



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP3A5*,
PPARA E POR NA FARMACOCINÉTICA DE TACROLIMUS, NEFROTOXICIDADE
E DISFUNÇÃO DO ENXERTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI.**

Janaína Brito Freire Everton

**São Luís
2019**

JANAÍNA BRITO FREIRE EVERTON

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP3A5*,
PPARA E POR NA FARMACOCINÉTICA DE TACROLIMUS, NEFROTOXICIDADE
E DISFUNÇÃO DO ENXERTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS.**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde do Adulto da Universidade Federal do
Maranhão como pré-requisito para obtenção do Grau
de Mestra em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Linha de Pesquisa: Doenças Crônicas e Endêmicas do
Maranhão

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

Coordenadora: Prof^a Dra. Maria do Desterro Soares
Brandão Nascimento

São Luís
2019

Everton, Janaína Brito Freire.

Avaliação da influência de polimorfismos nos genes CYP3A5, PPARG e PGR na farmacocinética de tacrolimus, nefrotoxicidade e disfunção do enxerto em pacientes transplantados renais / Janaína Brito Freire Everton. - 2019.

63 p.

Coorientador(a): Gyl Eanes Barros Silva.

Orientador(a): Marcelo Magalhães Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2019.

1. Farmacocinética. 2. Imunossupressores. 3. Polimorfismos. I. Silva, Gyl Eanes Barros. II. Silva, Marcelo Magalhães. III. Título.

JANAÍNA BRITO FREIRE EVERTON

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP3A5*,
PPARA E POR NA FARMACOCINÉTICA DE TACROLIMUS, NEFROTOXICIDADE
E DISFUNÇÃO DO ENXERTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI.**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde do Adulto da Universidade Federal do
Maranhão como pré-requisito para obtenção do Grau
de Mestra em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o
candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva (Orientador)
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA

Prof^a. Dr^a. Adriana Maria Guimarães Sá Beckman (Examinadora)
Faculdade Estácio de Sá de São Luís - Maranhão

Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Rui Miguel da Costa Oliveira (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Fernando José Brito Patrício (Suplente)
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA

Dedico este trabalho aos meus pais José

Rodrigues e Maria Helena;

Ao meu irmão Esdras Brito;

Ao meu esposo Fábio de Tácio

e aos meus filhos Mayson de Tácio e Dayvison

de Tacio.

Agradecimentos:

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, e por me proporcionar saúde física e mental.

Agradeço ao meu querido orientador Prof. PhD Marcelo Magalhães Silva, pela orientação, oportunidade, confiança e acima de tudo pela amizade. Ao mesmo tempo o parabenizo pelo seu profissionalismo, dedicação e competência.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Gyl Eanes Barros Silva por todo auxílio, dedicação e ajuda.

Agradeço a FAPEMA pelo financiamento desta pesquisa.

A Banca examinadora por aceitar fazer parte desta dissertação e pelas contribuições.

Ao Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade - LEGH, por todo o apoio técnico oferecido a este trabalho e especialmente ao Responsável Técnico e amigo Dr. Fernando José Brito Patrício, por suas valiosas contribuições e ajuda. Para mim, exemplo de profissional e competência.

Agradeço também, à minha chefe, Karina Donato Kook, por todas as possibilidades e compreensão para que eu trilhasse o percurso do mestrado.

A todos os meus colegas de trabalho. Equipe LEGH, obrigada pela compreensão, amizade e companheirismo.

Ao Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA – CEPEC, pelo apoio técnico e em especial aos amigos Cossi Yves, Silvia Gaspar e Welliandra Santos, pela ajuda e toda a contribuição dada a este trabalho.

Ao Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do HUUFMA – LIME, pelo apoio técnico, em particular a pessoa de Victor Contreras.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do HUUFMA, em especial a Diego Coelho.

Ao Serviço de Arquivo Médico – SAME/HUUFMA, em particular a Carlessandro Melo dos Santos e Carlos Henrique da Silva Santos.

Ao Banco de Tumores do HUUFMA, na pessoa de Flavia Vidal.

Ao Serviço de Transplante do HUUFMA, especialmente Dra. Tereza Ferreira, enfermeira Regina e Briza Lobato.

Aos meus pais, José Rodrigues e Maria Helena, meu irmão Esdras Brito, minha cunhada Karolla, minha tia Ana, obrigada mesmo de longe, pelo incentivo e compreender minhas

ausências. Amo vocês!

Aos meus filhos Mayson e Dayvison, pelo carinho de todo dia; obrigada, amores da minha vida.

Agradeço ao meu esposo Fábio de Tácio, por todo o amor, cumplicidade, ajuda e compreensão nesta longa jornada, não apenas a do mestrado, que juntos e agradavelmente caminhamos. Te amo!

Especialmente, agradeço aos pacientes participantes desta pesquisa e espero que um dia estes resultados possam trazer-lhes benefícios.

*“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas, mas
ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma
humana”*

Carl Gustav Jung

RESUMO

A Doença Renal Crônica consiste em lesão e perda progressiva e irreversível das funções renais. O principal tratamento para pacientes com insuficiência renal é o transplante, porém, uma limitação dessa terapia é o risco de rejeição do enxerto. A introdução de imunossupressores foi determinante para manutenção funcional do órgão transplantado. O tacrolimus (FK 506) é um dos principais agentes imunossupressores utilizados na prática clínica; contudo, pode causar nefrotoxicidade e por isso deve ser administrado em doses ajustadas. Outro fator a ser considerado é a variabilidade farmacocinética interindividual dos imunossupressores devido a polimorfismos genéticos. O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência de polimorfismos nos genes *CYP3A5* (rs776746), *PPARA* (variantes rs4823613 e rs4253728) e *POR* (rs1057868) sobre a farmacocinética de tacrolimus em pacientes transplantados renais no primeiro ano pós-transplante. Dados clínicos e demográficos foram coletados a partir dos prontuários dos pacientes atendidos no Serviço de Transplante Renal do HUUFMA. A determinação dos níveis séricos da droga foi realizada pelo método de quimioluminescência. A identificação de polimorfismos foi realizada por PCR em tempo real. O teste qui-quadrado (X^2) foi aplicado para avaliar a adesão da população ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e a comparação entre grupos foi feita pelo teste Mann-Whitney e o teste Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. Um total de 100 pacientes transplantados renais foi analisado no presente estudo. Observou-se uma média de idade de $46,5 \pm 14,1$ anos sendo que a maioria da amostra foi do gênero masculino (54%) e se autodeclararam pardos (82%). Os alelos mais frequentes na amostra foram o alelo *3 (69%), sendo este o alelo variante para o gene *CYP3A5*. Para os demais genes, o tipo selvagem foi o mais prevalente; os alelos *A* e *G*, correspondendo a 64% e 82%, em relação às variantes do gene *PPARA* (rs4823613) e *PPARA* (rs4253728), respectivamente; e para o gene *POR* o mais frequente foi o alelo *1 (77%). Os genótipos mais prevalentes na amostra foram *CYP3A5**1/*3 (36%) e *CYP3A5**3/*3 (51%); *PPARA* (rs4823613) *A/A* (43%) e *A/G* (42%); *PPARA* (rs4253728) *G/G* (69%) e *G/A* (26%); *POR**1/*1 (57%) e *POR**1/*28 (38%). Pacientes homozigotos para o alelo não funcional *CYP3A5**3 apresentaram uma razão da concentração ajustada (*Co/D*) maior ($p < 0,05$) em relação aos portadores de pelo menos um alelo funcional *CYP3A5**1, na farmacocinética de tacrolimus; além disso este aumento foi progressivo ao longo do tempo. Não observamos relação estatística entre a *Co/D* e as variantes genotípicas dos genes *PPARA* e *POR*, no primeiro ano pós-transplante, quando analisados como única variável independente ou quando analisados em expressores (*1/*1 e *1/*3) e não expressores (*3/*3) *CYP3A5*. Portanto, nossos resultados sugerem que o polimorfismo (rs776746) no gene *CYP3A5* tenha um papel majoritário na farmacocinética de tacrolimus enquanto que os polimorfismos de *PPARA* (rs4823613 e rs4253728) e *POR* parecem não estar estreitamente relacionados com a variabilidade interindividual observada no metabolismo desse fármaco ao longo de 12 meses. Não houve associação entre polimorfismos e as variáveis de função hepática, renal e em relação à etnia. Segundo nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro trabalho na América Latina a avaliar de maneira conjunta o papel dos polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* (rs776746, rs4823613, rs4253728 e rs1057868) na farmacocinética de tacrolimus podendo auxiliar o estabelecimento de doses ajustadas desse fármaco em pacientes transplantados renais.

Palavras Chaves: polimorfismos, imunossupressores, variabilidade farmacocinética, *CYP3A5*, *PPARA* e *POR*.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease consists of progressive and irreversible injury and loss of renal functions. The main treatment for patients with renal failure is transplantation, but a limitation of this therapy is the risk of graft rejection. The introduction of immunosuppressants was crucial for the functional maintenance of the transplanted organ. Tacrolimus (FK 506) is one of the major immunosuppressive agents used in clinical practice; however, it may cause nephrotoxicity and should therefore be administered at adjusted doses. Another factor to consider is the interindividual pharmacokinetic variability of immunosuppressants due to genetic polymorphisms. The present study aims to evaluate the influence of polymorphisms on *CYP3A5* (rs776746), *PPARA* (rs4823613 and rs4253728) and *POR* (rs1057868) genes on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients in the first year after transplantation. Clinical and demographic data were collected from the medical records of patients treated at the HUUFMA Kidney Transplant Service. The determination of serum drug levels was performed by the chemiluminescence method. Polymorphisms were identified by real time PCR. The chi-square test (X^2) was applied to assess the population's adherence to the Hardy-Weinberg equilibrium and the comparison between groups was made by the Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn test. A total of 100 renal transplant patients were analyzed in the present study. An average age of 46.5 ± 14.1 years was observed and most of the sample was male (54%) and self-declared brown (82%). The most frequent alleles in the sample were allele *3 (69%), this being the variant allele for the *CYP3A5* gene. For the other genes, wild type was the most prevalent; alleles A and G, corresponding to 64% and 82%, relative to the gene variant *PPARA* (rs4823613) and *PPARA* (rs4253728) genes, respectively; and for the *POR* gene the most frequent was the allele *1 (77%). The most prevalent genotypes in the sample were *CYP3A5**1/*3 (36%) and *CYP3A5**3/*3 (51%); *PPARA* (rs4823613) A/A (43%) and A/G (42%); *PPARA* (rs4253728) G/G (69%) and G/A (26%); *POR* *1/*1 (57%) and *POR* *1/*28 (38%). Homozygous patients for the non-functional *CYP3A5* *3 allele had a higher adjusted concentration ratio (*Co/D*) ($p < 0.05$) compared to those with at least one *CYP3A5* *1 functional allele on tacrolimus pharmacokinetics. We did not observe a statistical relationship between *Co/D* and *PPARA* and *POR* genotype variants in the first year after transplantation, when analyzed as the only independent variable or when analyzed in expressers (*1/*1 and *1/*3) and non-expressing (*3/*3) *CYP3A5*. Therefore, our results suggest that the polymorphism (rs776746) in the *CYP3A5* gene plays a major role in tacrolimus pharmacokinetics whereas *PPARA* polymorphisms (rs4823613 and rs4253728) and *POR* appear not to be closely related to the interindividual variability observed in this drug metabolism. There was no association between polymorphisms and hepatic, renal and ethnicity function variables. In our understanding, the present study is the first study in Latin America to jointly evaluate the role of polymorphisms in the *CYP3A5*, *PPARA*, and *POR* genes (rs776746, rs4823613, rs4253728, and rs1057868) in tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients.

Keywords: polymorphisms, immunosuppressants, pharmacokinetic variability, *CYP3A*, *PPARA* and *POR*.

LISTADE TABELAS

Lista de Tabelas Dissertação:

Tabela 1. Número de pacientes com DRC em tratamento dialítico crônico e prevalência estimada por Estado em 2016	20
--	-----------

Lista de Tabelas Artigo:

Tabela 1. Caracterização demográfica e clínica dos pacientes transplantados renais do Maranhão	40
Tabela 2. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas dos genes <i>CYP3A5</i> , <i>PPARA</i> e <i>POR</i> na população de pacientes transplantados renais no Maranhão	41
Tabela 3. Concentração ajustada (<i>Co/D</i>) de tacrolimus nos diferentes genótipos <i>PPARA</i> e <i>POR</i> em expressores e não expressores de <i>CYP3A5</i> ao longo de 1 ano pós transplante em pacientes transplantados renais do Maranhão.	43
Tabela 4. Análise de regressão linear múltipla do efeito da idade, tempo e genótipo sobre a dose, concentração sérica e concentração ajustada de tacrolimus.	44

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras Dissertação

Figura 1. Processos fisiopatológicos ligados à doença renal	21
Figura 2. Estrutura química do tacrolimus e ciclosporina	22
Figura 3. Mecanismo de ação do tacrolimus (FK506)	23
Figura 4. Perfil farmacocinético	25

Lista de Figuras Artigo

Figura 1. Concentração ajustada de tacrolimus (Co/D) nos diferentes genótipos <i>CYP3A5</i> , <i>PPARA</i> e <i>POR</i> no primeiro ano pós transplante de pacientes transplantados renais.	42
--	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
IC	Inibidores da calcineurina
CsA	Ciclosporina
CYP 450	Citocromo P 450
CYP3A5	Enzima da família do Citocromo P 450
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRC	Doença Renal Crônica
DRCT	Doença Renal em Estágio Terminal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FK506	Tacrolimus
FKBP	Proteína citoplasmática de ligação do FK506
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ICE	Injúria Crônica do Enxerto
ISN	Sociedade Internacional de Nefrologia
LRA	Lesão Renal Aguda
MEC	Matriz extracelular
mRNA	Ácido ribonucléico (mensageiro)
NFAT	Fator nuclear de ativação de células T
POR	Oxirredutase do citocromo P 450
PPARA-alfa	Receptor nuclear proliferador de peroxissomo ativado - alfa
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
MTD	Monitoramento Terapêutico da Droga
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TGO	Transaminase Oxalacética
TGP	Transaminase Pirúvica

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micrograma
Co	Concentração vale
Co/D	Concentração ajustada
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
kDa	Kilodalton
mG	Miligrama
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
Tc	Linfócito T citotóxico
Th	Linfócito T helper

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Doença Renal Crônica	18
2.2. Imunossupressores	22
2.3. Polimorfismos genéticos	25
2.4. Nefrotoxicidade causada por fármacos	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO	34
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) surge a partir de diferentes doenças que alteram irreversivelmente a função e estrutura do rim. O diagnóstico da DRC baseia-se na redução crônica da função renal e danos estruturais nos rins (Webster et al, 2017)

O transplante renal é o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal crônica, conferindo melhor sobrevida e qualidade de vida a longo prazo quando comparado a pacientes em tratamento dialítico (Nga et al, 2018). A introdução da imunossupressão na rotina clínica foi determinante na redução do risco de rejeição e consequente aumento do tempo de sobrevida do enxerto (Calne et al., 1978; Naesens et al., 2009).

