UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DIEGO ALBERTO CISCATO CUSINATO

**Associação dos polimorfismos do CYP3A5 e da PGP com a
farmacocinética do tacrolimus, nefrotoxicidade aguda e
rejeição do enxerto após transplante renal**

Ribeirão Preto – SP

2012

DIEGO ALBERTO CISCATO CUSINATO

**Associação dos polimorfismos do CYP3A5 e da PGP com a
farmacocinética do tacrolimus, nefrotoxicidade aguda e
rejeição do enxerto após transplante renal**

**Dissertação apresentada á Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Ribeirão Preto – SP

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cusinato, Diego A. C.

Associação dos polimorfismos do CYP3A5 e da PGP com a farmacocinética do tacrolimus, nefrotoxicidade aguda e rejeição do enxerto após transplante renal. Ribeirão Preto, 2012.

90 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Coelho, Eduardo Barbosa.

1. Farmacogenética. 2. Transplante Renal. 3. Citocromo P450. 4. Inibidores de Calcineurina. 5. Nefrotoxicidade. 6. ABCB1.

Capa: <http://quimicosarica.ning.com/profiles/blogs/3381491:BlogPost:51309>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diego Alberto Ciscato Cusinato

Associação dos polimorfismos do CYP3A5 e da PGP com a farmacocinética do tacrolimus, nefrotoxicidade aguda e rejeição do enxerto após transplante renal

**Dissertação apresentada á Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Márcio Dantas

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Elen Almeida Romão

Instituição: HCRP

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha Família, em especial meus Pais, que de exemplo em exemplo, contribuíram de maneira fundamental na formação do meu caráter.

Cheguei até esse momento graças ao apoio e esforço de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e carinho.

Minha mãe, Kate, pela constante atenção, zelo e conselhos sempre precisos.

Meu pai, João, pelo exemplo, carinho e suporte incondicional.

Minhas irmãs, Caroline e Marina, pela amizade, compreensão e infinitos momentos de alegria.

A minha noiva Marina, amiga e companheira de todos os momentos, que sempre esteve ao meu lado oferecendo um ombro amigo, um ouvido atento, paciência, amor e carinho ilimitados.

Agradeço ao professor Eduardo Barbosa Coelho pela orientação, confiança e ensinamentos acadêmicos oferecidos.

Agradeço a professora Eliane Candiani Arantes por ter me introduzido e ajudado nos primeiros passos no caminho da ciência.

Ao Dr. Riccardo Lachinni pela atenção, paciência e conselhos altamente valiosos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Clínica do HC-RP por disponibilizarem o laboratório e pela colaboração.

A Neuza Laerce de Almeida, Assistente Social da Unidade de Transplante Renal (HCRP) pela inestimável ajuda e paciência durante a fase de recrutamento de voluntários.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME-HC) pela extrema atenção, simpatia e disposição.

Agradeço aos amigos de laboratório, Junya, Héverton, Juliana, Soraia, Andréa, Flávia, Aline, Valéria e Gabriel pelo suporte, companheirismo e grandes momentos vividos.

Aos membros da banca Dr. Márcio Dantas e Dra. Elen Almeida Romão por aceitarem o convite, pela disponibilidade e conhecimentos oferecidos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia pelo suporte e serviços prestados.

Aos funcionários da Biblioteca Central do campus da USP-RP pela colaboração na revisão da formatação deste trabalho.

Agradeço à FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço também aos pacientes que foram fundamentais na execução deste estudo. Sem o consentimento e participação deles este trabalho não seria possível.

Epígrafe

"A educação não transforma o mundo.
Educação muda pessoas. Pessoas
transformam o mundo."

Paulo Freire

RESUMO

CUSINATO, D.A.C. **Associação dos polimorfismos do CYP3A5 e da PGP com a farmacocinética do tacrolimus, nefrotoxicidade aguda e rejeição do enxerto após transplante renal.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Tacrolimus (TAC) é um fármaco imunossupressor muito utilizado na prevenção de rejeição aguda após o transplante de órgãos. Essa droga apresenta um índice terapêutico muito baixo e grande variabilidade intra e interindividual, sendo necessário programas de monitorização terapêutica para se otimizar a eficácia e limitar a toxicidade. O TAC é um fármaco substrato do CYP3A5 e transportado pela proteína de efluxo PGP e acredita-se que o polimorfismos genéticos (SNPs) destas proteínas estejam relacionados a alta variabilidade farmacocinética desta droga. Neste estudo, investigamos a influência dos polimorfismos destas proteínas sobre alguns parâmetros farmacocinéticos do TAC e também, na incidência de lesões renais e rejeição em receptores de transplante renal. Pacientes recebendo TAC a no mínimo 12 meses (n=108) foram genotipados (PCR real time) para os polimorfismos do CYP3A5*3 (rs776746) e do gene ABCB1 1236C>T (rs1128503), 2677G>T/A (rs2032582) e 3435C>T (rs1045642). Dados da concentração plasmática de vale (Co; ng/mL), dose diária normalizada (mg/dia por Kg do paciente) e a concentração plasmática do fármaco normalizada pela dose ingerida (Co/dose, ng/mL por mg/dia por kg do paciente) de TAC foram obtidos dos prontuários médicos ao longo de três anos após o transplante renal. O desfecho clínico foi analisado avaliando-se a curva de sobrevida do enxerto, a função renal obtida pelo clearance de creatinina (Equação de Cockcroft-Gault), e desenvolvimento de lesões renais e rejeição aguda e crônica com diagnósticos estabelecidos mediante suspeita clínica e confirmados pela avaliação das biópsias quanto a presença de necrose tubular aguda (NTA) e nefropatia crônica do enxerto (NFC) de acordo com a classificação de BANFF 07. Os haplótipos do gene ABCB1 foram inferidos estatisticamente utilizando o software PHASE (version 2.1). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Não observamos desvios em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em nossa população para nenhum dos genes estudados. Frequências alélicas destes polimorfismos (6986G 74%; 1236C 60%; 3435C 59% and 2677G 64%) e haplótipos (49% 2677G-3435C-1236C e 31% 2677T-3435T-1236T) foram consistentes com outros estudos realizados na população brasileira. Indivíduos portadores de ao menos um alelo *1 do gene CYP3A5 necessitavam de maiores doses de TAC para obter níveis plasmáticos semelhantes aos dos indivíduos homozigotos para o alelo *3 ($0,09 \pm 0,03$ vs. $0,06 \pm 0,03$; mg/dia/kg; $p < 0,001$). Ao final do primeiro ano de transplante pacientes CYP*3/*3 apresentavam praticamente o dobro da razão Co/dose quando comparados com os pacientes CYP*1/*1 ($144,60 \pm 67,29$ vs. $70,44 \pm 56,05$ ng*mL⁻¹/mg*kg⁻¹/dia; $p < 0,001$). Observou-se semelhante em relação quando indivíduos portadores dos alelos e haplótipo variante da PGP foram avaliados. Não encontramos associações significativas entre os genótipos e a sobrevida do enxerto ou clearance de creatinina. No entanto, observamos que os pacientes portadores do haplótipo GCC apresentaram maior incidência de desenvolvimento de NFC. Este estudo confirma o efeito dos polimorfismos do CYP3A5 e, em menor grau da PGP na farmacocinética do TAC. No entanto, não encontramos associações entre esses polimorfismos e desfechos clínicos significantes, sugerindo que a genotipagem para o CYP3A5 ou ABCB1 ainda não deva ser incorporada na prática clínica como uma ferramenta para o manejo de transplante renal.

