. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: FERREIRA C.G. e ROCHA J.C.C. **Oncologia Molecular**. 1ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2004. p.295-305.

_____.Moleculares de Resistência a Múltiplas Drogas. In: FERREIRA C.G. e ROCHA J.C.C. **Oncologia Molecular**. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2010. p.165-176.

COTTON, S. C. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 1, p. 7-32, Jan 2000. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625170> >.

COUGHLIN, S. S.; HALL, I. J. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. **Ann Epidemiol**, v. 12, n. 3, p. 182-96, Apr 2002. ISSN 1047-2797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897176> >.

DALY, A. K. et al. Metabolic polymorphisms. **Pharmacol Ther**, v. 57, n. 2-3, p. 129-60, 1993 Feb-Mar 1993. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8361990> >.

DANOVITCH, G. Immunossuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. In: WILKINS, W. A. (Ed.). **Handbook of Kidney Transplantation**. 5ª Edição. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2010. P.77-126.

DATASUS, Ministério da Saúde. 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pt_sas_666_transplante_renal_2012_.pdf

DAUSSET, J.; SVEJGAARD, A. The HLA complex genetics and implications in the immune response. In: DAUSSET, J.; SVEJGAARD, A. **HLA and disease**. 1ª Edição. Michigan: Munksgaard, 1997. p.20-30.

DEAN, M.; ALLIKMETS, R. Complete characterization of the human ABC gene family. **J Bioenerg Biomembr**, v. 33, n. 6, p. 475-9, Dec 2001. ISSN 0145-479X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804189> >.

DETHAPORN, P. et al. Altered vascular function, arterial stiffness, and antioxidant gene responses in pediatric thalassemia patients. **Pediatr Cardiol**, v. 33, n. 7, p. 1054-60, Oct 2012. ISSN 1432-1971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22349676> >.

DONKENA, K. V.; YOUNG, C. Y. Vitamin d, sunlight and prostate cancer risk. **Adv Prev Med**, v. 2011, p. 281863, 2011. ISSN 2090-3499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21991434> >.

EISSING, T.; LIPPERT, J.; WILLMANN, S. Pharmacogenomics of codeine, morphine, and morphine-6-glucuronide: model-based analysis of the influence of CYP2D6 activity, UGT2B7 activity, renal impairment, and CYP3A4 inhibition. **Mol Diagn Ther**, v. 16, n. 1, p. 43-53, Feb 2012. ISSN 1177-1062. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22352453>.

EVANS, D A. P. Arylhydrocarbon hydroxylase (cytochrome P450 1A1 and 1A2). In: EVANS, D A. P. **Genetic factors in drug therapy: Clinical and Molecular Pharmacogenetics**. 1ª Edição . Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p.19-34.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. **Oncologia Molecular**. 1ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 449 páginas.

FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **Br J Cancer**, v. 108, n. 3, p. 479-85, Feb 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299535>.

FROMM, M. F. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 10, p. 1295-310, Nov 2002. ISSN 0169-409X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406646>.

GAO, Y.; ZHANG, L. R.; FU, Q. CYP3A4*1G polymorphism is associated with lipid-lowering efficacy of atorvastatin but not of simvastatin. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 64, n. 9, p. 877-82, Sep 2008. ISSN 1432-1041. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18528690>.

GATTÁS, G. J. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 4, p. 451-8, Apr 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064808>.

GATTÁS, G. J.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup Med (Lond)**, v. 50, n. 7, p. 508-11, Sep 2000. ISSN 0962-7480. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11198676>.

GEISLER, S. A.; OLSHAN, A. F. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. **Am J Epidemiol**, v. 154, n. 2, p. 95-105, Jul 2001. ISSN 0002-9262. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447041>.

GIPP, J. J.; CHANG, C.; MULCAHY, R. T. Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 185, n. 1, p. 29-35, May 1992. ISSN 0006-291X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350904>.

HABUCHI, T. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. **Cancer Res**, v. 60, n. 2, p. 305-8, Jan 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667581>.

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **N Engl J Med**, v. 351, n. 26, p. 2715-29, Dec 2004. ISSN 1533-4406. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616206>.

- HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 2, p. 357-77, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0102-311X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923879>.
- HAYASHI, S. et al. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. **J Biochem**, v. 110, n. 3, p. 407-11, Sep 1991. ISSN 0021-924X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722803>.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51-88, 2005. ISSN 0362-1642. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822171>.
- HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 30, n. 6, p. 445-600, 1995. ISSN 1040-9238. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770536>.
- HILDEBRAND, C. E. et al. Assignment of dioxin-inducible cytochrome P-450 gene family to Chinese hamster chromosome 4. **Somat Cell Mol Genet**, v. 11, n. 4, p. 391-5, Jul 1985. ISSN 0740-7750. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3860967>.
- HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v. 357, n. 3, p. 266-81, Jul 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634462>.
- HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 7276-80, Aug 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1871133>.
- INOUE, K. et al. Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. **Jpn J Hum Genet**, v. 37, n. 2, p. 133-8, Jun 1992. ISSN 0916-8478. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1391968>.
- KAPLAN, B.; MEIER-KRIESCHE, H. U. Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 12, p. 3270-1, Dec 2004. ISSN 1046-6673. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579532>.
- KESSEL, D.; BOTTERILL, V.; WODINSKY, I. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. **Cancer Res**, v. 28, n. 5, p. 938-41, May 1968. ISSN 0008-5472. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5652307>.
- KESSEL, D. et al. Uptake as a determinant of methotrexate response in mouse leukemias. **Science**, v. 150, n. 3697, p. 752-4, Nov 1965. ISSN 0036-8075. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5844077>.
- KIANG, T. K.; ENSOM, M. H.; CHANG, T. K. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 1, p. 97-132, Apr 2005. ISSN 0163-7258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781124>.

KUYPERS, D. R. et al. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. **Clin Pharmacol Ther**, v. 82, n. 6, p. 711-25, Dec 2007. ISSN 1532-6535. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17495880>.

LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 10, p. 1271-94, Nov 2002. ISSN 0169-409X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406645>.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clin Pharmacokinet**, v. 35, n. 5, p. 361-90, Nov 1998. ISSN 0312-5963. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839089>.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; D'ARCE, L.; CÓLUS, I. Glutathione S-transferase Mu(GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population: **Genet. Mol. Biol.** 25: 357-360 p. 2002.

LU, A. Drug-Metabolism Research Challenges in the New Millennium. **Drug metab and dispo**, v. 26, n. 12, p. 1217-22, Dec 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9860931>

MCLEOD, H. L.; EVANS, W. E. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 101-21, 2001. ISSN 0362-1642. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264452>.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216>.

MOCELIN, T. **Influência das Crises de Rejeição Crônica do Enxerto Renal**. 1996. 100 páginas (Mestrado). Medicina Interna, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. Ano da defesa: 1996.

MONAGHAN, G. et al. Isolation of a human YAC contig encompassing a cluster of UGT2 genes and its regional localization to chromosome 4q13. **Genomics**, v. 23, n. 2, p. 496-9, Sep 1994. ISSN 0888-7543. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7835904>.

MORRISON, N. A. et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, v. 367, n. 6460, p. 284-7, Jan 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161378>.

MOSCOW, J. A. et al. Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 17, p. 6518-22, Sep 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2842775>.

MULLIS, P. E.; BRICKELL, P. M. The use of the polymerase chain reaction in prenatal diagnosis of growth hormone gene deletions. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 37, n. 1, p. 89-95, Jul 1992. ISSN 0300-0664. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1424197>.

NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1155-62, Oct 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387968>.

NELSON, D. R. et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1-42, Feb 1996. ISSN 0960-314X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8845856>.

O'KEEFE, S. J. et al. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. **Nature**, v. 357, n. 6380, p. 692-4, Jun 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/137736>.

OBLIGACION, R.; MURRAY, M.; RAMZAN, I. Drug-metabolizing enzymes and transporters: expression in the human prostate and roles in prostate drug disposition. **J Androl**, v. 27, n. 2, p. 138-50, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0196-3635. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330661>

OGG, M. S. et al. A reporter gene assay to assess the molecular mechanisms of xenobiotic-dependent induction of the human CYP3A4 gene in vitro. **Xenobiotica**, v. 29, n. 3, p. 269-79, Mar 1999. ISSN 0049-8254. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219967>.