Um dos Inibidores da Calcineurina (IC), o tacrolimus (FK506), é uma potente droga imunossupressora amplamente usada em receptores de transplantes de órgãos sólidos. No entanto, sua utilização é caracterizada por uma estreita janela terapêutica e uma alta variabilidade farmacocinética interindividual. Portanto, o Monitoramento Terapêutico da Droga (MTD) é mandatório no sentido de otimizar a terapia com IC e ainda assim os pacientes experimentam significativas sub ou super exposição à droga após o transplante (Lunde et al, 2014).

O tacrolimus é um fármaco potencialmente nefrotóxico e pode acarretar disfunção renal. Este é um dos principais efeitos adversos característicos desta droga (Barbarino, 2013). A nefrotoxicidade consiste na vasoconstrição e isquemia do rim (Saturnino et al, 2012). A toxicidade vascular renal, causada pela terapia com IC, afeta primariamente as arteríolas e é progressiva na exposição prolongada a esses agentes (Mihatsch, 1994; Zoja, 1986; Neild, 1983).

Parte da grande variabilidade farmacocinética interindividual dos IC, ocorre por diferentes genes que codificam enzimas metabolizadoras de drogas ou transportadores de drogas (Lunde et al, 2014).

O complexo citocromo P450 (CYP) representa uma superfamília de proteínas que formam o principal sistema enzimático envolvido na biotransformação e eliminação de drogas e compostos xenobióticos (Lamba et al., 2012; Krau et al., 2013; Zanger et al., 2013). Uma das principais famílias desse complexo enzimático é denominada CYP3A e está localizada no cromossomo 7q22.1 (Van Schaik et al., 2002; Zanger et al., 2013). A CYP3A é uma subfamília constituída por 4 isoenzimas codificadas pelos genes *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43* (Eichelbaum e Burk, 2001; Zanger et al., 2013).

Enzimas da família do citocromo P450 (CYP) 3A são responsáveis pelo metabolismo oxidativo do tacrolimus. Quatro genes nesta família foram descritos, mas apenas *CYP3A4* e *CYP3A5* parecem ser relevantes em adultos. *CYP3A7* é expresso apenas no fígado fetal e *CYP3A43* é de significado incerto. Tanto o metabolismo de primeira passagem como a depuração sistêmica de medicamentos metabolizados pelo *CYP3A5* são suscetíveis a diferentes alterações na expressão enzimática. O alelo variante para o *CYP3A5* (* 3), pode resultar em mRNA truncado com perda de expressão da proteína funcional em homozigotos ou heterozigotos, ou codificar a proteína não funcional (Birdwell et al, 2015).

Genes localizados fora do locus *CYP3A* parecem também influenciar o fenótipo *CYP3A*, como polimorfismos nos genes *PPARA*, que foram relatados por explicar parte da variabilidade da atividade hepática do *CYP3A* em humanos (Lunde, 2014). De igual modo, foi sugerido recentemente que polimorfismos nos genes da oxirredutase P450 (POR), poderiam modular a atividade de diferentes enzimas do citocromo P450, incluindo *CYP3A*, através da transferência de elétrons microssomais de NADPH para as enzimas P450, possibilitando sua atividade (Jonge et al, 2011).

Dessa forma, variantes genéticas denominados polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs*), são conhecidos por apresentar efeitos na função e estrutura de diversas proteínas. Vários estudos têm mostrado uma associação entre os *SNPs* em genes que codificam enzimas ou transportadores de drogas e diferenças na dose, toxicidade e interações farmacológicas, focando especialmente na relação entre a dose da droga administrada e os níveis sanguíneos da mesma (Gengivir et al, 2016; Cusinato et al, 2014). Diferenças nesta relação podem estar diretamente associadas a *SNPs* nos genes *CYP3A*, *PPARA* e *POR*. Além disso, a frequência de distintos alelos para tais genes pode variar amplamente entre populações (Van Schaik et al., 2002; Suarez-Kurtz et al., 2014). Estudos envolvendo as variáveis genéticas *PPARA* e *POR* ainda são limitados e por isso são necessários mais trabalhos que visem entender o papel de polimorfismos nestes genes no metabolismo de tacrolimus.

A população brasileira é uma das maiores miscigenações étnicas do mundo sendo composta por ancestrais ameríndios, europeus e africanos subsaarianos (Pena et al., 2009). O Maranhão, por sua vez, é um dos estados mais heterogêneos do Brasil e essa característica pode ter implicações na expressão de enzimas que participam do metabolismo de fármacos.

Dessa forma, de acordo com nossos conhecimentos, este estudo é o primeiro da América Latina a avaliar conjuntamente a influência de polimorfismos nos genes *CYP3A*, *PPARA* e *POR* sobre a farmacocinética de tacrolimus. As informações obtidas nesse estudo são potencialmente relevantes e, num futuro próximo, poderão auxiliar no estabelecimento de dosagens terapêuticas

personalizadas, minimizando os efeitos citotóxicos causados pela exposição a concentrações não ajustadas de imunossupressores em pacientes transplantados renais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença Renal Crônica

A Doença Renal Crônica (DRC) é considerada um relevante problema de saúde pública por sua alta prevalência e incidência. Caracterizada principalmente pela diminuição da função renal, esta doença afeta pessoas de todas as idades e raças (ISN, 2017). Estima-se que a prevalência de DRC seja 8-16% em todo o mundo (Jha et al., 2013; Stevens et al., 2007). Mais de 80% de todos os pacientes que recebem tratamento para doença renal em estágio terminal são de países onde a população de idosos é relativamente maior e a disponibilidade de acesso à saúde é menor, sendo que a incidência e prevalência diferem significativamente entre países e regiões do mundo (Webster, 2016).

Segundo dados do último inquérito nacional da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN, 2016), o número total estimado de pacientes com DRC no país em 2016 foi de 122.825. Este número representa um aumento de 31,5 mil (6,3%) pacientes nos últimos 5 anos (91.314 em 2011). A Tabela 1 mostra estimativas do número total de pacientes com doença renal crônica em tratamento dialítico e das taxas de prevalência no Brasil por estado no ano de 2016, dentre estes estão os dados relacionados aos pacientes com DRC em diálise no Estado do Maranhão, sendo o segundo estado com menores índices.

O relatório global da Sociedade Internacional de Nefrologia (ISN, 2017), destaca dentre os grupos de maior risco para DRC: diabetes mellitus (DM), hipertensão, doença cardiovascular e doença autoimune. Diabetes mellitus responde por 30–50% de todos os casos de DRC e afeta 285 milhões (6,4%) de adultos em todo o mundo.

O diagnóstico de DRC baseia-se na redução crônica da função renal irreversivelmente e danos estruturais nos rins (Webster et al., 2017). A Lesão Renal Aguda (LRA) ocorre quando há um rápido declínio na taxa de filtração glomerular (TFG), geralmente acompanhada de prejuízos à microcirculação, inflamação e/ou lesão tubular ou necrose e fluxo sanguíneo renal reduzido (Basile, 2012).

A LRA é iniciada por várias injúrias clínicas, incluindo uma perfusão inadequada do rim, sepse, agentes nefrotóxicos e doenças de base (DM, hipertensão, obesidade). Após lesão renal leve, pode ocorrer um reparo como resposta adaptativa levando à regeneração renal. Contudo, com lesões mais graves, a regeneração é incompleta e o tecido do néfron pode ser

substituído por tecido cicatricial, levando à DRC e incluindo a deposição de excesso de matriz extracelular, particularmente colágeno, no glomérulo e no interstício tubular do rim. As alterações patológicas associadas à DRC incluem glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial, que resultam na perda da arquitetura renal normal, rarefação capilar microvascular, hipóxia e atrofia tubular (Mullins, 2016).

A hipóxia tubulointersticial, a inflamação e o estresse oxidativo formam um ciclo vicioso na progressão da doença renal crônica. A lesão glomerular resulta numa diminuição do fluxo sanguíneo dos capilares peritubulares (PTCs) e subsequente hipóxia tubulointersticial. Hipóxia e proteinúria causam lesão tubular que por sua vez desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas e promovem um infiltrado de células inflamatórias no interstício tubular (Figura 1). Os PTCs danificados também facilitam a infiltração de células inflamatórias. Hipóxia, inflamação e estresse oxidativo promovem a transdiferenciação de fibroblastos residentes, levando a produção de Matriz Extracelular (MEC). A fibrose ainda prejudica a oxigenação local (Yamaguchi, 2015). Estas alterações levam à perda da capacidade de filtração renal e, finalmente, a doença renal terminal (Mullins, 2016).

O transplante renal é o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal crônica em estágio terminal, conferindo melhor sobrevida a longo prazo e qualidade de vida quando comparado aos pacientes em diálise. O Programa Brasileiro de Transplante de Órgãos, classificou o Brasil como o segundo país em número absoluto de transplantes no ano de 2015, e este progresso ocorreu devido a um série de fatores, incluindo a própria importância do transplante como tratamento alternativo para pacientes com DRC, disponibilidade de tratamento, melhora na manutenção de potenciais doadores (doador cadáver), consentimento familiar, além de avanços nas técnicas cirúrgicas nos últimos 50 anos, melhor conhecimento sobre a terapia imunossupressora utilizada, e a introdução de novos agentes imunossupressores (Nga et al, 2018).

Tabela 1. Número de pacientes com DRC em tratamento dialítico crônico e prevalência estimada por Estado em 2016.

Unidade da Federação	Nº de Pacientes	Taxa de prevalência/milhão da população
Acre	68	83
Alagoas	1606	478
Bahia	8227	539
Ceará	4551	508
Distrito Federal	2172	730
Espírito Santo	2141	539
Góias	3969	593
Maranhão	1855	267
Minas Gerais	16499	786
Mato Grosso do Sul	1818	678
Mato Grosso	1776	537
Pará	3120	377
Paraíba	1227	307
Pernambuco	5152	548
Piauí	1674	521
Paraná	7299	649
Rio de Janeiro	12694	763
Rio Grande do Norte	2003	576
Rondônia	1148	742
Roraima	408	793
Rio Grande do Sul	6695	593
Santa Catarina	3285	475
São Paulo	28716	642
Sergipe	1013	447
Tocantins	625	408

Fonte: Relatório anual da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2016 (Estimativa não pôde ser feita para os estados do Amazonas e do Amapá por falta de dados).

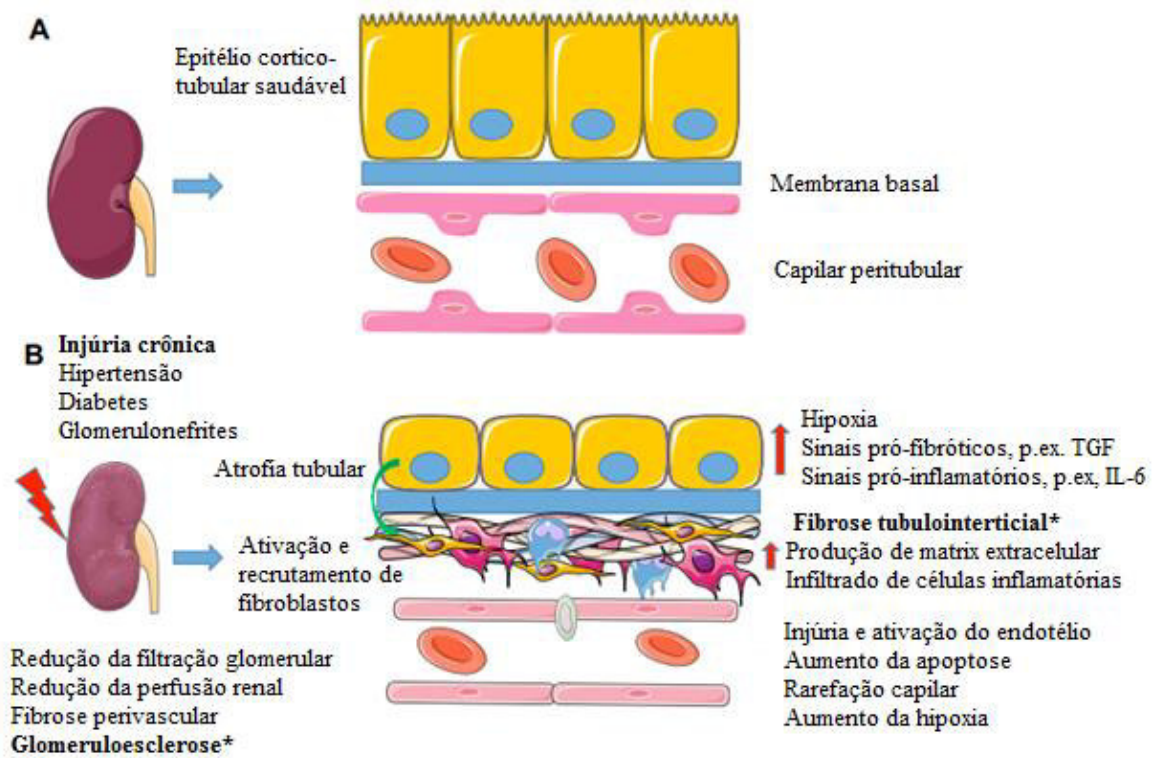


Figura 1. Processos fisiopatológicos ligados à doença renal. (A) Um rim normal e saudável (esquerda) e uma visão ampliada da estrutura de um túbulo e sua vasculatura associada (direita). (B) Um rim cronicamente doente, mostrando os processos que levam à fibrose tubulointerstitial. (Mullins *et al*, 2016).