Palavras-Chave: farmacogenética, transplante renal, citocromo P450, inibidores da calcineurina, nefrotoxicidade, ABCB1.

ABSTRACT

CUSINATO, D.A.C **Association of CYP3A5 and PGP polymorphisms and haplotypes with tacrolimus pharmacokinetics, acute nephrotoxicity and allograft rejection after kidney transplantation.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Tacrolimus (TAC) is widely used to prevent acute rejection following solid-organ transplantation. This drug is characterized by a narrow therapeutic index and drug monitoring programs are required both to optimize efficacy and to limit toxicity. TAC is known to be substrate of cytochrome P450 (CYP) 3A5 and P-glycoprotein (PGP/ABCB) and it's been suggested that genetic polymorphisms (SNPs) of these proteins are highly associated with variations in TAC pharmacokinetics. We investigated the influence of polymorphisms of CYP3A5 and ABCB1 gene on the pharmacokinetic parameters (PK) of TAC and on the incidence of kidney injuries and allograft rejection (AR) in renal transplant recipients. Patients receiving TAC for at least 12 months (n=108) were genotyped (real-time PCR) for CYP3A5*3 (rs776746) and for ABCB1 1236C>T (rs1128503), 2677G>T/A (rs2032582) and 3435C>T (rs1045642) polymorphisms. TAC predose concentration (Co; ng/mL), TAC daily dose (mg/day per kg body weight) and dose-normalized predose concentrations (Co/dose; ng/mL per mg/day per kg body weight) were retrieved from medical records up to 03 years after transplantation. Clinical outcomes were analyzed evaluating renal function in terms of creatinine clearance (Cockcroft-Gault equation) and allograft survival. Kidney injuries and AR diagnostics were established by clinical suspicion and in presence of histological findings in renal biopsies according to the 2007 Banff classification. ABCB1 gene haplotypes were statistically inferred using PHASE software (version 2.1). No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in our study population for the polymorphic loci examined in CYP3A5 and ABCB1. Allelic frequencies of these polymorphisms (6986G 74%; 1236C 60%; 3435C 60% and 2677G 65%) and haplotypes (49% 2677G-3435C-1236C and 30% 2677T-3435T-1236T) were consistent with other studies in the Brazilian population. Individuals carrying at least one CYP3A5*1 allele required higher TAC dose to achieve similar TAC blood levels as the homozygous individuals for the *3 allele (0.09 ± 0.03 vs. 0.06 ± 0.03 , mg/day per kg body weight, $p<0.001$). The presence of the CYP3A5*1 allele was also associated with lower TAC Co/dose compared to CYP*3 homozygous (84.9 ± 43.2 vs. 144.6 ± 66.7 ng/mL per mg/day per kg body weight, $p<0.001$). Regarding ABCB1 polymorphisms, individuals homozygous for the variant allele of each individual SNP and for the haplotype (TTT) showed higher Co/dose ratio. No associations were found between SNPs or haplotypes and allograft survival or creatinine clearance. We did find, though, that patients carrying GCC haplotype had a higher incidence of chronic rejection. Our findings confirm the effect of CYP3A5 and, less pronounced of ABCB1 polymorphisms, on the TAC pharmacokinetic. On the other hand, we did not find any association between these polymorphisms and relevant clinical outcomes, suggesting that CYP3A5 and ABCB1 genotyping must not be incorporated as a useful clinical tool on the management of kidney transplantation.