PANDYA, U. et al. Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 278, n. 1, p. 258-62, Nov 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071881>.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN C. D., CASARETT L.J. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 9ª Edição. New York: McGraw Hill Professional, 2001. p.113-186.

PARMIGIANI, R.; CAMARGO, A. O Genoma Humano e o Câncer. In: FERREIRA C.G. e ROCHA J.C.C. **Oncologia molecular**. 1ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2004. p.3-10.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutat Res**, v. 463, n. 3, p. 285-308, Oct 2000. ISSN 0027-5107. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018745>.

PHILLIPS, K. A.; VAN BEBBER, S. L. Measuring the value of pharmacogenomics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 6, p. 500-9, Jun 2005. ISSN 1474-1776. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15915153>.

RAMOS, E.; BRENNAN, D. **Evaluation of the potencial renal transplant recipient**. UpToDate Online Journal [serial online 2012]. Disponível em: <http://www.uptodate.com>.

ROSSIT, A.; CABRAL, I.; CONFORTI-FROES, N. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira: **Genetics and Molecular Biology**: 23 p. 1999.

ROY, J. N. et al. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. **Pharmacogenet Genomics**, v. 16, n. 9, p. 659-65, Sep 2006. ISSN 1744-6872. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906020>.

SABATINE, M.; AUNCHINCLOSS, H. Cell mediated rejection. In: Solez K, Racusen LC, Billingham ME. **Solid Organ Transplantation Rejection**. New York: Marcel Dekke, 1966. p.1-27.

SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928-33, Feb 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237013>.

SATA, F. et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. **Clin Pharmacol Ther**, v. 67, n. 1, p. 48-56, Jan 2000. ISSN 0009-9236. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668853>.

SEIDEGÅRD, J. et al. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 1, p. 33-6, Jan 1990. ISSN 0143-3334. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2295125>.

SINGH, R. et al. Influence of genetic polymorphisms in GSTM1, GSTM3, GSTT1 and GSTP1 on allograft outcome in renal transplant recipients. **Clin Transplant**, v. 23, n. 4, p. 490-8, 2009 Aug-Sep 2009. ISSN 1399-0012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486347>.

STRASSBURG, C. P. et al. Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by a differentially expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. **J Hepatol**, v. 34, n. 6, p. 865-72, Jun 2001. ISSN 0168-8278. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451170>.

TEDESCO, D.; HARAGSIM, L. Cyclosporine: a review. **J Transplant**, v. 2012, p. 230386, 2012. ISSN 2090-0015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22263104>.

TERASAKI, P.; LACHMANN, N.; CAI, J. Summary of the effect of de novo HLA antibodies on chronic kidney graft failure. **Clin Transpl**, p. 455-62, 2006. ISSN 0890-9016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18365403>.

TERASAKI, P. I.; MCCLELLAND, J. D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**, v. 204, p. 998-1000, Dec 1964. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14248725>.

THIEBAUT, F. et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 21, p. 7735-8, Nov 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2444983>.

THÖRN, M. et al. Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. **Br J Clin Pharmacol**, v. 60, n. 1, p. 54-60, Jul 2005. ISSN 0306-5251. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963094>.

TULLIUS, S. G. Dr. Joseph E. Murray (1919-2012): a life of curiosity, humanism, and persistence. **Am J Transplant**, v. 13, n. 1, p. 5-6, Jan 2013. ISSN 1600-6143. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23279678>.

VELLA; BRENNAN. **Induction immunosuppressive therapy renal transplantation in adults.** UpToDate Online Journal [serial online 2011]. Disponível em: <http://www.uptodate.com>.

VICARI-CHRISTENSEN, M. et al. Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. **Prog Transplant**, v. 19, n. 3, p. 277-84, Sep 2009. ISSN 1526-9248. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19813492> .