2.2. Imunossupressores

A introdução da imunossupressão na rotina clínica foi determinante para manutenção funcional do órgão transplantado e consequente aumento do tempo de sobrevida do enxerto, uma vez que, uma importante limitação no transplante de órgãos é o risco de rejeição (Calne et al., 1978; Naesens et al., 2009).

O tacrolimus (FK506) (Figura 2) é um agente imunossupressor considerado pilar da imunossupressão, administrado aos receptores de transplantes de órgãos sólidos para prevenir e tratar a rejeição de aloenxertos (Barbarino et al, 2013). O tacrolimus, conhecido comercialmente como PROGRAF®, é um macrolídeo policíclico (peso molecular 822 Daltons) produzido pelo fungo *Streptomyces tsukubaensis*, eficaz e com potente atividade imunossupressora, *in vitro* e *in vivo* (Abbud Filho e Ramalho, 1997).

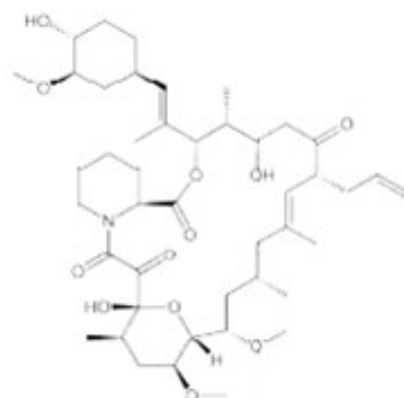


Figura 2. Estrutura química do tacrolimus. (Cusinato, 2014).

Para exercer seu efeito terapêutico, o tacrolimus se liga ao seu alvo citoplasmático, a proteína de ligação FKBP; o complexo droga-proteína se liga a calcineurina, uma calmodulina dependente de cálcio, que atua promovendo a desfosforilação do componente citosólico do Fator Nuclear de células T Ativadas (NFATc). A inibição da ação da calcineurina resulta em um bloqueio completo na translocação do componente citosólico, resultando na inativação do Fator Nuclear de células T Ativadas (NFAT), promovendo uma falha na ativação dos genes regulados pelo fator de transcrição NFAT, como os genes expressores das interleucinas (IL-2 e IL-4), resultando na inativação dos Linfócitos T (Steffan Ho et al, 1996). O tacrolimus exibe efeitos semelhantes à ciclosporina, mas em concentrações 100 vezes menores (Barbarino et al, 2013).

A figura 3 ilustra o mecanismo de ação do tacrolimus.

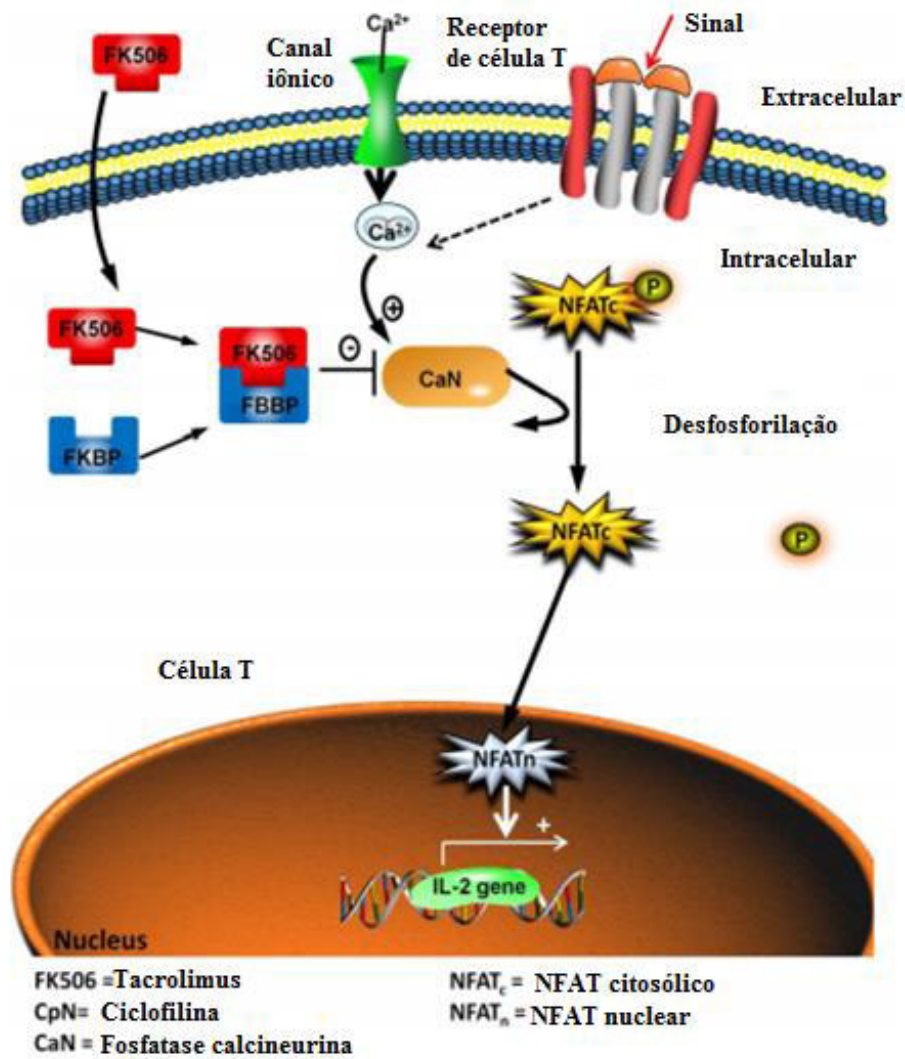


Figura 3. Mecanismo de ação do tacrolimus (FK506). No citoplasma, o tacrolimus (FK506) liga-se a proteína de ligação a imunofilina FK506 (FKBP). O complexo resultante então se liga à enzima calcineurina (CaN), impedindo a desfosforilação do componente citoplasmático do núcleo fator de células T ativadas (NF-ATc). Isso bloqueia o transporte de NF-ATc para o núcleo, impedindo a ligação de NF-ATn ao promotor nuclear do gene da interleucina-2 (IL-2). Consequentemente, as células T não produzem IL-2, o que é necessário para a ativação completa das células T (Bennet et al, 2016).

O tacrolimus foi aprovado em 1994 pelo *US Food and Drug Administration* como uma medicação antirejeição para transplante de fígado. Atualmente, é uma das drogas imunossupressoras de maior efetividade no transplante, mas seu uso clínico é dificultado por uma estreita janela terapêutica (Figura 4) e grande variabilidade farmacocinética intra e interindividual. Isto pode levar a uma subexposição, aumentando potencialmente o risco de rejeição, ou superexposição, levando a uma toxicidade, incluindo nefrotoxicidade, hipertensão, neurotoxicidade e hiperglicemia (Birdwell et al, 2015). Consequentemente, o monitoramento terapêutico da droga é atualmente considerado como parte vital da prática clínica em transplante renal (Cusinato et al, 2014).

Vários fármacos interferem no metabolismo de tacrolimus aumentando ou diminuindo o seu nível sérico, como o fluconazol, cetoconazol, claritromicina, eritromicina, diltiazem e anlodipina, os quais aumentam a concentração do imunossupressor (conhecidos como indutores da enzima CYP3A5) e outros a diminuem, como a fenitoína, rifampicina, isoniazida e barbitúricos (inibidores de CYP3A5). O uso concomitante destes medicamentos não está contraindicado, mas exige monitorização criteriosa dos níveis sanguíneos do imunossupressor (MS, 2014).

Dentre os indutores da enzima CYP3A5, alguns fármacos devem ser especialmente considerados, como os bloqueadores dos canais de cálcio (utilizados no tratamento de algumas doenças cardiovasculares) e antifúngicos azólicos comumente co-administrados em pacientes transplantados (Birdwell. 2015).

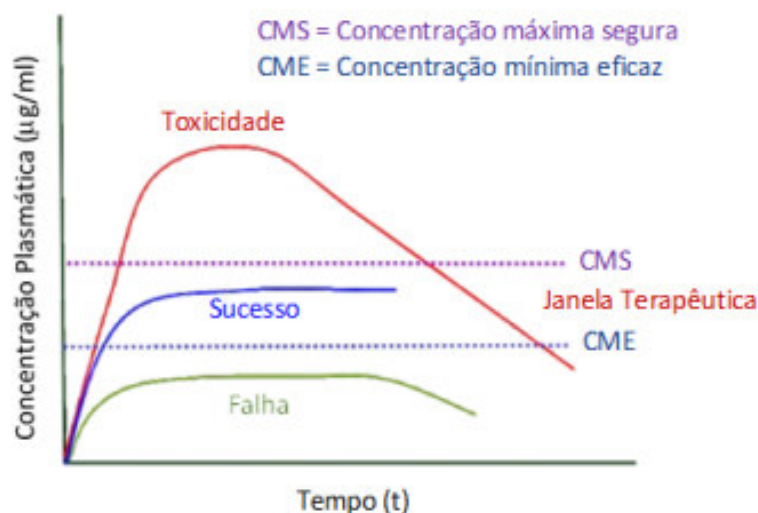


Figura 4. Perfil farmacocinético - Relação entre a concentração máxima em função do tempo e a janela terapêutica. (Adaptado de Lüllmann, 2005).

2.3 Polimorfismos genéticos

O mais simples e comum tipo de variação no genoma humano são os polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*), caracterizados pela substituição de uma única base nitrogenada em uma localização específica no genoma. Sua determinação pode ser valiosa em testes de associação com doenças e características farmacocinéticas (Halushka et al, 1999). Por este motivo, parte da grande variabilidade farmacocinética entre os indivíduos pode ser explicada por *SNPs* em genes que codificam enzimas metabolizadoras de drogas ou transportadores de drogas. Nesse contexto, enzimas do citocromo P450 3A (*CYP3A*) que participam do metabolismo de tacrolimus, apresentam sua atividade amplamente determinada por *SNPs*. A variante *CYP3A5* *3 (rs776746; A> G), que resulta em um mRNA com *splicing* alternativo e uma proteína truncada e não funcional, é o exemplo clássico deste polimorfismo. Esta variante é prevalente em muitas populações, e na maioria dos caucasianos (aproximadamente 80%), a proteína codificada pelo *CYP3A5* é predominantemente não funcional (indivíduos com genótipo homozigoto - *3/*3) (Lunde et al, 2014). Dessa forma, os pacientes portadores do alelo não funcional *CYP3A5* *3 (rs776746; G>A), parecem necessitar de uma dose menor de tacrolimus para atingir as concentrações alvo em comparação com os pacientes portadores do alelo funcional *CYP3A5* *1 (rs776746; A>A)

(Kursawski et al, 2014).

Genes localizados fora do locus *CYP3A* também parecem influenciar o fenótipo *CYP3A*. Duas variantes de sequência no gene de codificação do receptor nuclear proliferador de peroxissomo ativado, o receptor alfa (*PPARA-alfa*), foram recentemente reconhecidas como potenciais contribuintes para as atividades intra e interindividuais na variabilidade da expressão e atividade do *CYP3A*. As variantes do *PPARA*, (rs4823613; A> G e rs4253728; G>A), foram relatados por explicar 8–9% da variabilidade da atividade hepática do *CYP3A* em humanos (Lunde et al, 2014).

A oxidorreductase P450 (POR) é responsável por permitir a atividade das enzimas do citocromo p450. Pacientes portadores de pelo menos um alelo T do *SNP* rs1057868 (também conhecido como *POR* *28) apresentaram concentrações de tacrolimus significativamente menores nos primeiros dias após o transplante, e parecem requerer doses mais altas para manter as concentrações alvo no primeiro ano após a cirurgia, em comparação com os homozigotos do tipo selvagem. No entanto, este efeito foi observado apenas em receptores que eram expressores do *CYP3A5* (ou seja, portadores do alelo *CYP3A5* *1). Embora não esteja claro, acredita-se que este *SNP* possa modificar a interação POR-citocromo, afetando a atividade das enzimas CYP (Barbarino, 2013).

Zhang et al. (2013), relataram que os *SNPs* no gene *POR* influenciam as taxas de metabolismo do fármaco mediado pelo citocromo P450. No entanto, esta relação entre a variante do gene *POR* e enzimas do citocromo P450, especialmente *CYP3A5*, somente foi observada apenas nos primeiros dias pós-transplante. Outros estudos relatam que os polimorfismos *POR* (rs1057868; C>T) pode estar associados à atividade do *CYP3A* e que esta relação poderia influenciar a farmacocinética do tacrolimus (Chuan-Jiang Li et al, 2014).

A sequência variante do *POR* *28 (rs1057868; C>T), induz a substituição de um aminoácido (p.Ala503Val), influenciando na porção de ligação do elétron de *POR*. A variante alélica *POR**28 foi associado com diferentes efeitos, dependendo da enzima CYP e o substrato investigado. Em relação a droga midazolam (um medicamento ansiolítico), expressores *CYP3A5*, ou seja, indivíduos que expressam os 2 alelos funcionais (*1/*1), carregando um ou dois alelos *POR**28 (*1/*28; *28/*28) mostraram uma redução de 45% da razão metabólica desta droga; e em relação ao tacrolimus, estes indivíduos necessitaram de uma dose maior em comparação com os expressores *CYP3A5* (*1/*1) sem o alelo *POR**28 (*1/*1) (Lunde et al, 2014).