Key words: pharmacogenetics, kidney transplantation, cytochrome P450, calcineurina inhibitor, nephrotoxicity, ABCB1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURAS:

Figura 01 - Curva de sobrevida dos transplantados renais entre os anos de 2010 e 2011.	19
Figura 02 - Estrutura química do tacrolimus e ciclosporina A.....	20
Figura 03 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação dos inibidores de calcineurina...	21
Figura 04 - Efeitos diretos e indiretos dos inibidores de calcineurina na fisiologia, histologia e função renal em caso de nefrotoxicidade aguda	23
Figura 05 - Estrutura secundária da PGP mostrando os principais SNPs do gene ABCB1	26
Figura 06 - Principais locais de expressão e ação da PGP.....	27
Figura 07 - Esquema mostrando o desequilíbrio de ligação entre os genes do CYP3A5 e ABCB1 presentes no cromossomo 7.....	52
Figura 08 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos do CYP3A5 12 meses após transplante renal.....	54
Figura 09 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos do CYP3A5 36 meses após transplante renal	54
Figura 10 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos do CYP3A5 12 meses após transplante renal.....	54
Figura 11 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos do CYP3A5 36 meses após transplante renal.....	54
Figura 12 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos do CYP3A5 12 meses após transplante renal.....	55
Figura 13 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos do CYP3A5 36 meses após transplante renal.....	55
Figura 14 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 12 meses após transplante renal.....	56
Figura 15 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 36 meses após transplante renal.....	56
Figura 16 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 12 meses após transplante renal.....	57

Figura 17 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 36 meses após transplante renal.....	57
Figura 18 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos da ABCB1 3435C>T 12 meses após transplante renal.....	57
Figura 19 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos da ABCB1 3435C>T 36 meses após transplante renal.....	57
Figura 20 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 12 meses após transplante renal.....	58
Figura 21 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 36 meses após transplante renal.....	58
Figura 22 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 12 meses após transplante renal.....	58
Figura 23 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 36 meses após transplante renal.....	58
Figura 24 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos ABCB1 1236C>T 12 meses após transplante renal.....	59
Figura 25 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos ABCB1 1236C>T 36 meses após transplante renal.....	59
Figura 26- Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 12 meses após transplante renal.....	59
Figura 27 - Relação entre a concentração plasmática de tacrolimus (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 36 meses após transplante renal.....	59
Figura 28 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 12 meses após transplante renal.....	60
Figura 29 - Relação entre dose diária de tacrolimus corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 36 meses após transplante renal.....	60
Figura 30 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 12 meses após transplante.....	60
Figura 31 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 36 meses após transplante.....	60
Figura 32 - Relação entre a razão Co/dose de tacrolimus e os haplótipos da ABCB1 12 meses após transplante renal.....	61

Figura 33 - Relação entre o índice de biodisponibilidade (Co/dose) de tacrolimus e os haplótipos da ABCB1 36 meses após transplante renal.....	61
Figura 34 - Curva de sobrevivência do enxerto avaliado pelo tempo (meses) até a necessidade de alteração no tratamento farmacológico com relação aos genótipos do CYP3A5.....	63
Figura 35 - Curva de sobrevivência do enxerto avaliado pelo tempo (meses) até a necessidade de alteração no tratamento farmacológico com relação aos haplótipos da ABCB1	63
Figura 36 - Relação entre o clearance de creatinina (mL/minuto/1,73m ²) e os genótipos do CYP3A5 12 meses após transplante renal.....	64
Figura 37 - Relação entre o clearance de creatinina (mL/minuto/1,73m ²) e os genótipos do CYP3A5 36 meses após transplante renal.....	64
Figura 38 - Relação entre o clearance de creatinina (mL/minuto/1,73m ²) e os haplótipos da ABCB1 12 meses após transplante renal.....	64
Figura 39 - Relação entre o clearance de creatinina (mL/minuto/1,73m ²) e os haplótipos da ABCB1 36 meses após transplante renal.....	64
Figura 40 - Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de necrose tubular aguda (NTA) no período posterior a 03 meses da realização do transplante renal em relação ao genótipo do CYP3A5.....	65
Figura 41 - Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de necrose tubular aguda (NTA) no período posterior a 03 meses da realização do transplante renal em relação aos haplótipos da PGP.....	65
Figura 42 - Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de nefropatia crônica do enxerto (NFC) ao longo dos 36 meses de estudo após da realização do transplante renal em relação ao genótipo do CYP3A5.....	65
Figura 43 - Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de nefropatia crônica do enxerto (NFC) ao longo dos 36 meses de estudo após da realização do transplante renal em relação aos haplótipos da PGP.....	65

TABELAS:

Tabela 01 - Causas e riscos de falha na função no enxerto após transplante renal.....	19
Tabela 02 - Principais lesões histológicas associadas ao uso de inibidores da calcineurina.....	24
Tabela 03 - Fatores de risco clínicos associados ao desenvolvimento de nefrotoxicidade ao uso de inibidores de calcineurina.....	25
Tabela 04 - Polimorfismos em éxons mais comuns do gene ABCB1.....	28
Tabela 05 - Frequência alélica do gene ABCB1 em diferentes populações.....	28
Tabela 06 - Distribuição da frequência genotípica do gene ABCB1 na população brasileira.....	29
Tabela 07 - Frequência alélica do CYP3A5 em diferentes populações.....	33
Tabela 08 - Frequência alélica do CYP3A5 na população brasileira.....	33
Tabela 09 - Descrição dos probes e primers utilizados nos ensaios Taqman®.....	41
Tabela 10 - Conteúdo dos poços da placa de PCR.....	41
Tabela 11 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais relação ao gene CYP3A5.....	46
Tabela 12 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais em relação ao gene ABCB1 1236C>T.....	47
Tabela 13 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais em relação ao gene ABCB1 3435C>T.....	48
Tabela 14 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais em relação ao gene ABCB1 2677G>T/A.....	49
Tabela 15 - Frequências alélicas e genotípicas dos genes do CYP3A5 e ABCB1 de 108 pacientes transplantados renais.....	51
Tabela 16 - Frequência dos haplótipos do gene ABCB1 em 108 pacientes transplantados renais.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Transplante de Órgãos	18
1.2 Imunossuppressores	20
1.3 Glicoproteína-P (PGP)	25
1.4 Citocromo P450 (CYP450)	31
 2 OBJETIVOS	 34
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 36
3.1 Casuística	37
3.2 Terapia Imunossupressora	38
3.3 Dados Clínicos	38
3.4 Polimorfismos Genéticos	40
3.4.1 Obtenção e Extração do DNA genômico	40
3.4.2 Identificação dos polimorfismos genéticos	40
3.5 Análise do Desfecho Clínico.....	42
3.6 Análise Estatística	42
 4 RESULTADOS	 44
4.1 Dados clínicos e demográficos	45
4.2 Frequência alélica e genotípica	50