WARE, N. The role of genetics in drug dosing. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 9, p. 1489-98, Sep 2012. ISSN 1432-198X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358188>

WEINSHILBOUM, R. Inheritance and drug response. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 529-37, Feb 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571261>.

WIDERSTEN, M. et al. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. **Biochem J**, v. 276 (Pt 2), p. 519-24, Jun 1991. ISSN 0264-6021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2049077>

WILKENING, S.; BADER, A. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. **J Biomol Tech**, v. 15, n. 2, p. 107-11, Jun 2004. ISSN 1524-0215. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15190083>.

WILKINSON, A. The First Quarter. The First Three Months After Transplantation. In: WILKINS, W. A. **Handbook of Kidney Transplantation**. 5ª Edição. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2010. p.198-216.

XU, C.; LI, C. Y.; KONG, A. N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Arch Pharm Res**, v. 28, n. 3, p. 249-68, Mar 2005. ISSN 0253-6269. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832810>.

ZHANG, H. et al. Effects of cell differentiation and assay conditions on the UDP-glucuronosyltransferase activity in Caco-2 cells. **Drug Metab Dispos**, v. 39, n. 3, p. 456-64, Mar 2011. ISSN 1521-009X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098645>

ZHU, L. et al. Effect of CYP3A4*18B, CYP3A5*3 gene polymorphism on dosage and concentration of tacrolimus in renal transplant patients. **Yao Xue Xue Bao**, v. 47, n. 7, p. 878-83, Jul 2012. ISSN 0513-4870. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993851>

APÊNDICES

APÊNDICE A

Aprovação do Comitê de Ética envolvendo seres humanos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

| | |
|--|--------------------------------|
| Parecer de Aprovação Nº 004/10 CAAE Nº. 0211.0.268.000-09 FOLHA DE ROSTO Nº. 294492 | Londrina, 20 de abril de 2010. |
| PESQUISADORA: ILCE MARA DE SYLLOS CÔLUS CCB/BIOLOGIA GERAL | |
| <p>Prezadas Senhoras</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">“INVESTIGAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À REJEIÇÃO E AO CÂNCER EM TRANSPLANTADOS RENAIIS E DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CULTURA FRENTE À EXPOSIÇÃO A IMUNOSSUPRESSORES”</p> | |
| <p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p> | |
| <p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Prof.ª. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel</p> <p align="center">Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p> | |

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Ilce Mara de Syllos Cólus, Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo, Heloisa Lizotti Cilião e Hellen Kuasne, da Universidade Estadual de Londrina e Altair Jacob Mocelin, do Instituto do Rim de Londrina, o(a) convidamos para nossa pesquisa e solicitamos sua colaboração e o seu consentimento para incluí-lo(a) em nosso projeto de pesquisa "Investigação da suscetibilidade genética à rejeição e ao câncer em transplantados renais e da expressão gênica em cultura de células frente exposição a imunossuppressores." O objetivo deste estudo é avaliar possíveis alterações genéticas em suas células que possam estar relacionadas ao risco de rejeição de órgãos transplantados e ao desenvolvimento de tumores de pele decorrentes do tratamento imunossupressor.

Assim, solicitamos a sua autorização para que uma pequena quantidade de seu sangue (10 ml) seja coletado via punção venosa (picada na veia) com seringa e agulha descartáveis. Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional para a sua pessoa, além da picada da agulha. Pedimos sua autorização para que moléculas obtidas a partir deste material (DNA, RNA ou proteínas) possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, quando será solicitada nova autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos para a realização das pesquisas posteriores. O material obtido ficará armazenado no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Solicitamos também sua autorização para que possamos consultar seu prontuário médico e obter alguns dados clínicos do seu tratamento imunossupressor, compatibilidade com o doador e a evolução clínica pós transplante.

Solicitamos-lhe o preenchimento de um questionário sobre seu estilo de vida, histórico de exposição e evolução do transplante, onde o(a) sr(a) será identificado(a) apenas por um código, preservando sua identidade. Estes questionários ficarão armazenados no laboratório de Mutagêneses e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Esclarecemos que o(a) sr(a) a qualquer momento tem a liberdade de se recusar em contribuir com o estudo, sem ser prejudicado(a) no seu tratamento e acompanhamento médico. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, preservando sua identidade. Os mesmos provavelmente não trarão benefícios para a sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para a redução do número de casos de rejeição de transplantes, assim como para a diminuição de tumores em indivíduos submetidos a drogas imunossupressoras.