De acordo com os estudos acima descritos, a genotipagem individual para os polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* poderia auxiliar no estabelecimento de

dosagens terapêuticas personalizadas na fase crítica inicial do pré-transplante, refletindo em resultados positivos no prognóstico pós-transplante, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, minimizando os efeitos citotóxicos causados pela exposição a concentrações não ajustadas de imunossupressores em pacientes transplantados renais e com isso aumentando a sobrevida do enxerto.

2.4 Nefrotoxicidade por fármacos

Os principais efeitos adversos associados ao tratamento com inibidores da calcineurina (IC) são neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hipertensão, hiperglicemia, distúrbios gastrointestinais, infecções e malignidade (Barbarino, 2013). A nefrotoxicidade por IC se manifesta como lesão renal aguda (LRA), que é amplamente reversível após a redução da dose, ou como doença renal crônica progressiva, que geralmente é irreversível. Outros efeitos renais da IC incluem disfunção tubular e, raramente, uma Microangiopatia Trombótica (MAT) que pode levar à perda renal aguda do aloenxerto (Burdmann et al, 2003).

O tacrolimus é potencialmente nefrotóxico e pode acarretar disfunção renal, sugerindo uma característica comum a essa classe de drogas (inibidores da calcineurina). A toxicidade por IC é observada com mais frequência em receptores de transplante renal, mas foi relatada em outras populações, incluindo transplante de células hematopoiéticas e receptores de transplante de órgãos sólidos não renais (Barbarino, 2013).

A nefrotoxicidade consiste na vasoconstrição e isquemia do rim, causadas por mediadores (angiotensina, endotelina) e pela inibição da produção de óxido nítrico. Esses eventos, associados à indução do fator de crescimento fibrinogênico, originam a vasculopatia obliterativa e fibrose intersticial. Essa nefrotoxicidade é proporcional à quantidade de droga administrada, sendo que sua incidência aumenta com o tempo e nos casos de doses superiores a 5 mg/Kg/dia, nos quais a nefrotoxicidade alcança 100% em até 10 anos (Saturnino et al, 2012).

A toxicidade vascular renal, pela terapia com IC, afeta primariamente as arteríolas e é progressiva na exposição prolongada a esses agentes. Lesão celular incluindo músculo liso ou vacuolização endotelial, perda da definição de células musculares lisas, necrose e apoptose foram relatadas em arteriopatias de toxicidade aguda por IC (Mihatsch, 1994; Neild, 1985; Colvin, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* sobre farmacocinética de tacrolimus em pacientes transplantados renais.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar clínica e demograficamente a população de pacientes transplantados renais do Maranhão em uso do imunossupressor tacrolimus;
- Descrever a distribuição das frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos nos genes *CYP3A5* (rs776746), *PPARA* (rs4823613; A>G e rs4253728; G>A) e *POR* (rs1057868) em pacientes transplantados renais na população maranhense;
- Avaliar possível associação entre polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* com a farmacocinética de tacrolimus.
- Analisar possível associação entre a presença de polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* com a etnia, função hepática e função renal, através dos marcadores séricos, dos pacientes transplantados renais do Maranhão;

REFERÊNCIAS

- ABBUD M and RAMALHO H J. **Renal Transplant Update: New Agentsimmunosuppressants**. 1997. J. Bras. Nefrol; 19(2): 215-223.
- BARBARINO J M, STAATZ C E, *et al.* **PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways**. 2013. Pharmacogenetics and Genomics; v.23, n.10, Oct, p.563-585.
- BASILE D P, ANDERSON M D and SUTTON T A. **Pathophysiology of acute kidney injury**. 2012. Compr. Physiol; 2, 1303-1353.
- BIRDWELL K A, DECKER B, BARBARINO J M, *et al.* **Clinicalpharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing**. 2015. Clinical Pharmacology & Therapeutics; v. 98, nº 1.
- BURDMANN E A, ANDOH T F, YU L, BENNETT W M. **Cyclosporine nephrotoxicity**. 2003. SeminNephrol; v. 23 (5): 465.
- CALNE R Y, PENTLOW B D, *et al.* **Cyclosporin-Ain Patients Receiving Renal-Allografts from Cadaver Donors**. 1978. Lancet; v.2, n.8104, p.1323-1327.
- COLVIN R B. **Renal transplant pathology**. 1998. Lippincott-Raven; p. 1471-89.
- CUSINATO D A C, LACCHINI R, ROMAO E A, *et al.* **Relationship of CYP3A5 genotype and ABCB1 diplotype to tacrolimus disposition in Brazilian kidney transplant patients**.2014. Br J ClinPharmacol; v.78, p. 364-372.
- EICHELBAUM M, BURK O. **CYP3A genetics in drug metabolism**. 2001. Nature Medicine; v.7, n.3, Mar, p.285-287.
- GENVIGIR F D V, SALGADO P C, FELIPE C R, *et al.* **Influence of the CYP3A4/5 genetic score and ABCB1 polymorphisms on tacrolimus exposure and renal function in Brazilian kidney transplant patients**. 2016.Pharmacogenetics and Genomics; v.26 Nº 10.
- HALUSHKA M K, FAN J B, BENTLEY K, *et al.* **Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis**. 1999. NatureGenetics; v. 22, p. 239–247.
- ISN, **International Society of Nephrology**. Global Kidney Health Atlas (2017). <https://www2.theisn.org/GKHA>
- JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI, K, Li Z, *et al.* **Chronic kidney disease: global dimension and perspectives**. 2013. Lancet 382, 260-272.

JONGE H, METALIDIS C, NAESENS M, *et al*, **The P450 oxireductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients.** 2011. *Pharmacogenomics*; v.12 (9), 1281 – 1291.

KRAU, S. D. **Cytochrome p450 Part 2 What Nurses Need to Know About the Cytochrome p450 Family Systems.** 2013. *Nursing Clinics of North America*; v.48, n°.4, Dec, p.681.

KURZAWSKI M, MALINOWSKI D, DZIEWANOWSKI K and DROŹDZIKA M. **Impact of PPARA and POR polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and new-onset diabetes in kidney transplant recipients.** 2014. *Pharmacogenetics and Genomics*; v.24 n° 8.

LAMBA, J. K., Y. S. LIN, *et al*. **Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism.** 2012. *Advanced Drug Delivery Reviews*; v.64, Dec, p.256-269.

LI C-J, LI L, LIN L, JIANG H-X, ZHONG Z-Y, *et al*. **Impact of the CYP3A5, CYP3A4, COMT, IL-10 and POR Genetic polymorphisms on tacrolimus metabolism in Chinese renal transplant recipients.** 2014. *PloSONE*; v.9.

LÜLLMANN H, MOHR K, HEIN L, BIEGER D, *Color Atlas of Pharmacology*. 2005. Thieme; 3ª edição, p 47 e 60.

LUNDE I, BREMER S, MIDTVEDT K, *et al*. **The influence of CYP3A, PPARA and POR genetics variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients.** 2014. *Eur J ClinPharmacol*; v.70, p.685-693.

MIHATSCH M J, RYFFEL B, GUDAT F, THIEL G. **Cyclosporine nephropathy renal pathology with clinical and functional correlations.** 1994. Lippincott; p. 1641-81.

MULLINS L J, CONWAY B R, MENZIES R I, DENBY L and MULLINS J J. **Renal disease pathophysiology and treatment: contributions from the rat.** 2016. *Disease Models & Mechanisms*; v.9, p.1419-1433.

MS. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas.** 2014. Portaria SAS/MS nº 712, de 13 de agosto de 2014.

NAESENS M, KUYPERS D R J, *et al*. **Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity.** 2009. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*; v.4, n.2, Feb, p.481-508.

NEILD G H, REUBEN R, HARTLEY R B and CAMERON J S. **Glomerular thrombi in renal allografts associated with cyclosporin treatment.** 1985. *J ClinPathol*; v. 38, p.253-8.

NEILD G H, ROCCHI G, IMBERTI L, *et al*. **Effects of cyclosporine on prostacyclin synthesis by vascular tissue in rabbits.** 1983. *Transplant Proc*; v.15, p.2398-400.

NGA H S, ANDRADE L G M, CONTTI M M, *et al.* **Evaluation of the 1000 renal transplants carried out at the University Hospital of the Botucatu Medical School (HCFMB) - UNESP and their evolution over the years.** 2018. *Braz. J. Nephrol*; v.40 (2), p.162-169.

PENA, S. D., L. BASTOS-RODRIGUES, *et al.* **DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians.** 2009. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.10, Oct, p.870-6.

SESSO R C, LOPES A A, THOMÉ F S, **Brazilian Chronic Dialysis Survey** 2016. Sociedade Brasileira de Nefrologia – SBN.

STEFFAN H, CLIPSTONE N, TIMMERMAN L, Northrop J, *et al.* **Action mechanism of CsA and FK506.** 1996. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 80, n.3, p. S40 – S45.

STEVENS, P E, O'DONOGHUE, D J, LUSIGNAN, S, VAN VLYMEN, J, *et al.* **Chronic kidney disease management in the United Kingdom: NEOERICA project results.** 2007. *Kidney Int*; v.72, p.92-99.

SUAREZ-KURTZ, G D D. VARGENS, *et al.* **Global pharmacogenomics: distribution of CYP3A5 polymorphisms and phenotypes in the Brazilian population.** 2014. *PLoS One*, v.9, n.1, p.e83472.

VAN SCHAIK, R. H. N., I. P. VAN DER HEIDEN, *et al.* **CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians.** 2002. *Clinical Chemistry*; v.48, n.10, Oct, p.1668-1671.

WEBSTER A C, NAGLER E V, MORTON R L, MASSON P. **Chronic Kidney disease.** 2017. *Lancet*; v.389, p.1238-52.

WOLFE J A, MCCANN R L and SANFILIPPO F. **Cyclosporine associated microangiopathy in renal transplantation: a severe but potentially reversible form of early graft injury.** 1986. *Transplantation*; v.41, p.541-4.

YAMAGUCHI Y, TERAOKA S, YAGISAWA T, TAKAHASHI K, TOMA H, OTA K. **Ultrastructural study of cyclosporine-associated arteriolopathy in renal allografts.** 1989. *Transplant Proc*; v.21, p.1517-22.

ZANGER, U M. e SCHWAB M. **Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation.** 2013. *Pharmacology & Therapeutics*; v.138, n.1, Apr, p.103-141.

ZHANG J-J, ZHANG H, DING X-L, Ma S, Miao LY, **Effect of the P450 oxidoreductase *28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese healthy male volunteers.** 2012. *Eur J ClinPharmacol*; v.69, p.807–812.

ZOJA C, FURCI L, GHILARDI F, ZILIO P, BENIGNI A, REMUZZI G. **Cyclosporine induced endothelial injury**. 1986. Lab Invest; v.55, p.455-62.

ARTIGO

TÍTULO: Genótipo CYP3A5, uma variante genética independente e determinante na farmacocinética de tacrolimus em pacientes transplantados renais.

POSSÍVEIS REVISTAS PARA SUBMISSÃO:

- **European journal of clinical pharmacology**
Fator de impacto / 2018: 2.7
Qualis A2
- **Transplantation**
Fator de impacto / 2018: 3.9
Qualis A2
- **Pharmacogenomics**
Fator de impacto / 2018: 2.3
Qualis B1
- **Pharmacogenetics and Genomics**
Fator de impacto / 2018: 2.2
Qualis B1

CYP3A5 genotype, an independent and determinant genetic variant in tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients

Introdução

A doença renal crônica (DRC) é um relevante problema de saúde pública afetando pessoas de todas as idades e raças. A DRC é caracterizada pela diminuição da função renal [1] e surge a partir de diferentes doenças que alteram irreversivelmente a função e estrutura do rim, como diabetes mellitus e a hipertensão [2]. Estima-se que a prevalência da DRC seja de 8 – 16% em todo o mundo [3].

O transplante renal é o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal crônica, conferindo melhor sobrevida e qualidade de vida [4]. O risco de rejeição é uma importante limitação do transplante. Contudo, a introdução da imunossupressão na rotina clínica foi determinante para manutenção funcional do órgão transplantado [5, 6].

Atualmente, o tacrolimus é um das drogas imunossupressoras de maior efetividade no transplante, mas seu uso clínico é dificultado por apresentar uma estreita janela terapêutica e grande variabilidade farmacocinética intra e interindividual. Tais características desse fármaco pode resultar em imunossupressão insuficiente, levando ao aumento do risco de rejeição do aloenxerto, ou super imunossupressão e aumento da incidência de efeitos adversos, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade [7,8].

Enzimas da família do citocromo P450 (CYP) 3A são responsáveis pelo metabolismo oxidativo do tacrolimus. A atividade da enzima CYP3A5 é amplamente determinada pela variante de nucleotídeo único (SNP rs776746; A> G). Alelos variantes para o *CYP3A5* (*3) pode resultar em mRNA truncado com perda de expressão da proteína funcional em homozigotos mutantes [9].

Os indivíduos com pelo menos uma cópia do nucleotídeo A são definidos como tendo o alelo *1 então conhecidos como expressores *CYP3A5*, enquanto aqueles homozigotos que apresentam os nucleotídeos GG na posição 6986 portadores *3/*3 são conhecidos como não expressores *CYP3A5* [10].

Alguns estudo têm evidenciado que genes localizados fora do locus *CYP3A* também podem influenciar o fenótipo *CYP3A*, como as variantes de sequência no gene de codificação do receptor nuclear proliferador de peroxissomo ativado, o receptor alfa (*PPARA*), foram

recentemente reconhecidas como potenciais contribuintes para as atividades intra e interindividuais na variabilidade da expressão e atividade do *CYP3A*. As variantes do *PPARA*, (rs4823613; A>G e rs4253728; G>A), foram relatados por explicar 8–9% da variabilidade da atividade hepática do *CYP3A* em humanos [11].