4.3 Associação entre genótipos e farmacocinética	53
4.3.1 CYP3A5 e Farmacocinética do TAC	53
4.3.2 ABCB1 na farmacocinética do TAC	55
4.3.2.1 ABCB1 3435C>T	56
4.3.2.2 ABCB1 1236C>T	58
4.3.2.3 ABCB1 2677G>T/A	59
4.3.2.4 Haplótipos ABCB1	61
4.4 Associação entre os genótipos e desfecho clínico	61
4.4.1 Curva de sobrevida do enxerto	63
4.4.2 Clearance de Creatinina	64
4.4.3 Lesões Renais (NTA) e Nefropatia Crônica do Enxerto (NFC)	65
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS

A descoberta das propriedades imunomodulatórias da ciclosporina pelo médico suíço Jean Borel em 1977, sua introdução na investigação clínica em 1978 e a aprovação pelo FDA como “Sandimmune” em 1983, estão entre os mais importantes avanços na medicina de transplante de órgãos. Houve um aumento surpreendente na sobrevivência dos pacientes e manutenção da função dos órgãos quando a ciclosporina passou a ser parte do regime imunossupressor multidroga em todas as categorias de transplantes sólidos existentes. A taxa de sobrevivência após um ano de transplante superou 89% no caso transplantes renais e 70% nos transplantes cardíacos e hepáticos (LINDEN, 2009). No começo dos anos 90, o FK506, conhecido com tacrolimus (TAC), foi investigado clinicamente em pacientes receptores de fígado humano com rejeição a ciclosporina e verificou-se que aproximadamente 75% dos enxertos foram salvos da rejeição com esta mudança.

Atualmente a taxa de sobrevida do enxerto em transplantes renais é em torno 80% para doadores falecidos (Figura 01). Os rins transplantados podem ser perdidos em consequência de mecanismos imunes ou não-imunes, incluindo inúmeros fatores de riscos relacionados tanto ao doador quanto ao receptor (Tabela 01). Lesões tubulares precoces podem estar relacionadas a danos de isquemia-perfusão, rejeição aguda grave ou subaguda persistente e infecções por poliomavírus. Os danos tardios, associados à glomeruloesclerose e anormalidades microvasculares estão relacionados à nefrotoxicidade (NFTx) dos inibidores de calcineurina, glomerulonefrite recorrente, rejeição celular crônica persistente mediada ou não por anticorpos, hipertensão e rejeição aguda tardia.

Figura 01 - Curva de sobrevida dos transplantados renais entre os anos de 2010 e 2011

Fonte: Associação Brasileira de Transplantes (ABTO, 2011)

Tabela 01 - Causas e riscos de falha na função no enxerto após transplante renal

Riscos não imunológicos relacionados ao doador	Riscos e Causas não imunológicos relacionados ao receptor	Fatores Aloimunes
Doador falecido	Sexo feminino, obesidade	Receptor criança ou adolescente
Doador com mais de 60 anos	Infecção do trato urinário alto	Etnia
Doador sexo feminino	Pielonefrite do enxerto	Concentrações plasmáticas variáveis de medicação
Comorbidades vasculares	Obstrução uretérica do transplante	Resposta inflamatória ou aloimune do receptor
Danos de isquemia-perfusão	Nefropatia por poliovírus	Incompatibilidade HLA
Longos tempos de isquemia fria	Nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina	Sensibilização prévia ou anticorpos específicos do doador
Função renal tardia	Doença renal recorrente	Rejeição aguda severa resistente a esteróides
	Hipertensão, dislipidemia, tabagismo	Rejeição subclínica ou crônica
	Proteinúria e diabetes pré ou pós-Tx	Não aderência ao tratamento

Fonte: Nankivell e Kuypers (2011)

1.2 IMUNOSSUPRESSORES

Nos últimos 30 anos a realização de transplantes tem se tornado cada vez mais bem sucedida devido à disponibilidade de efetivos agentes imunossupressores. Inicialmente eles eram compostos de agentes citotóxicos não específicos, como azatioprina e ciclofosfamida, e corticóides como a cortisona. A introdução dos inibidores de calcineurina (ICNs), ciclosporina no final dos anos 70 e tacrolimus em 1984, revolucionou a medicina de transplantes e, atualmente 94% dos transplantados renais são tratados com um regime baseado em inibidores de calcineurina (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009).

Apesar de estruturalmente serem muito diferentes (Figura 02), ciclosporina e tacrolimus possuem semelhante mecanismo de ação baseado na inibição da calcineurina, uma fosfatase dependente de cálcio e calmodulina.

Figura 02 - Estrutura química do tacrolimus (A) e ciclosporina A (B)

Intracelularmente, as moléculas ligam-se, respectivamente, a ciclofilina e ao FKBP12 (fk-binding protein isoenzyme 12) (TAKAHASHI; HAYANO; SUZUKI, 1989). Os complexos ciclosporina-ciclofilina e tacrolimus-FKBP12 associam-se a calcineurina e impedem a desfosforilação do fator nuclear de células T ativado (NFAT) e, a consequentemente, a liberação de interleucina-2 (IL-2) responsável pela ativação dos linfócitos T (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009) (Figura 03).