No caso de autorizado, o(a) sr(a). deverá assinar este Termo de Consentimento.

Cont. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Desde já agradecemos sua colaboração.

Nome do paciente ou responsável

Assinatura

RG: _____

Médico Responsável: _____

Pesquisador responsável: _____

Londrina, ____ de _____ de 2010

Ressaltamos que nem os pesquisadores e nem o paciente receberão qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo (Ilce Mara de Syllos Cólus, Altair Jacob Mocelin, Rossana Batista de Oliveira Gogoy Camargo, Heloísa Lizotti Cilião e Hellen Kuasne, telefone 3371.4608, sempre que solicitados, estarão à sua disposição para esclarecimento de qualquer questão relacionada a esta pesquisa.

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa 3371-2490.

Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

Profª. Drª. Ilce Mara de Syllos Cólus
Assinatura do pesquisador responsável

Rossana Camargo / Heloísa Cilião
Coletor / Entrevistador

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____, abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios da pesquisa. Concordo, portanto, em participar na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade, autorizando a coleta e o armazenamento de amostras de moléculas obtidas a partir do meu sangue para pesquisas futuras bem como dados do questionário que respondi. Por ser expressão de verdade firmo o presente termo.

Data __/__/__

Assinatura:

APÊNDICE C
Questionário pessoal



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL

Código nº _____

HISTÓRICO PESSOAL:

1- Registro Institucional: Instituto do Rim

2- Sexo: Masculino () Feminino ()

3- Idade: _____

4- Data de nascimento: ____ / ____ / ____

5- Local de nascimento: _____ UF: _____

6- Local de residência

Cidade: _____ UF: _____

Rua: _____ nº _____

Telefone: _____ e-mail: _____

7- Sua moradia é na zona rural ou urbana ?

() RURAL () URBANA

8- Há quanto tempo reside neste local ?

_____ anos _____ meses.

9- Profissão: _____

10- Grau de instrução:

Ensino Fundamental (antigo 1º grau) incompleto () completo ()

Ensino Médio (antigo 2º grau) incompleto () completo ()

Ensino Superior/Graduação incompleto () completo ()

Pós Graduação incompleto () completo ()

Curso Técnico incompleto () completo ()

11- A qual grupo étnico você pertence ?

Negro () Caucasiano () Asiático () Indígena () Outros ()

12- Ancestralidade (assinalar e descrever)

() Européia (qual ?) _____

() Africana (qual ?) _____

() Indígena (qual ?) _____

() Oriental (qual ?) _____
 () Mestiça (qual ?) _____

13- Informações dos familiares do indivíduo:

Nome completo do pai: _____
 Nome da mãe: _____

Tamanho da irmandade (incluindo você):

Total: _____ Vivos: _____

14 - Você possui algum irmão gêmeo idêntico?

() SIM () NÃO

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho:

15- Você já se expôs a algum destes agentes/substâncias listados abaixo EM SEU TRABALHO OU EM ALGUMA OUTRA ATIVIDADE QUE EXERCE ?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi isso: _____

Derivados de petróleo

(querosene, gasolina, solventes, etc...) _____ () SIM () NÃO

Tintas e/ou corantes _____ () SIM () NÃO

Compostos usados em Indústrias têxteis ou de tecelagem _____ () SIM () NÃO

Praguicidas e/ou herbicidas _____ () SIM () NÃO

Radiação _____ () SIM () NÃO

Metais pesados

(Chumbo, Níquel, Cromo, etc...) _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas no processamento de madeira _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas na indústria de papel ou celulose _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas em Mineração _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas na indústria de calçados ou curtume _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas em Metalurgia _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas em Usina de açúcar ou álcool _____ () SIM () NÃO