A oxidoredutase P450 (POR) é responsável por permitir a atividade das enzimas do citocromo P450, através da transferência de elétrons microsossomais de NADPH. O *POR* humano é altamente polimórfico e a mais comum sequência variante, *POR* *28 (rs1057868; C>T), induz a substituição de um aminoácido (p.Ala503Val), que influencia na porção de ligação do elétron de *POR* [12]. Pacientes portadores de pelo menos um alelo variante (*POR* *1/*28 ou *POR**28/*28) podem apresentar concentrações de tacrolimus significativamente menores nos primeiros dias após o transplante, em comparação com os homozigotos do tipo selvagem (*POR**1/*1). Acredita-se que este SNP possa modificar a interação POR-citocromo, afetando a atividade das enzimas CYP em portadores de pelo menos um alelo *CYP3A5* *1 [8].

Embora existam alguns trabalhos [7,9,10] sobre a influência de polimorfismos no gene *CYP3A5* sobre a farmacocinética de tacrolimus, ainda são raros os estudos avaliando o impacto de polimorfismos nos genes *PPARA* e *POR* sobre a atividade de CYP. Além disso, os trabalhos existentes são de populações predominantemente caucasianas [10, 11, 14]. Nesse contexto, se faz necessário entender o papel de polimorfismos, especialmente *PPARA* e *POR*, sobre a farmacocinética de tacrolimus.

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação das variantes alélicas dos genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* sobre a farmacocinética de tacrolimus em pacientes transplantados renais no primeiro ano pós-transplante em uma população miscigenada do nordeste brasileiro.

Materiais e métodos

Tipo de estudo e amostra

O presente estudo é retrospectivo observacional, no qual foram incluídos pacientes transplantados renais acompanhados pelo Serviço de Referência em Transplantes do estado do Maranhão - HUUFMA. Todos os participantes foram tratados com o agente imunossupressor tacrolimus por pelo menos 12 meses sem interrupção do tratamento. Pacientes tratados com fármacos capazes de interferir no metabolismo do tacrolimus, portadores de doenças hepáticas graves, usuários crônicos de álcool, drogas e/ou antiinflamatórios não-esteróides, receptores de duplo transplante (fígado/rins) não foram incluídos no estudo. Um total de 189 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e não apresentou nenhum parâmetro de não inclusão,

assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Destes, um total de 100 pacientes transplantados renais foram selecionados (por apresentarem pelo menos 3 dosagens plasmáticas da droga durante o primeiro ano pós-transplante) e analisados no presente estudo para presença de polimorfismos nos genes *CYP3A5* (rs776746; A>G) *PPARA* (variantes polimórficas rs4823613; A>G e rs4253728; G>A) e *POR* (rs1057868; C>T). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da UFMA.

Dados clínicos, terapia imunossupressora e concentração da droga

Os dados clínicos (dose, concentração plasmática de tacrolimus, marcadores de funções renais e hepáticas) e demográficos (idade, sexo e peso) referentes aos primeiros 12 meses pós-transplante foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Todos os pacientes receberam tratamento imunossupressor baseado em inibidor da calcineurina, o tacrolimus. A dose inicial foi de 0,1 a 0,2 mg/kg/dia via oral, duas vezes ao dia; podendo ser ajustada ao longo do acompanhamento pós-transplante de acordo com a concentração plasmática da droga. O intervalo terapêutico alvo da droga deve variar de 8 - 9 ng/ml no primeiro mês pós-transplante, de 6 – 8 ng/ml no segundo mês pós-transplante, a partir do terceiro mês até 1 ano deve variar de 4 – 7 ng/ml, após este período, de 3 – 5 ng/ml (esquema de uso concomitante com corticóide); conforme protocolo clínico estabelecido pelo Serviço de Transplantes do HUUFMA. As amostras de sangue foram coletadas exatamente antes da administração da dose matinal e 12 horas após a administração da última dose, para a determinação dos níveis de concentração plasmática (*Co*) utilizando o método imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (AbbottDiagnostics, IL, USA). A dose ajustada pela concentração sanguínea (*Co/D*) foi calculada pela divisão da concentração da droga (*Co*) (µg/mL) pela correspondente dose (mg/dia) administrada em 24 horas. Os valores obtidos pela razão *Co*/dose (µg/mL/mg) correspondentes à 1 mês, 3 meses e 12 meses pós-transplante, foram usados para análises estatísticas.

Extração de DNA genômico e tipagem molecular

O DNA genômico foi isolado a partir de 200µL do sangue total utilizando o Biopur Kit de Extração Mini Spin Plus (Biometrix, PR, Brasil). Os principais polimorfismos descritos para os genes *CYP3A5* (rs776746; C>G), *PPARA* variantes polimórficas (rs4823613; A>G e rs4253728; G>A) e *POR* (rs1057868; C>T), foram identificados através de PCR em tempo real utilizando ensaios rhAmpTM SNP Genotyping System (IDT – Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). As reações de amplificação foram compostas por 10 ng de DNA e receberam

a adição Master Mix, Repórter, rhAmp SNP assay, H₂O nucleasfree (IDT – Integrated DNA Technologies). A PCR em tempo real foi realizada em equipamento Light Cycler® Nano SW 1.0, seguindo as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 68 °C a 20 segundos. Controles positivos (amostras com genótipos conhecidos para homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante, de cada um dos três genes estudados) e controles negativos foram utilizados em cada reação e a discriminação alélica foi realizada pela medida da fluorescência final dos fluoróforos FAM® (alelo selvagem) e VIC® (alelo variante) presentes nas diferentes sondas utilizadas (IDT – Integrated DNA Technologies, Coralville, USA).

Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando os recursos do software SPSS versão 18.0 (IBM, Chicago, IL, USA). Inicialmente foi realizada a estatística descritiva através do cálculo de medidas de frequência, de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e intervalo interquartilico). O teste qui-quadrado (X^2) foi aplicado para avaliar se a população adere ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,005$). A normalidade das variáveis quantitativas foi aferida através do teste Lilliefors. Após este procedimento, o teste Mann-Whitney e o teste Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn foi selecionado para a análise comparativa das variáveis contínuas entre os grupos genotípicos. Gráficos Box-plot foram construídos para representar a distribuição amostral. O teste Qui-quadrado foi utilizado na análise comparativa das variáveis categóricas. O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para estimar a força de correlação entre os fatores analisados. Além disso, modelos de regressão linear de efeitos múltiplos foram estimados para avaliar o efeito dos genótipos sobre a dose, concentração sérica e concentração ajustada. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

Resultados

Um total de 100 pacientes transplantados renais foi analisado no presente estudo (Tabela 1). Observou-se média de idade de 46,5 ±14,1 anos sendo a maioria da amostra do gênero masculino (54%) e autodeclarada parda (82%). A média de peso variou de 58,6 ± 12,8 a 61,6 ± 13,4 Kg ao longo de 1 ano pós transplante. Variáveis clínicas relacionadas às funções renais e hepáticas são apresentadas na tabela 1.

As frequências genotípicas e alélicas para os genes *CYP3A5* (rs776746), *PPARA* (variantes rs4823613; A>G e rs4253728; G>A) e *POR* (rs1057868) estão apresentadas na Tabela 2. Para

o gene *CYP3A5*, os genótipos heterozigotos (**1/*3*) e homozigotos variantes (**3/*3*) foram os mais prevalentes na amostra, correspondendo a 36% e 51%, respectivamente, sendo o alelo **3* o mais frequente (69%). Em relação ao gene *PPARA*, variantes (rs4823613; A>G e rs4253728; G>A), os genótipos mais prevalentes para a primeira variante foram homozigoto selvagem (A/A) e heterozigoto (A/G), representando 43% e 42%, respectivamente; sendo o alelo A, o de maior frequência (64%). Para a segunda variante *PPARA* (rs4253728; G>A), os genótipos mais prevalentes foram homozigotos selvagens (G/G) e heterozigotos (G/A), apresentando valores de 69% e 26%, respectivamente; e o alelo mais prevalente foi o G (82%). Em relação ao gene *POR* os genótipos homozigotos selvagens (**1/*1*) e heterozigotos (**1/*28*) apresentaram maiores frequências, correspondendo a 57% e 39%, respectivamente. O alelo **1* foi o mais prevalente (77%). A partir do cálculo das frequências genotípicas e alélicas e da aplicação do teste do X^2 (Qui-quadrado, $p < 0,05$), concluiu-se que a população em estudo, encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por outro lado, a análise de correlação entre polimorfismos genéticos e etnia sugeriu que não houve predileção alélica por grupo étnico ($p > 0,05$) (Dados não mostrados).

Na figura 1 observa-se os dados da concentração ajustada de tacrolimus (*Co/D*) nos tempos 1 mês, 3 meses e 12 meses pós-transplante de pacientes transplantados renais de acordo com o genótipo *CYP3A5*, *PPARA* (variantes rs4823613; A>G e rs4253728; G>A) e *POR*. Verificou-se que pacientes portadores de pelo menos um alelo *CYP3A5*1* mostraram uma menor *Co/D* de tacrolimus, quando comparados com os pacientes homozigotos *CYP3A5*3* em todos os tempos analisados. Além disso, foi verificado que os valores de concentração ajustada de tacrolimus, no grupo de pacientes portadores do genótipo variante (*CYP3A5*3*), se acentuam ao longo dos tempos analisados. Observou-se também que não houve diferenças na *Co/D* da droga entre os diferentes genótipos para as variantes polimórficas do gene *PPARA* (rs4823613 e rs4253728) e *POR*.

A Tabela 3 expressa a mediana e intervalo interquartil da concentração ajustada de acordo com a estratificação dos grupos genotípicos. Não foram observadas diferenças significantes na *Co/D* entre os grupos *PPARA* e *POR* quando analisados em expressores *CYP3A5* (**1/*1* e **1/*3*) e não expressores *CYP3A5* (**3/*3*) ($p < 0,05$).

A Tabela 4 apresenta coeficientes obtidos nos modelos de regressão linear múltipla. Através da análise das medidas notou-se que a idade apresentou um efeito de aumentar a concentração ajustada ($\beta = 0,01$; $p = 0,11$). Quanto maior o tempo após o transplante menor foi a dose ($\beta = -2,04$; $p < 0,001$) e a concentração sérica ($\beta = -1,48$; $p < 0,001$), e maior foi a concentração ajustada ($\beta = 0,90$; $p = 0,001$) observada nos pacientes analisados. A presença do

genótipo *CYP3A5* *3/*3 foi um fator relacionado à redução da dose ($\beta = -1,63$; $p < 0,001$) e maior concentração sérica ($\beta = 2,09$; $p < 0,001$) e concentração ajustada ($\beta = 0,90$; $p < 0,001$).

Tabela 1. Caracterização clínica e demográfica dos pacientes transplantados renais do Maranhão, 2007 a 2018.

Variáveis	média $\pm$dp	n	(%)
Idade	46,5 $\pm$ 14,1		
Sexo			
Masculino		54	(54,0)
Feminino		46	(46,1)
Etnia			
Branco		11	(11,0)
Negro		7	(7,0)
Pardo		82	(82,0)
Peso (kg)			
1 mês	58,6 $\pm$ 12,8		
3 meses	60,1 $\pm$ 12,4		
12 meses	61,6 $\pm$ 13,4		
Intervalos de referência*			
Creatinina sérica		0,5 a 1,2 mg/dL	
1 mês	1,84 $\pm$ 1,39		
3 meses	1,61 $\pm$ 0,81		
12 meses	1,49 $\pm$ 0,85		
Ureia sérica		15 a 45 mg/dL	
1 mês	56,1 $\pm$ 29,6		
3 meses	50,2 $\pm$ 30,1		
12 meses	44,5 $\pm$ 25,4		
Potássio sérico		3,5 a 5,1 mEq/L	
1 mês	4,6 $\pm$ 0,5		
3 meses	4,4 $\pm$ 0,4		
12 meses	4,9 $\pm$ 5,5		
Sódio sérico		136 a 145 mEq/L	
1 mês	137,4 $\pm$ 11,8		
3 meses	135,0 $\pm$ 2,8		
12 meses	139,0 $\pm$ 2,1		
TGO		10 a 39 U/l	
1 mês	17,1 $\pm$ 7,6		
3 meses	22,2 $\pm$ 20,0		
12 meses	22,4 $\pm$ 16,7		
TGP		4 a 32 U/l	
1 mês	23,6 $\pm$ 15,1		
3 meses	21,8 $\pm$ 18,0		
12 meses	22,4 $\pm$ 23,4		

$\pm$ dp = desvio-padrão. *Intervalos de referência - Labtest Diagnóstica S/A – Brasil.

Tabela 02. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos genes *CYP3A5*, *PPARA*, *POR* da população de transplantados renais no Maranhão – HUUFMA, 2007 a 2018.

Polimorfismos	Frequências genotípicas	Frequências alélicas	EHW*
<i>CYP3A5</i>	%	%	
*1/*1	13	*1 = 0,31	Sim
*1/*3	36	*3 = 0,69	
*3/*3	51		
<i>PPARA</i> (rs4823613) A>G			
A/A	43	A = 0,64	Sim
A/G	42	G = 0,36	
G/G	15		
<i>PPARA</i> (rs4253728) G>A			
G/G	69	G = 0,82	Sim
G/A	26	A = 0,18	
A/A	5		
<i>POR</i>			
*1/*1	57	*1 = 0,77	Sim
*1/*28	38	*28 = 0,23	
*28/*28	5		

*Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW): Teste Qui-quadrado X^2 ($P < 0,05$).