Figura 03 - Inibição da ativação das células T mediada por imunofilinas. A estimulação do receptor de célula T resulta no aumento de cálcio intracelular levando a transcrição do gene da IL-2. Fk506 e CsA inibem esse processo ligando as respectivas imunofilinas (FKBP12 e ciclofilina) para inibir a calcineurina.

CYC: ciclofilina;

FKBP: proteína de ligação do FK506

NFAT: fator nuclear de células T ativado

IL-2: interleucina-2

Fonte: Scott et al. (2003)

Tanto ciclosporina quanto o tacrolimus (FK506) apresentam uma elevada variabilidade intra e interindividual com baixos índices terapêuticos. São drogas altamente lipofílicas, o que contribui para sua absorção altamente variável e incompleta e, se constitui em uma das razões pelas quais necessitam de um extenso metabolismo antes de sua eliminação. A biodisponibilidade do tacrolimus é em média 25%, sendo controlada, principalmente, pelas isoenzimas do CYP3A4 e CYP3A5 e pela glicoproteína de efluxo, PGP, ambas expressas no trato gastrointestinal, onde afetam a biodisponibilidade oral, e no fígado, onde influenciam tanto a biodisponibilidade oral quanto o clearance da droga (DE JONGE; NAESENS; KUYPERS, 2009).

A ligação as proteínas plasmáticas pode chegar a 99%, estando majoritariamente ligado albumina e a α -glicoproteína (SCOTT et al., 2003; VENKATARAMANAN et al., 1995). Em humanos, o metabolismo desse fármaco ocorre principalmente no fígado e trato gastrointestinal através das ações de hidroxilação e desmetilação das enzimas do CYP3A4 e CYP3A5. O TAC apresenta 08 (oito) metabólitos principais, sendo um monohidroxilado (M-IV), três mono-desmetilados (M-I, M-II e M-III) e três di-desmetilados (M-V, M-VI e M-VII), além do complexo metabólito M-VIII que é modificado por múltiplas reações. É eliminado pela bile e menos de 1% excretado na urina na forma inalterada (IWASAKI et al., 1995). Entre os metabólitos, somente o M-II apresenta atividade farmacológica equipotente ao tacrolimus. As técnicas de dosagem do tacrolimus por imunoensaio enzimático empregam anticorpos monoclonais que reagem com o tacrolimus no sangue total e também possuem

reação cruzada com os três metabólitos, MII, MIII e M-V, sendo desprezível a reação com M-I, M-IV, M-VI, M-VII, e M-VIII (IWASAKI, 2007).

A calcineurina, assim como as isoformas do NFAT, não atua especificamente sobre as células T, e desta forma a inibição destas vias pela ciclosporina e tacrolimus confere, além de imunossupressão, toxicidade. Embora ciclosporina e tacrolimus tenham propriedades nefrotóxicas semelhantes (ROWSHANI et al., 2006), existem diferenças marcantes no perfil de toxicidade produzido pela ciclosporina em comparação com o tacrolimus. Em uma recente meta-análise de estudos randomizados em transplantados renais, tacrolimus foi associado com maiores índices de desenvolvimento de neurotoxicidade, diabetes mellitus, tremores, cefaléias, dispepsia, vômitos, diarréias e hipomagnesemia (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009; SCOTT et al., 2003).

O TAC altera a hemodinâmica glomerular com redução da filtração, promove alterações histológicas caracterizadas pela presença de vacuolização tubular, fibrose intersticial e hialinose. O uso contínuo e em altas doses dessas drogas tem como limitação principal a nefrotoxicidade arteriolar (GARCIA et al., 2004). Os primeiros experimentos com os inibidores da calcineurina sugeriram que a nefrotoxicidade é um fenômeno atribuído a alterações funcionais e, portanto reversíveis, sendo denominados “*Nefrotoxicidade Aguda*” (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009). Geralmente ocorre nos primeiros dias após o início do tratamento e caracteriza-se por uma síndrome oligoanúrica e ou aumento na creatinina sérica que se assemelha a causas de disfunções renais precoces, como a rejeição aguda (RA). Fisiopatologicamente caracteriza-se por constrição da arteríola glomerular aferente, levando a um decréscimo no fluxo sanguíneo renal e redução na taxa de filtração glomerular (TFG). Esta mudança no tônus vascular parece resultar de um desequilíbrio entre a secreção e metabolismo dos compostos vasodilatadores, como óxido nítrico e prostaglandinas, e vasoconstritores, como tromboxano, endotelinas e sistema renina-angiotensina, aliado de um aumento na atividade do sistema nervoso simpático. Os ICNs, além disso, parecem induzir a contração das células mesangiais, alterando, dessa forma, a permeabilidade glomerular. E, finalmente, há relatos de que os inibidores de calcineurina podem interferir com a função tubular causando retenção de sódio e edema, redução na excreção de potássio e ácido úrico, aumento na excreção de magnésio urinário e acidose metabólica hiperclorêmica. Em geral, a nefrotoxicidade aguda induzida por esses fármacos é completamente reversível após a redução da dose ou suspensão do uso (HESSELINK; BOUAMAR; VAN GELDER, 2010).

Em 1984, Myers et al. demonstraram que o uso prolongado de ciclosporina em transplantados cardíacos estava associado não somente a uma diminuição reversível na

filtração glomerular, mas também a uma deterioração renal irreversível relacionada a um dano progressivo e irreversível túbulo-intersticial e esclerose glomerular, denominado “*Nefrotoxicidade Crônica*”. Diferentemente da forma aguda, os danos crônicos apresentam pouca ou nenhuma melhora após a redução da dose ou retirada do fármaco. A patogênese da nefrotoxicidade crônica ainda não é completamente entendida, mas mudanças hemodinâmicas que levam a isquemia, efeitos diretos tóxicos dos fármacos nos túbulos e aumento na expressão do fator transformador de crescimento β (TGF- β), são considerados importantes fatores etiológicos (HESELINK; BOUAMAR; VAN GELDER, 2010).