Substâncias usadas em processamento de Plástico ou borracha _____ () SIM () NÃO

Sol _____ () SIM () NÃO

Se SIM, especifique tempo e período do dia: _____

Outras substâncias químicas ou agentes físicos _____ () SIM () NÃO

Se SIM, especifique: _____

16- Você utiliza ou utilizava equipamentos de proteção individual (máscaras, luvas, óculos, chapéu, roupas apropriadas, protetor solar, etc...):

() SIM () NÃO

Histórico Tabagista:

- 17- Você fuma atualmente ? () SIM () NÃO
- 18- Se SIM, qual a quantidade de cigarros que fuma por dia?
 () menos de meio maço () de meio a um maço () mais de um maço
- 19- Se NÃO, já foi fumante ? Há quanto tempo parou de fumar ?
 () nunca fumei parei de fumar há () 0-5 anos
 () 5-10 anos
 () mais de 10 anos
- 20- Você convive ou conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?
 () SIM () NÃO

Histórico de Etilismo:

- 21- Você consome bebidas alcoólicas ? () SIM () NÃO
- 22- Se SIM, que tipo de bebida alcoólica você costuma consumir?
 () Destiladas () Não-destiladas () Outras () Ambas
- 23- Quanto você costuma beber por semana?
 () no máximo 1 copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 copos () mais de 10 copos
- 24- Se já parou há quanto tempo não consome mais esta bebida?
 () 0-5 anos () 6-10 anos () mais de 10 anos
- 25- Quanto você costumava beber por semana?
 () no máximo 1 copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 copos () mais de 10 copos
- 26- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente ?
 () SIM () NÃO

Histórico de Saúde:

- 27- Nos últimos 2 anos você tomou algum medicamento diariamente?
 () SIM () NÃO () NÃO SABE

Se SIM, especifique:

- () Hormônio
 () Anti-inflamatório
 () Analgésicos
 () Anti-hipertensivos

- () Anabolizantes
- () Imunossupressores
- () Multivitamínicos
- () Antibióticos
- () Antianêmicos
- () Tranquilizantes
- () Vitaminas
- () Antifúngicos
- () Antialérgicos
- () Tranqüilizantes
- () Antiarrítmicos
- () Outros: _____

28- Depois que você iniciou seu tratamento com imunossupressor:

A - Observou o surgimento de alguma lesão na pele?

() SIM () NÃO

B - Observou o surgimento de verrugas?

() SIM () NÃO

C - Apresentou gastrite ou alguma complicação digestiva?

() SIM () NÃO

Se sim, qual? _____

D - Desenvolveu catarata?

() SIM () NÃO

E - Teve algum tipo de micose?

() SIM () NÃO

Se sim, qual? _____

F - Desenvolveu diabetes?

() SIM () NÃO

G - Desenvolveu Hipertensão arterial?

() SIM () NÃO

H - Desenvolveu alguma doença cardiovascular?

() SIM () NÃO

I - Desenvolveu Osteoporose?

() SIM () NÃO

J - Desenvolveu anemia?

() SIM () NÃO

L - Desenvolveu sopro?

() SIM () NÃO

M- Desenvolveu Hepatite?

() SIM () NÃO

Outros problemas () Qual: _____

29- Você já foi submetido a algum tipo de cirurgia?

() SIM () NÃO

Se SIM, especifique:

Tipo: _____

Ano: _____

30- Você já foi submetido a algum tipo de transplante?

() SIM () NÃO

Se SIM, especifique:

() Rim () Fígado () Pulmão () Coração () Córnea () Medula óssea

() 1 vez () 2 vezes () 3 vezes

Qual a data do transplante: _____

31- Você já recebeu transfusão sanguínea?

() SIM () NÃO

Quantas? _____

32- Você tem antecedentes de câncer em sua família?

() SIM () NÃO

33- Em casos de câncer na família, qual era o vínculo de parentesco?

() Pai () Mãe () Filho () Tio () Primo () Outro

Se OUTRO, especifique: _____

34- Qual foi a localização do tumor?

Especifique: _____

Evolução clínica do Transplante

35- Quem foi o doador:

() Parente vivo

Especifique o grau de parentesco _____

() não parente vivo

() Cadáver