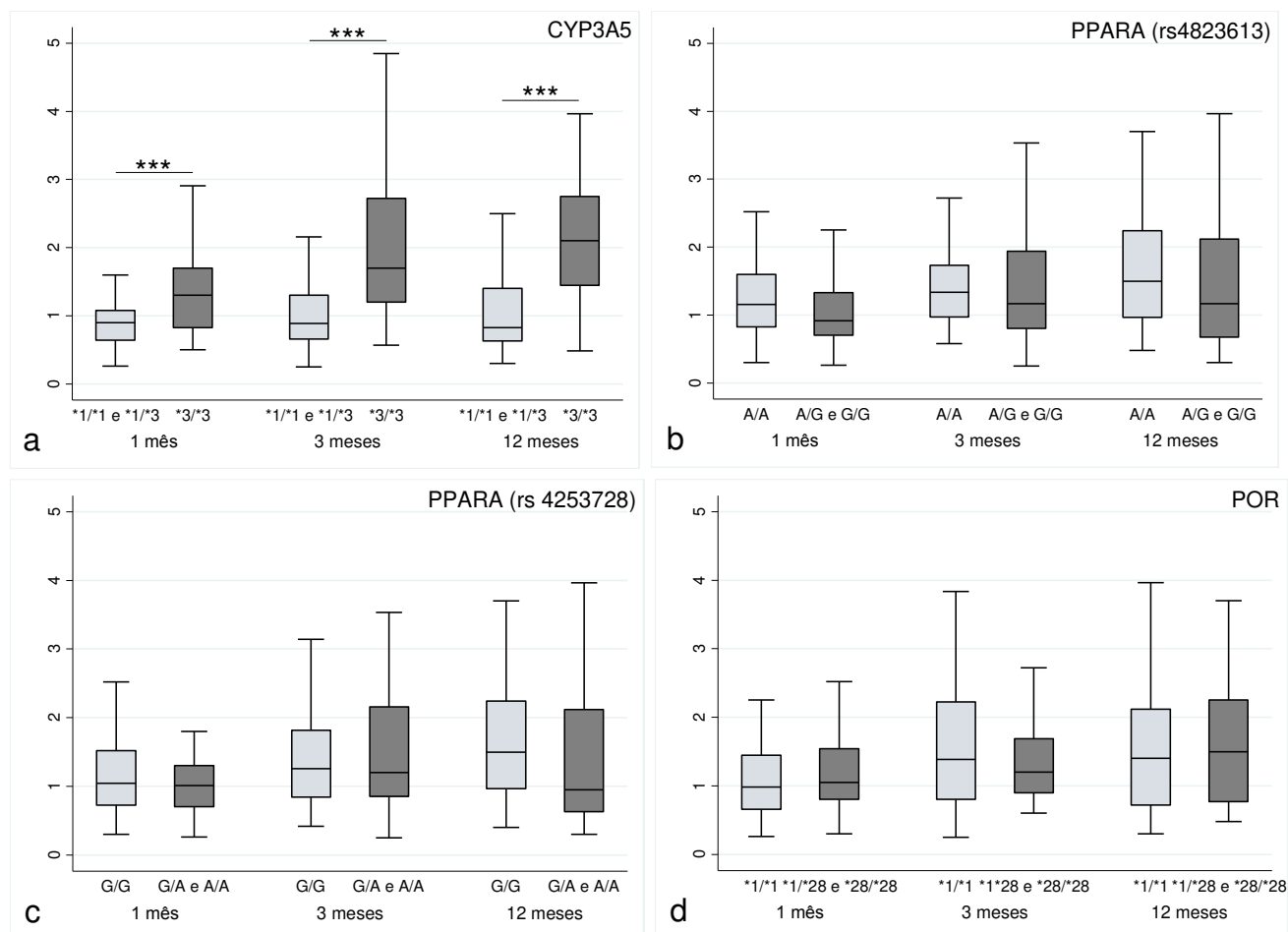


Figura 1. Concentração ajustada de tacrolimus (*Co/D*) nos diferentes genótipos *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* no primeiro ano pós transplante de pacientes transplantados renais. Em (a), pacientes portadores de pelo menos um alelo *CYP3A5**1 mostraram uma menor *Co/D*, quando comparados com os pacientes homozigotos *CYP3A5**3 em todos os tempos analisados; Em (b), (c) e (d) não houve diferenças estatisticamente significantes na *Co/D* entre os diferentes genótipos para as variantes polimórficas do gene *PPARA* (*rs4823613* e *rs4253728*) e *POR*, ao longo de 1 ano pós transplante. ***Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$); Teste Kruskal Wallis.

Tabela 3. Concentração ajustada (Co/D) de tacrolimus nos diferentes genótipos *PPARA* e *POR* em expressores e não expressores de *CYP3A5*, nos tempos 1 mês, 3 meses e 12 meses pós transplante em pacientes renais transplantados do Maranhão – HUUFMA, 2007 a 2018.

Variáveis	CYP3A5 *1/*1 e *1/*3		p	CYP3A5 *3/*3		p
Concentração ajustada (µg*L-1/mg)	PPARA (rs 4823613)			PPARA (rs 4823613)		
1 mês	A/A	A/G e G/G		A/A	A/G e G/G	0,725
3 meses	Med (IIQ)	Med (IIQ)	0,693	Med (IIQ)	Med (IIQ)	0,112
12 meses	0,91 (0,60-1,18)	0,85 (0,68-0,97)	0,236	1,30 (0,82-1,88)	1,27 (0,90-1,51)	0,139
	1,03 (0,65-1,43)	0,85 (0,63-0,90)	0,094	1,50 (1,20-2,72)	2,36 (2,20-2,93)	0,725
	0,92 (0,64-1,50)	0,65 (0,51-0,80)	0,693	2,10 (1,45-2,70)	3,65 (3,65-3,65)	
	0,91 (0,60-1,18)	0,85 (0,68-0,97)		1,30 (0,82-1,88)	1,27 (0,90-1,51)	
	PPARA (rs 4253728)			PPARA (rs 4253728)		
	G/G	G/A e A/A		G/G	G/A e A/A	
Concentração ajustada (µg*L-1/mg)	Med (IIQ)	Med (IIQ)		Med (IIQ)	Med (IIQ)	
1 mês	0,88 (0,57-1,11)	0,92 (0,68-1,08)	0,633	1,39 (0,57-1,11)	1,20 (0,73-1,47)	0,570
3 meses	0,87 (0,65-1,30)	0,96 (0,63-1,17)	0,820	1,59 (1,20-2,72)	2,16 (1,45-2,30)	0,624
12 meses	0,81 (0,63-1,50)	0,85 (0,56-1,13)	0,639	2,10 (1,45-2,90)	2,12 (0,72-2,75)	0,949
	POR (rs1057868)			POR (rs1057868)		
	*1/*1	*1/*28 e *28/*28		*1/*1	*1/*28 e *28/*28	
Concentração ajustada (µg*L-1/mg)	Med (IIQ)	Med (IIQ)		Med (IIQ)	Med (IIQ)	
1 mês	0,81 (0,52-1,13)	0,91 (0,73-1,05)	0,397	1,30 (0,77-1,60)	1,28 (0,95-1,90)	0,422
3 meses	0,85 (0,56-1,30)	1,12 (0,80-1,30)	0,132	1,94 (1,40-2,92)	1,32 (1,16-2,20)	0,057
12 meses	0,90 (0,63-1,40)	0,77 (0,62-1,17)	0,863	2,02 (1,27-2,35)	2,25 (1,79-2,97)	0,147

Med = mediana. IIQ = intervalo interquartil (1º quartil- 3º quartil). Teste Mann-Whitney.

Tabela 4. Análise de regressão linear múltipla do efeito da idade, tempo de transplante e genótipo sobre a dose, concentração sérica e concentração ajustada de tacrolimus.

Fatores	Marcadores da farmacocinética de tacrolimus		
	Dose	Concentração sérica	Concentração ajustada
Idade	$\beta = 0,00$ P = 0,669	$\beta = 0,00$ P = 0,944	$\beta = 0,01$ P = 0,011*
Tempo de transplante	$\beta = -2,04$ P < 0,001*	$\beta = -1,48$ P < 0,001*	$\beta = 0,20$ P = 0,001*
Presença de:			
<i>CYP3A5</i> *3/*3	$\beta = -1,63$ P < 0,001*	$\beta = 2,09$ P < 0,001*	$\beta = 0,90$ P < 0,001*
<i>PPARA</i> (<i>rs4823613</i>) A	$\beta = 0,72$ P = 0,299	$\beta = 1,12$ P = 0,225	$\beta = -0,03$ P = 0,836
<i>PPARA</i> (<i>rs4253728</i>) G/G	$\beta = -0,37$ P = 0,476	$\beta = 0,02$ P = 0,973	$\beta = 0,11$ P = 0,340
<i>POR</i> *1/*1	$\beta = 0,90$ P = 0,035*	$\beta = 0,45$ P = 0,433	$\beta = -0,05$ P = 0,566
Constante (α)	11,04	9,03	0,107
R²	0,25	0,15	0,33

β = coeficiente de regressão. R² = coeficiente de determinação. * Estatisticamente significativo (P < 0,05).

Discussão

No presente estudo, polimorfismos nos genes *CYP3A5* (rs776746; A>G), *PPARA* (variantes rs4823613; A>G e rs4253728; G>A) e *POR* (rs2868177; A> G) foram avaliados. Foram calculadas as frequências genotípicas e alélicas de uma população miscigenada de transplantados renais do Estado do Maranhão localizado no nordeste do Brasil. Também foram realizadas análises da concentração ajustada de tacrolimus (*Co/D*) nos diferentes grupos genotípicos, nos períodos de 1 mês, 3 meses e 12 meses pós transplante.

Os alelos mais frequentes nesta população foram *CYP3A5**3 (69%), *PPARA**A (rs4823613) (64%), *PPARA**G (rs4253728) (82%) e *POR**I (77%). Dessa forma, para o gene *CYP3A5* observou-se que mais da metade dos pacientes (69%) apresentam pelo menos um alelo variante *3, responsável pela perda de função da enzima [8]. Flahault et al. em estudo realizado em pacientes transplantados renais franceses, encontrou a frequência deste alelo igual a 73%; assim como, Cusinato et al. encontrou frequência de 74% em estudo realizado em no estado de São Paulo (Brasil), mostrando a alta prevalência deste alelo em diferentes populações.

No que diz respeito as variantes polimórficas do gene *PPARA*, em estudo realizado na Noruega [11] as frequências dos alelos *PPARA**A (rs4823613) e *PPARA**G (rs4253728), foram 78% e 74%, respectivamente, os mesmos alelos mais frequentes em nossa população. Outro estudo na população polonesa[12] identificou uma frequência de 75% destes mesmos alelos nos dois polimorfismos de *PPARA* (rs4823613 e rs4253728).

O estudo de Lunde et. al realizado com pacientes noruegueses também avaliou o gene *POR*, no qual a frequência do alelo selvagem *POR**I foi 78%. Resultado este bem similar ao encontrado na população do nosso estudo que foi 77%. Em outras populações, como nas chinesas [13] e da Bélgica [14], as frequências de *POR**I foram 70,4% e 72,5%, respectivamente. Estes resultados mostram que os alelos mais prevalentes em diversas populações da Europa e Orientais, também foram os mais frequentes na nossa população, e com valores de frequências próximos, embora a população brasileira, em especial do Maranhão se apresente bastante miscigenada, enquanto nos países supracitados as populações são mais homogêneas.

Os dados da literatura sugerem que a farmacocinética de tacrolimus poderia ser influenciada por sequências variantes em diversos genes. No entanto, nossos resultados mostraram que este efeito tem sido observado apenas para o gene *CYP3A5*. No presente estudo, portadores do alelo não funcional *CYP3A5**3 demonstraram uma razão da concentração ajustada (*Co/D*) maior ($p < 0,05$) em relação aos portadores de pelo menos um alelo funcional *CYP3A5**I, na farmacocinética de tacrolimus (Figura 1 a).

A presença de apenas um alelo do tipo selvagem **1* é suficiente para expressar as proteínas *CYP3A5*. Indivíduos com pelo menos um alelo *CYP3A5 *1* tem maior expressão desta enzima e, portanto, maior metabolismo de tacrolimus e menor concentração (*Co*) da droga no sangue [7]. Este efeito da expressão de pelo menos um alelo funcional sobre a farmacocinética de tacrolimus pôde ser observado em nossos resultados, através dos valores de *Co/D* menores nos indivíduos portando este alelo, ao longo de todo o período estudado (Figura 1 a).

A significativa relação da *Co/D* com as variantes genótípicas *CYP3A5* observadas nos nossos resultados corroboram os dados previamente relatados por Rojas et al. onde polimorfismo *CYP3A5* (6986A<G) em receptores de transplante renal provavelmente influencia a relação *Co/D* do tacrolimus e afeta o risco de nefrotoxicidade. Pacientes com o genótipo variante (*CYP3A5 *3/*3*) exibem uma razão *Co/D* 1,8 a 2,5 vezes maior do que expressores de *CYP3A5 (*1/*1 e *1/*3)* durante o primeiro ano após o transplante, sugerindo que há uma relação destes genótipos com o metabolismo de tacrolimus, e que pacientes com o status expressor *CYP3A5* necessitam de doses mais altas para atingir as concentrações sanguíneas alvo.

Nossos resultados evidenciaram que o polimorfismo *CYP3A5*3* parece ser o determinante genético mais forte da farmacocinética do tacrolimus. Dados similares foram obtidos por Htun et al. que estudando o efeito do polimorfismo do gene *CYP3A5* sobre a exposição ao tacrolimus em pacientes pós transplante renal, encontraram que a razão *Co/D* nos pacientes expressores de *CYP3A5*, foi significativamente menor do que naqueles pacientes não expressores (*CYP3A5*3*). Assim como o presente estudo, eles verificaram que houve diferença na distribuição dos níveis na dose de tacrolimus, concentração da droga (*Co*) e razão *Co/D* em não expressores *CYP3A5*. E que, polimorfismos *CYP3A5*3* desempenham um importante papel na variabilidade da *Co/D* do tacrolimus.

Na análise de regressão linear múltipla realizada no presente estudo, que corresponde a uma análise multivariada de todos os fatores, podemos observar que o genótipo *CYP3A5*3/*3* é um fator independente explicativo para o aumento da concentração sérica ($\beta = 0,01$; $p = 0,01$) e da concentração ajustada ($\beta = 0,90$; $p < 0,001$) e diminuição da dose ($\beta = - 1,63$; $p < 0,001$). Portanto mais relevantes entre os fatores analisados.