Figura 04 - Adaptação de uma ilustração que mostra os efeitos diretos e indiretos dos ICNs na fisiologia, histologia e função renal em caso de nefrotoxicidade aguda

Fonte: Adaptado de Naesens, Kuypers e Sarwal (2009)

O diagnóstico diferencial entre a nefrotoxicidade relacionada à ciclosporina/tacrolimus e a danos de outra natureza é muito difícil. Várias situações de dano renal por mecanismos distintos possuem o mesmo quadro clínico de diminuição da função do rim transplantado e desenvolvimento de fibrose intersticial não-específica, atrofia tubular e, finalmente perda do enxerto (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009). Lesões consideradas mais específicas da nefrotoxicidade renal, como a vacuolização tubular e hialinização arteriolar podem ser causas secundárias a outros processos (Tabela 02). Assim, a combinação de várias características histológicas associadas ao uso de ICNs e a exclusão de outros processos que poderiam levar a danos histológicos similares é mandatória na realização de um diagnóstico positivo para nefrotoxicidade mediada por inibidores da calcineurina.

Tabela 02 - Principais lesões histológicas associadas ao uso de Inibidores da Calcineurina (ICNs)

<i>Lesões histológicas associadas ao uso de ICNs</i>
1. Nefrotoxicidade Aguda
Arteriopatia aguda
Vacuolização tubular (isométrica)
Microangiopatia trombótica
2. Nefrotoxicidade Crônica
Fibrose intersticial e atrofia tubular
Hialinização arteriolar medial
Fibrose da cápsula glomerular
Glomerulosclerose global
Glomerulosclerose segmentar focal (FSGS)
Hiperplasia Justaglomerular
Microcalcificações tubulares

Fonte: Naesens, Kuypers e Sarwal (2009)

Conforme revisto por Naesens, Kuypers e Sarwal (2009), não se trata de um consenso universal o fato de que o risco de desenvolvimento de nefrotoxicidade esteja associado ao uso por tempo prolongado e em altas doses dos inibidores de calcineurina. De fato, alguns autores sugerem que o risco de desenvolvimento de NFTx induzida pelos ICNs depende da susceptibilidade individual e não está diretamente relacionada a exposição sistêmica a essas drogas quando os níveis plasmáticos estão mantidos dentro das faixas terapêuticas adequadas (HESSELINK; BOUAMAR; VAN GELDER, 2010). Além dos fatores de risco relacionados ao nível sistêmico de ciclosporina e tacrolimus, existem outros fatores que podem contribuir, como a farmacocinética, farmacogenética e o nível de exposição ao tecido renal (Tabela 03).

Uma vez que a manutenção da concentração destes fármacos dentro faixa terapêutica é muito complicada devido à alta variabilidade farmacocinética intra e interindividual, a principal preocupação após a realização de um transplante renal é manter um balanço razoável entre eficácia (evitar rejeição) e toxicidade (nefrotoxicidade) dos agentes imunossupressores utilizados. Nos últimos anos tem se discutido muito o papel das enzimas metabolizadoras, especialmente do sistema do citocromo P450, e proteínas transportadores na fisiopatologia desses processos (HESSELINK; BOUAMAR; VAN GELDER, 2010).

Tabela 03 - Fatores de risco clínicos associados ao desenvolvimento de nefrotoxicidade ao uso de ICNs

*Fatores de risco associados à nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina***a. Superexposição sistêmica a ciclosporina e tacrolimus****b. Exposição local**

Interações com drogas que interferem no transporte mediado por PGP

Genótipo ABCB1 renal

Expressão do gene ABCB1 nas células epiteliais do túbulo renal

Exposição aos metabólitos da ciclosporina e tacrolimus

Genótipo CYP3A4 e CYP3A5 do paciente

Expressão do CYP3A5 nas células epiteliais do túbulo renal

Interação com outras drogas que levam a exposição alterada aos metabólitos dos ICNs

c. Idade avançada do rim**d. Uso de antiinflamatórios não-esteroidais****e. Depleção de sal ou uso de diuréticos****f. Polimorfismo genético de outros genes (TGF- β , ACE)**

Fonte: Naesens, Kuypers e Sarwal (2009)

1.3 GLICOPROTEÍNA-P (PGP)

A glicoproteína P (PGP), pertence à superfamília dos transportadores de membrana dependentes de ATP (ATP-binding cassette) (JULIANO; LING, 1976). É uma proteína transmembrana glicosilada pesando 170 KDa capaz de bombear muitas substâncias endógenas e uma ampla variedade de drogas, incluindo CsA e TAC, do citoplasma para o espaço extracelular (MARZOLINI et al., 2004; SAEKI et al., 1993). Apresenta múltiplas isoformas codificadas por famílias do gene MDR, no entanto, a isoforma conhecida em seres humanos por conferir resistência às drogas é uma proteína fosforilada e glicosilada composta de 1280 aminoácidos, consistindo de duas metades homólogas contendo seis segmentos transmembrana hidrofóbicos e um sítio de ligação intracelular com o ATP, codificada pelo gene ABCB1 (SAKAEDA, 2005).

O gene ABCB1 está localizado no q.21.1 do cromossomo 7 em um fragmento NruI de 600 Kb e a região codificadora do gene está contida em uma fragmento XhoI de 120 Kb. O gene

se estende por mais de 100 Kb, contendo 28 éxons, variando entre 49 e 587 bp de tamanho (AMBUDKAR et al., 2003; SAKAEDA, 2005). Mais de 50 SNPs, três inserções/deleções e várias alterações no promotor do gene que modificam sua transcrição foram descritas para o ABCB1 (SHAROM, 2008) (Figura 05 e Tabela 04).