Os resultados encontrados em nosso estudo, onde a razão *Co/D*, no primeiro ano pós-transplantes, apresenta valores significativamente mais elevados nos pacientes não expressores *CYP3A5*3* em comparação com os expressores *CYP3A5*1* (Figura 1 a) são similares aos encontrados por Cusinato et al. que também observou valores de *Co/D* maiores nos pacientes portadores do alelo variante *CYP3A5*3* em comparação com pacientes portadores do alelo

selvagem *CYP3A5**1, no primeiro ano pós-transplante. Além disso, observamos que o aumento da concentração ajustada é progressivo ao longo tempo em nossos resultados, podendo causar nefrotoxicidade, evoluindo com a perda do enxerto, uma vez que esta medicação será utilizada por vários anos pelo paciente, enquanto transplantado. Por esta razão, se faz necessariamente importante a avaliação periódica dos níveis plasmáticos da droga.

Estes resultados reforçam a ideia de que os pacientes portadores do genótipo variante (*3/*3) necessitam de doses menores a fim de minimizar os efeitos citotóxicos da droga. Com base nesse princípio ressalta-se também a importância da observação do índice terapêutico adequado dos pacientes que apresentam o alelo funcional *1 reduzindo assim o risco de rejeição do enxerto.

Thervet et al., em um ensaio clínico prospectivo envolvendo 280 receptores de transplante renal, demonstraram que a adaptação da dose de tacrolimus no pré-transplante de acordo com o genótipo *CYP3A5* é essencial para a obtenção da *Co* alvo. Esses achados sugerem que a genotipagem *CYP3A5* no pré-transplante é um fator importante na determinação do requisito de dose para o tacrolimus, podendo ser útil na previsão antecipada da dose. Desta forma, a partir deste conhecimento de que a genotipagem individual das enzimas *CYP3A5* no pré-transplante resulta em um impacto positivo no prognóstico pós-transplante, somado aos resultados obtidos no nosso estudo, poderão nos auxiliar no estabelecimento de dosagens terapêuticas personalizadas, minimizando os efeitos citotóxicos causados pela exposição a concentrações não ajustadas de imunossupressores em pacientes transplantados renais.

Nossos dados demonstram que o genótipo *CYP3A5* parece ser uma variável independente e determinante no metabolismo de tacrolimus em pacientes transplantados renais no Estado do Maranhão, um dos estados brasileiros com elevada miscigenação. Embora alguns trabalhos [11, 12, 13] tenham indicado um potencial papel de polimorfismos em genes relacionado com a atividade de CYP, em nossa população não foi observada relação entre a farmacocinética de tacrolimus e as variantes genótípicas dos genes *PPARA* e *POR*, no primeiro ano pós transplante, mesmo quando analisada a relação destes genótipos com a razão *Co/D* de tacrolimus isoladamente (Figura 1 (b), (c) e (d); $p > 0,05$) e quando avaliada a estratificação destes genes nos expressores e não expressores de *CYP3A5* (Tabela 03; valores de $p > 0,05$, em todas as associações analisadas).

Tais resultados evidenciam que os principais polimorfismos descritos nesses genes parecem não ter relevante impacto sobre a farmacocinética do tacrolimus em longos períodos. Dados similares foram observados por Lunde et al., onde não foram observadas diferenças estatísticas na farmacocinética de tacrolimus para as variantes de *PPARA* (*rs4823613*), *PPARA*

(rs4253728) e gene *POR*, quando analisados isoladamente.

Alguns estudos têm relatado a influência da associação da variante alélica *POR**28 com expressores *CYP3A5* na diminuição da *Co/D* de tacrolimus. Jonge et al., verificaram que portadores do alelo *CYP3A5**1 associado ao alelo *POR**28 necessitaram 25% a mais de dose de tacrolimus comparados com portadores *CYP3A5**1 sem o alelo *POR**28 (ou seja, homozigotos *POR**1/*1). Esta relação foi confirmada por outro estudo realizado na população chinesa [13], e os pesquisadores deduziram que esta diminuição *Co/D* foi devido a atividade aumentada da enzima *CYP3A5*, induzida pelas interações facilitadas entre *POR*-*CYP3A5*. Entretanto, esta relação da interação entre as enzimas *POR* e *CYP3A5* com a farmacocinética do tacrolimus foi observada apenas nos primeiros dias pós-transplantes, contudo essa avaliação parece ser mais fidedigna em longos períodos após o transplante uma vez que esta droga é de uso prolongado e contínuo.

Diante do exposto, este estudo explorou pela primeira a relação de polimorfismos genéticos envolvendo os genes *CYP3A5*, *PPARA* e *POR* na farmacocinética de tacrolimus, em uma população miscigenada na América Latina. As informações obtidas evidenciam o importante papel biológico das enzimas envolvidas na biotransformação de drogas e o quanto a variabilidade genética pode influenciar o índice terapêutico da droga e consequentemente a *Co/D* de tacrolimus ao longo do tempo nos diferentes grupos genotípicos *CYP3A5*. Assim, a genotipagem *CYP3A5* pré transplante parece ser uma ferramenta útil para melhor previsão de dosagens terapêuticas individuais no pré-transplante, aumentando o tempo de sobrevivência do enxerto e a qualidade de vida do paciente transplantado. Trabalhos envolvendo as variáveis genéticas *PPARA* e *POR*, e a influência da *Co/D* de tacrolimus em pacientes transplantados renais ainda são raros e portanto são necessários um número maior de estudos em diferentes populações para melhor elucidação desta relação de polimorfismos genéticos com o metabolismo de imunossupressores.

Conclusões

Neste trabalho foi verificado que a variante *CYP3A5**3 está significativamente associado com uma maior razão *Co/D* de tacrolimus em pacientes transplantados renais. E que este aumento na concentração ajustada da droga é progressivo ao longo do tempo. Adicionalmente, não foi observada a influência dos genótipos *PPARA* e *POR* na farmacocinética de tacrolimus, quando analisados como única variável independente ou quando analisados em expressores e não expressores *CYP3A5*. O polimorfismo rs776746 no gene *CYP3A5* parece ser responsável pela grande variabilidade interindividual na farmacocinética de

tacrolimus, sugerindo que a genotipagem das sequências variantes de *CYP3A5* poderia auxiliar no estabelecimento de dosagens terapêuticas personalizadas a fim de evitar a super ou sub exposição ao tacrolimus na fase crítica inicial do pós-transplante, minimizando os riscos de toxicidade ou rejeição, respectivamente. Por outro lado, mais estudos em diferentes populações são necessários no sentido de esclarecer a participação dos polimorfismos genéticos *PPARA* e *POR* e sua interação com as enzimas CYP, na farmacocinética de tacrolimus em pacientes renais transplantados.

Agradecimentos:

Agradecemos aos colaboradores do Serviço de transplante do HUUFMA, em especial Briza Lobato, por nos fornecer a agenda de consultas dos pacientes e à enfermeira Regina, por possibilitar a entrevista com o paciente e aplicação do TCLE. Ao Serviço de Arquivo Médico do HUUFMA, em particular, ao Carlessandro Melo e Carlos Henrique da Silva, por nos fornecer os prontuários dos pacientes. Agradeço o apoio técnico do Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade – LEGH/HUUFMA, onde realizamos parte dos experimentos e a bióloga Itaynara Dutra, por suas contribuições e ajuda na organização dos dados clínicos; ao Laboratório de Análises Clínicas, em particular a Diego Coêlho, por fornecer alíquotas de sangue para extração de DNA e genotipagem. Ao Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica, em especial Victor Contreras, por nos orientar com a técnica de imunohistoquímica (dados não apresentados neste trabalho). Agradeço ao Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA, pela infraestrutura fornecida ao desenvolvimento de parte da pesquisa e aos biólogos Cossi Yes, Silvia Gaspar e Welliandra Santos, por ajudar na execução dos experimentos; agradeço ao Banco de tumores do HUUFMA na pessoa de Flávia Vidal, por permitir a utilização do espectrofotômetro. Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Webster A C, Nagler E V, Morton R L, Masson P,(2017).Chronic Kidney disease. Lancet, 389:1238-52. doi.org/10.1016/ S0140-6736(16)32064-5.
2. ISN, International Society of Nephrology. Global Kidney Health Atlas (2017). <https://www2.theisn.org/GKHA>
3. Jha VDM, Garcia-Garcia GMD, Iseki KMD, et al (2013). Chronic kidney disease:

- global dimension and perspectives. *The Lancet*. v. 382, 20-26, p. 260-272. doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X
4. Nga H S, Andrade L G M, Contti M M, et al (2017). Evaluation of the 1000 renal transplants carried out at the University Hospital of the Botucatu Medical School (HCFMB) - UNESP and their evolution over the years. *Braz. J. Nephrol*, 40(2):162-169. doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-3871.
 5. Calne RY, Pentlow BD, et al (1978). Cyclosporin-a in Patients Receiving Renal-Allografts from Cadaver Donors. *Lancet*, v.2, n.8104, p.1323-1327. doi.org/10.1016/S0140-6736(78)91970-0.
 6. Naesens, M., D. R. J. Kuypers, et al (2009). Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v.4, n.2, Feb, p.481-508. doi.org/10.2215/CJN.04800908.
 7. Cusinato DAC, Lacchini R, Romao EA, et al (2014). Relationship of *CYP3A5* genotype and *ABCB1* diplotype to tacrolimus disposition in Brazilian kidney transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 78:2/364-372. doi.org/10.1111/bcp.12345
 8. Barbarino JM, Staatz CE, et al (2013). PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, v.23, n.10, Oct, p.563-585. doi: 10.1097/FPC.0b013e328364db84
 9. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM et al (2015). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clinical pharmacology & therapeutics* | v. 98 n. 1. doi:10.1002/cpt.113.
 10. Chen L, Prasad GVR (2018). CYP3A5 polymorphisms in renal transplant recipients: influence on tacrolimus treatment. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 11 23–33. doi: 10.2147/PGPM.S107710
 11. Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, et al (2014). The influence of *CYP3A*, *PPARA* and *POR* genetics variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*, 70:685-693. doi.org/10.1007/s00228-014-1656-3.
 12. Kurzawski M, Malinowska D, Dziewanowski K and Drożdżika M (2014) *Pharmacogenetics and Genomics*, v. 24 No 8. doi: 10.1097/FPC.0000000000000067.
 13. Zhang J-J, Zhang H, Ding X-L, Ma S, Miao LY, (2012). Effect of the P450 oxidoreductase *28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 69:807–812. doi 10.1007/s00228-012-1432-1.

14. Jonge H, Metalidis C, Naesens M, et al (2011). The P450 oxireductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 12 (9), 1281 – 1291. doi.org/10.2217/pgs.11.77.
15. Flahault A, Anglicheau D, Lorient M-A, Thervet E, Pallet N(2017).Clinical impact of the *CYP3A5* 6986A>G allelic variant on kidney transplantation outcomes. *Pharmacogenomics*, 18(2), 165–173. doi.org/10.2217/pgs-2016-0146.
16. Htun Y Y, Sweb H K, and Sawa T M (2018). *CYP3A5**3 Genetic Polymorphism and Tacrolimus Concentration in Myanmar Renal Transplant Patients. *Transplantation Proceedings*, 50, 1034e1040.doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.032.
17. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter M-H, et al(2003).Impact of cytochrome P450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and dose / concentration ratio in renal transplant recipients. *Transplantation*, 76 (8): 1233-1235. doi: 10.1097/01.TP.0000090753.99170.89.

ANEXOS

ANEXO A: NORMAS DA REVISTA

European Journal of Clinical Pharmacology

Instructions for the author:

Tipos de papéis

Documentos de pesquisa originais

O número de páginas impressas por artigo, incluindo figuras, tabelas e referências, não deve exceder de 8 a 10 páginas impressas (uma página impressa é de aproximadamente 650 palavras ou 4300 caracteres, texto sem espaços; figuras e tabelas devem ser contadas como meia página cada).

OBSERVAÇÕES ESPECÍFICAS

Introdução

- Esta seção pode ser breve e deve indicar os antecedentes relevantes e os principais objetivos do estudo relatado.
- Evite introduções de tipo de revisão.
- Terminologia Nomes genéricos de drogas e pesticidas são preferidos; Se nomes comerciais forem usados, o nome genérico deve ser dado na primeira menção.
- O nome de propriedade, composição química e fabricante devem ser declarados na íntegra em Materiais e Métodos.
- Se um nome genérico não tiver sido criado ou não estiver disponível, o nome do produto químico deverá ser fornecido.
- O uso de um nome de código da indústria sozinho não é suficiente. Unidades SI Por favor, utilize sempre sinais e símbolos aceitos internacionalmente para unidades, unidades SI.

Estatísticas

- A consideração do tamanho da amostra deve ser dada para qualquer estudo clínico e os cálculos de potência são necessários para resultados negativos das variáveis principais. Isto pode ser feito post-hoc se informações insuficientes estivessem disponíveis a priori.
- Os estudos de bioequivalência / biodisponibilidade e interação medicamentosa devem incluir testes / índices de referência e os respectivos intervalos de confiança de 90% ou 95%.
- Métodos analíticos Qualquer método utilizado para quantificar concentrações de fármacos ou metabolitos nos fluidos corporais deve ser caracterizado pelo menos pelas seguintes informações: - Intervalo de quantificação (definido por uma precisão / precisão aceitáveis e não por um fator acima do ruído de base), - precisão e precisão ao longo de toda a gama de quantificação, - recuperação (se aplicável) e informações de estabilidade para o período de medição.
- Essas informações são necessárias no manuscrito ou devem estar disponíveis em uma referência fornecida pelo autor. Normalmente, os métodos devem ser descritos de forma tão detalhada que outros pesquisadores possam repeti-lo.

REFERÊNCIAS

- As citações de referência de citações no texto devem ser identificadas por números entre colchetes. Alguns exemplos: 1. A pesquisa de negociação abrange muitas disciplinas [3]. 2. Este resultado foi posteriormente contradito por Becker e Seligman [5]. 3. Este efeito tem sido amplamente estudado [1-3, 7].