Figura 05 – Estrutura secundária da PGP, mostrando os principais SNPs do gene ABCB1 avaliados no presente estudo

Fonte: Adaptada de Ieiri, Takane e Otsubo (2004)

Baseado na sua expressão em locais específicos como, intestino, fígado e rins, tem-se sugerido que a PGP atua como uma barreira protetora expulsando ativamente xenobióticos e outros metabólitos do interior das células para o lúmen intestinal, biliar ou urinário, diminuindo a absorção, acelerando a excreção biliar ou urinária e prolongando o tempo de exposição dos xenobióticos às enzimas metabolizadoras (HESSELINK; BOUAMAR; GELDER, 2010). A PGP também é expressa na barreira hematoencefálica (BHE), placenta e testículos, protegendo as células de toxinas exógenas e metabólitos (JULIANO; LING, 1976), em vários leucócitos, incluindo os linfócitos B e T e células dendríticas (KLIMECKI et al., 1994; RANDOLPH et al., 1998) (Figura 06).

Uma grande variedade de estímulos endógenos e exógenos pode estar envolvida regulação da expressão do gene ABCB1, incluindo algumas drogas citotóxicas e interação com outras drogas que inibem ou estimulam a expressão e função deste transportador, como por exemplo, os corticóides, os antibióticos, agentes antiarrítmicos ou anti-hipertensivos, antimicóticos e antiepiléticos, condições patológicas e presença de polimorfismos no gene ABCB1 (AMBUDKAR et al., 2003; NAESENS et al., 2009; STAATZ; GOODMAN; TETT, 2010).

Figura 06 - Principais locais de expressão e ação da PGP **a.** Reduz a absorção intestinal de seus substratos. **b.** Aumenta a excreção renal e hepática de seus substratos. **c.** Reduz a distribuição tecidual de seus substratos. Fonte: Adaptado de Fromm (2004)

Nos últimos anos pesquisas farmacológicas sobre a função do gene ABCB1 tem sido intensificadas com o objetivo de melhor definir as relações entre os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e a função do gene, especialmente com relação a alterações farmacocinéticas que possibilitem prever a sensibilidade dos indivíduos a diferentes drogas.

Três destes polimorfismos que são os mais comuns na população e se encontram em forte desequilíbrio de ligação, tem sido os mais estudados do ponto de vista farmacogenético. Dois deles, 1236C>T e 3435C>T, são polimorfismos silenciosos, estando o último relacionado à diminuição na estabilidade do DNA e baixos níveis de expressão da proteína (SUN et al., 2004). O terceiro, 2677G>T/A, causa uma mudança de aminoácidos estruturalmente relacionados (Ala893Ser/Thr), cujos efeitos são variáveis e dependentes da droga. Quando comparados aos SNPs, as combinações dos haplótipos podem resultar em ainda maiores diferenças na função da proteína porque cada SNP pode ter um efeito aditivo nas mudanças conformacionais da PGP. O polimorfismo 3435C>T, que resulta em uma mutação sinônima de aminoácidos, apresenta características diferentes de transporte quando associado com os alelos 2677G>T/A e 1236C>T do que quando comparado a esses alelos isoladamente (TSAI

et al., 2008). Embora estas evidências sejam convincentes, o desequilíbrio de ligação entre os SNPs não deve ser esquecido de modo a evitar possíveis fatores de confusão. O SNP 1236C>T, por exemplo, encontra-se em aproximadamente 90% de desequilíbrio (D') com o 2677G>T/A na maioria das populações (SISSUNG et al., 2010).

Tabela 04 - Polimorfismos em éxons mais comuns do gene ABCB1

Localização (éxon)	Variante Polimórfica	Efeito
1a	C-145G	Região não codificadora
1b	T-129C	Região não codificadora
2	A61G	Asn21Asp
5	T307C	Phe103Leu
7	A548G	Asn183Ser
11	G1199A	Ser400Asn
12	C1236T	Silencioso
13	C1474T	Arg492Cys
21	C2650T	Silencioso
21	G2677T/A	Ala893Thr (G2677T) Ala893Ser (G2677A)
24	A2956G	Met986Val
24	G2995A	Ala999Thr
26	A3320C	Gln1107Pro
26	C3396T	Silencioso
26	T3421A	Ser1141Thr
26	C3435T	Silencioso
28	G4030C	Silencioso
28	A4036G	Silencioso

Asn: asparagina **Ser:** serina **Ala:** alanina **Phe:** fenilalanina **Pro:** prolina **Gln:** glutamina
Asp: aspartato **Arg:** arginina **Met:** metionina **Thr:** treonina **Val:** valina **Cys:** cisteína
Leu: leucina

Fonte: Adaptado de Ambudkar et al. (2003), Sakaeda (2005)

Tabela 05 - Frequência alélica do gene ABCB1 em diferentes populações

População	3435C>T		1236C>T		2677G>T/A			Referências
	C	T	C	T	G	T	A	
Britânica	0,41	0,49	0,56	0,44	0,52	0,44	0,04	FREDERICKS et al., 2007
Alemã	0,46	0,54	0,59	0,41	0,56	0,42	0,02	CASCORBI et al., 2001
Italiana	0,55	0,45	0,54	0,46	0,53	0,43	0,04	TURTOLO et al., 2010
Chinesa	0,57	0,43	-	-	-	-	-	HU et al., 2006
Coreana	0,57	0,43	0,31	0,69	0,4	0,45	0,12	CHOI et al., 2007
Tanzaniana	0,84	0,16	-	-	0,97	0,03	0	FERREIRA et al., 2008
Brasileira								ESTRELA et al., 2008
Branços	0,55	0,45	0,59	0,41	0,61	0,38	0,01	
Mestiços	0,66	0,34	0,66	0,34	0,70	0,28	0,02	
Negros	0,69	0,31	0,67	0,33	0,81	0,18	0,01	

Fonte: Adaptado de Turolo et al. (2010)

Outro fator que deve ser levado em consideração no estudo farmacogenético dos polimorfismos do gene ABCB1 é a frequência alélica deste polimorfismo e seus haplótipos que varia amplamente entre os diferentes grupos étnicos (ESTRELA et al., 2008; SAKAEDA, 2005; SCHEINER; DAMASCENO; MAIA, 2010) (Tabelas 05 e 06).