Lista de referências

- A lista de referências deve incluir apenas as obras citadas no texto e publicadas ou aceitas para publicação.
- Comunicações pessoais e obras inéditas só devem ser mencionadas no texto.
- Não use notas de rodapé ou notas de fim como substituto de uma lista de referências. As entradas na lista devem ser numeradas consecutivamente.
- Artigo de periódico Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L. (2009) Efeito do treinamento intermitente de alta intensidade na variabilidade da frequência cardíaca em crianças pré-púberes. Eur J Appl Physiol 105: 731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
- Idealmente, os nomes de todos os autores devem ser fornecidos, mas o uso de "et al" em longas listas de autores também será aceito: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Futuro do seguro de saúde. N Engl J Med 341: 325-329
- Artigo por DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Implicações clínicas da produção desregulada de citocinas. J Mol Med. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- Livro South J, Blass B (2001) O futuro da genômica moderna. Blackwell, London
- Livro capítulo Brown B, Aaron M (2001) A política da natureza. In: Smith J (ed) O surgimento da moderna genômica, 3rd edn. Wiley, Nova York, pp 230-257
- Documento online Cartwright J (2007) Grandes estrelas têm tempo também. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Acessado em 26 de junho de 2007
- Dissertação Trent JW (1975) Insuficiência renal aguda experimental. Dissertação, Universidade da Califórnia
- Sempre use a abreviação padrão do nome de um periódico de acordo com a lista de abreviações de palavras de título ISSN, consulte ISSN.org LTWA
- Se você não tiver certeza, use o título completo da revista. Para os autores que usam o EndNote, o Springer fornece um estilo de saída que suporta a formatação de citações de intext e lista de referência.
- Autores preparando seu manuscrito no LaTeX podem usar o arquivo bibtex spbasic.bst que está incluso no pacote macro LaTeX da Springer.

TABELAS

- Todas as tabelas devem ser numeradas usando algarismos arábicos.
- As tabelas devem sempre ser citadas em texto em ordem numérica consecutiva.
- Para cada tabela, forneça uma legenda da tabela (título) explicando os componentes da tabela.
- Identifique qualquer material publicado anteriormente, fornecendo a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.

- As notas de rodapé das tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídas abaixo do corpo da tabela.

DIRETRIZES DE TRABALHO E ILUSTRAÇÕES

Submissão Eletrônica de Figuras

- Forneça todas as figuras eletronicamente.
- Indique qual programa gráfico foi usado para criar o trabalho artístico.
- Para gráficos vetoriais, o formato preferido é EPS; para meios-tons, use o formato TIFF.
- Arquivos MSOffice também são aceitáveis.
- Gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.
- Nomeie seus arquivos de figura com "Fig" e o número da figura, por exemplo, Fig1.eps.

ANEXO B: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES CYP3A4, CYP3A5 E ABCB1 SOBRE A FARMACOCINÉTICA DE IMUNOSSUPRESSORES, NEFROTOXICIDADE E DISFUNÇÃO DO ENXERTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI

Pesquisador: MARCELO MAGALHÃES SILVA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 45650015.5.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.242.747

Apresentação do Projeto:

A doença renal crônica (DRC) constitui-se de perda progressiva e irreversível da capacidade de filtração renal. A terapia mais adequada para essa enfermidade tem sido o transplante renal, proporcionando inestimável melhoria da qualidade de vida dos pacientes. O desenvolvimento tecnológico na área de imunossupressão foi um fator determinante para o êxito do transplante como alternativa terapêutica à diálise. Dentre os principais imunossupressores utilizados na clínica estão o tacrolimus e a ciclosporina A. O mecanismo de ação desses compostos é a inibição de calcineurina e consequente bloqueio da ativação dos linfócitos T. Apesar da comprovada eficácia terapêutica, os inibidores de calcineurina apresentam grande variabilidade farmacocinética interindividual. Adicionalmente, a exposição a doses não ajustadas desses fármacos pode provocar efeitos adversos como nefrotoxicidade e rejeição do enxerto. O presente projeto de pesquisa propõe-se a realizar um estudo prospectivo observacional de pacientes transplantados renais no Maranhão. O principal objetivo de tal estudo será a avaliação da frequência de polimorfismos dos genes CYP3A e ABCB1 e sua influência sobre o metabolismo dos imunossupressores, nefrotoxicidade e possível disfunção do enxerto. O presente trabalho

será um estudo prospectivo observacional no qual serão incluídos 50 pacientes transplantados renais acompanhados pelo Serviço de Transplantes do HUUFMA. Para isso, serão coletadas amostras de sangue de pacientes transplantados renais durante os meses 1, 2, 3 e 6 pós-transplante visando a genotipagem de polimorfismos e a medida da concentração plasmática de imunossupressores. A metodologia usada consistirá de coleta de dados clínicos e demográficos, medida da concentração da droga, extração do DNA genômico e tipagem molecular. Os dados passarão por análise estatística através do programa Graph Pad Prism v. 5.02. Financiamento Próprio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a presença e implicações clínicas de polimorfismos nos genes CYP3A e ABCB1 em pacientes transplantados renais no Maranhão.

Objetivo Secundário:

- Estimar a frequência de polimorfismos nos genes CYP3A e ABCB1 em pacientes transplantados renais na população maranhense
- Analisar possíveis associações entre polimorfismos e farmacocinética de tacrolimus e ciclosporina A
- Determinar possíveis relações entre polimorfismos, presença de efeitos citotóxicos e disfunção do enxerto
- Avaliar possível correlação entre tempo de sobrevida do enxerto e conversão ou abandono da terapia com ciclosporina A ou tacrolimus

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com o pesquisador os riscos apresentados aos participantes são muito pequenos e estão relacionados com a coleta sanguínea que eventualmente poderá causar desconforto local e/ou surgimento de hematomas no local da punção. Outro risco potencial estaria relacionado a uma possível quebra de sigilo de informações contidas nos prontuários dos voluntários o que tentará ser evitado pela restrição a tais dados sendo permitido acesso apenas aos membros da equipe de pesquisa.

Benefícios:

De acordo com o pesquisador este estudo poderá, no futuro, beneficiar pacientes submetidos ao transplante renal, contribuindo para o estabelecimento de conduta terapêutica ajustada às

necessidade de cada indivíduo, podendo prevenir o surgimento de eventos terapêuticos adversos como toxicidade ou rejeição do órgão transplantado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante pois busca avaliar a presença e implicações clínicas de polimorfismos nos genes CYP3A e ABCB1 em pacientes transplantados renais no Maranhão que poderá contribuir para o estabelecimento de conduta terapêutica ajustada às necessidades de cada indivíduo, podendo prevenir o surgimento de eventos terapêuticos adversos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referentes aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word.

O protocolo apresenta ainda as declarações de anuência, declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 /2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 classifica o protocolo proposto na situação de APROVADO.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser inseridas à plataforma encaminhada ao CEP- HUUFMA de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O pesquisador deve: desenvolver o projeto conforme delineado; elaborar e apresentar relatórios parciais e relatório final; apresentar dados solicitados pelo CEP quando solicitado; e encaminhar os resultados para publicação sejam eles favoráveis ou não e justificar ao CEP caso haja interrupção do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	DECLARAÇÃO DE ANUENCIA.jpg	26/05/2015 10:22:57		Aceito
Outros	TERMO UTILIZAÇÃO DE DADOS.jpg	26/05/2015 10:24:57		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO RESPONSABILIDADE FINANCEIRA.jpg	26/05/2015 10:25:56		Aceito
Outros	Declaração publica.jpg	29/05/2015 15:10:47		Aceito
Outros	Declaração coleta.jpg	29/05/2015 15:12:01		Aceito
Outros	Parecer COMIC.jpg	29/05/2015 15:13:00		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.jpg	29/05/2015 15:13:41		Aceito
Outros	ORÇAMENTO V2.pdf	03/08/2015 16:03:14		Aceito
TCLE / Termos de Assentiment o / Justificativa de Ausência	TCLE V2.pdf	03/08/2015 16:24:51		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_V3.pdf	17/09/2015 16:36:27	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Broch ura Investi gador	Projeto_polimorfismo_cep_V4.doc	17/09/2015 16:37:09	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
Outros	carta_resposta_CEP4.pdf	18/09/2015 11:18:53	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO P ROJETO_520850.pdf	18/09/2015 11:20:38		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 24 de Setembro de 2015

Assinado por:
Rita da Graça Carvalhal
Frazão Corrêa
(Coordenador)

ANEXO C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Avaliação da influência de polimorfismos nos genes *CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1* sobre a farmacocinética de imunossupressores, nefrotoxicidade e disfunção do enxerto em pacientes transplantados renais

Coordenador: Dr. Marcelo Magalhães Silva

Instituição de Execução: Hospital Universitário Presidente Dutra - UFMA

Por este documento, você está sendo convidado a participar da presente pesquisa que tem como principal objetivo esclarecer a influência de variações genéticas na degradação de substâncias imunossupressoras receitadas para pacientes submetidos ao transplante renal e possíveis efeitos indesejados causados pelo uso dessas substâncias.

Você não é obrigado a aceitar, a sua participação é totalmente voluntária e, caso não queira, não terá prejuízo algum em seu tratamento. Porém, a sua colaboração é importante, pois as informações obtidas com este projeto poderão, futuramente, auxiliar no estabelecimento de doses imunossupressoras ajustadas a real necessidade do paciente, permitindo que o órgão transplantado permaneça em boas condições por mais tempo.

PARTICIPAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

- Será preenchida uma ficha com seus dados de identificação, dados do seu prontuário médico e os resultados deste estudo.
- Após o transplante, o acompanhamento médico de rotina inclui consultas e realização de exames uma vez por mês. Se você aceitar participar, quando você vier ao hospital, para esse acompanhamento, serão coletados 4 mL a mais de sangue no 1º, 2º, 3º e 6º mês. Essas amostras serão utilizadas para análises de DNA e dosagem sanguínea de medicamentos usados para imunossupressão.

RISCOS E DESCONFORTOS

- Os riscos apresentados por esta pesquisa são muito baixos e estão associados principalmente à coleta de sangue. No momento da coleta poderá haver alguma dor no local de introdução da agulha. Esse desconforto é temporário e normalmente desaparece

após retirada da agulha da veia do participante. Na rotina laboratorial, as complicações decorrentes de coleta sanguínea não são frequentes e geralmente caracterizam-se por pequenos sangramentos e formação de hematomas (pequenas manchas na pele) locais que normalmente desaparecem em poucos dias. Contudo, para diminuir esses riscos a coleta de sangue será realizada por profissionais qualificados e experientes.

- Caso haja alguma complicação ou dano durante ou após a coleta de sangue, o pesquisador responsável e o HUUFMA assumirão toda responsabilidade no fornecimento de assistência integral ao voluntário.
- Outro possível risco seria a exposição de informações confidenciais do paciente durante a obtenção de dados no prontuário. Contudo esse problema deve ser evitado pelo acesso restrito de informações clínicas apenas aos membros participantes da equipe de pesquisa.

GARANTIAS AO VOLUNTÁRIO

- O segredo e a privacidade dos dados e materiais coletados: serão guardados no laboratório de estudos genômicos e histocompatibilidade (LEGH). As amostras de DNA serão armazenadas em câmara fria até o final do estudo e posteriormente serão descartados de acordo com as normas de biossegurança da legislação vigente. Os dados laboratoriais serão armazenados em arquivos restritos do LEGH.
- Os dados coletados e resultados obtidos no estudo serão utilizados apenas pelos pesquisadores envolvidos no mesmo e somente para fins científicos, protegendo os interesses dos participantes envolvidos que terão suas identidades e individualidades preservadas em absoluto sigilo.
- Acesso aos dados genéticos produzidos e o direito de retirá-los do banco do laboratório LEGH a qualquer momento, avisando os pesquisadores responsáveis.
- A participação nesse estudo não gerará despesas ao voluntário pois as coletas serão feitas durante as consultas mensais ou eventual internação no HUUFMA.
- O participante desse estudo terá liberdade de retirar-se da pesquisa em qualquer fase desta sem que isso traga prejuízo ao seu tratamento.
- Caso seja do interesse da equipe de pesquisa realizar outras investigações utilizando estas amostras, será feito novo contato para sua concessão ou não, mediante assinatura de outro termo de consentimento referente ao possível novo estudo. O material armazenado só será utilizado em estudos futuros caso haja aprovação do novo projeto

pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Presidente Dutra ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (se for o caso).

- Caso haja qualquer dano eventual ao voluntário em decorrência da pesquisa, ao mesmo será garantido o direito à indenização e reparo material.

BENEFÍCIOS

- Este estudo poderá, no futuro, beneficiar pacientes submetidos ao transplante renal, contribuindo para o estabelecimento de doses de imunossuppressores ajustadas às necessidades de cada pessoa, prevenindo o surgimento de efeitos prejudiciais que poderiam levar a rejeição do órgão transplantado.

VOCÊ DEVE DECIDIR O SEGUINTE:

- Autoriza o armazenamento de dados e materiais coletados para a pesquisa, conforme descrito anteriormente. () Sim () Não
- Quer saber o resultado dos exames. () Sim () Não

Se você concordar em participar desta pesquisa, assine as vias deste termo de consentimento livre e esclarecido. Este documento consta de duas vias e deverá ser rubricado em todas as suas páginas por você e também pelo pesquisador responsável pelo estudo. Após realizar as assinaturas, você receberá uma via deste documento e a outra ficará em posse do pesquisador responsável.

Eventuais perguntas ou o esclarecimento de dúvidas acerca da pesquisa poderão ser feitos durante e após a realização da mesma por meio do contato com o pesquisador Dr. Marcelo Magalhães Silva no Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade (LEGH) - situado à Rua dos Prazeres nº 215, Centro, na Cobertura da Unidade Materno Infantil – pelo telefone (98) 2109-1258 ou com a coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário, situado à Rua Barão de Itapary nº227, Centro ou pelo telefone (98) 2109-1242.

SÃO LUÍS, ____ de _____ de _____

VOLUNTÁRIO

PESQUISADOR