Tabela 06 - Distribuição da frequência genotípica do gene ABCB1 na população brasileira

Posição	Genótipos	Brancos	Intermediários	Negros
1236C>T	CC	0,40	0,47	0,46
	CT	0,39	0,38	0,41
	TT	0,21	0,16	0,13
3435C>T	CC	0,32	0,40	0,50
	CT	0,45	0,52	0,41
	TT	0,23	0,08	0,09
2677G>T/A	GG	0,40	0,50	0,65
	GT	0,40	0,38	0,33
	GA	0,02	0,02	0,00
	TT	0,18	0,08	0,01
	TA	0,00	0,02	0,01

Fonte: Estrela et al. (2008)

Estudos investigando a existência de uma associação entre os SNPs do gene ABCB1 e a farmacocinética dos inibidores de calcineurina ainda são controversos (STAATZ; GOODMAN; TETT, 2010). Um grande número deles não encontrou associação entre a variação de genótipo ABCB1 e as concentrações plasmáticas (C_o) do tacrolimus (HAUFROID et al., 2004; HAUFROID et al., 2006; HESSELINK et al., 2003; MAI et al., 2004; MOURAD et al., 2006; ROY et al., 2006; SANTORO et al., 2011) ou outros parâmetros farmacocinéticos: área sob a curva (AUC), concentração máxima (C_{max}), tempo para se atingir a concentração máxima ($T_{máx}$) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) (TADA et al., 2005; TSUCHIYA et al., 2004). Contudo outros estudos mostram uma associação entre as concentrações e doses diárias de tacrolimus e os polimorfismos do gene ABCB1 (MACPHEE et al., 2002) ou de seus haplótipos (ANGLICHEAU et al., 2003).

Recentemente o foco dos estudos de associações em transplante renal mudou da associação farmacocinética dos ICNs para avaliação do desfecho dos transplantes. Hauser et al. (2005) foi o primeiro a relatar a influência do genótipo da proteína PGP na ocorrência de

nefrotoxicidade relacionada ao uso de ciclosporina após o transplante. Neste estudo, o genótipo do doador, mas não do receptor, estava relacionado ao desenvolvimento de NFTx. Aproximadamente 40% dos pacientes que receberam rins transplantados de um doador homozigoto para o alelo 3435T desenvolveram nefrotoxicidade em comparação com somente 10% dos pacientes que receberam rins com genótipos 3435CT ou 3435CC. Em outro estudo com 252 transplantados renais acompanhados por 03 anos, o genótipo 3435TT tanto do doador quanto do receptor estava associado com alta prevalência de fibrose intersticial e atrofia tubular, sendo mais acentuada quando ambos eram homozigotos para o genótipo em estudo. A sobrevida do enxerto, porém, não se mostrou relacionada ao genótipo (NAESENS et al., 2009). Outros estudos, não encontraram associação entre os genótipos da ABCB1 e piora na função do enxerto (BANDUR et al., 2008; HERBERT et al., 2003). Um estudo com receptores de transplante renal recebendo tanto tacrolimus quanto CsA mostrou que pacientes portadores do haplótipo ABCB1 1236C-3435T-2677G tinham risco de desenvolvimento de rejeição aguda 1,4 vezes maior quando comparados a variantes homozigotas (T-T-T) ou selvagens (C-G-C) (BANDUR et al., 2008). Em outro estudo, como receptores renais caucasianos, o haplótipo 1236T-3435T-2677T ocorreu com uma frequência de 41% em pacientes que apresentaram rejeição aguda e somente em 24% dos pacientes que não apresentaram e também mostraram um aumento significativo na probabilidades de desenvolvimento de RA quando comparados ao indivíduos selvagens C-G-C (GRINYO et al., 2008). Avaliando a relação entre haplótipos e nefrotoxicidade, um estudo envolvendo receptores e doadores observou que o haplótipo selvagem 3435C-2677G do doador estava relacionado a uma diminuição na incidência de NFTx quando comparados a indivíduos não portadores deste haplótipo (HAUSER et al., 2005). Contrariamente, um estudo com receptores de fígado tratados com TAC ou CsA mostrou que pacientes 3435C-2677G; 3435T-2677T exibiam uma maior frequência de desenvolvimento de disfunção renal do que qualquer haplótipo homozigoto, 50% dos indivíduos C-G;T-T, 31% C-G;C-G e 19% dos pacientes T-T;T-T tiveram um nível de creatinina maior ou igual a 1,6 mg/dL (HEBERT et al., 2003).

1.4 CITOCROMO P450 (CYP P450)

Além da PGP, outra classe de proteínas reconhecidamente importantes na regulação farmacocinética, especialmente em relação ao metabolismo de drogas, são as enzimas do complexo enzimático do citocromo P450.

O sistema do CYP450 representa uma superfamília de proteínas que possuem um grupo heme responsável pelo metabolismo de inúmeras substâncias endógenas e exógenas. É composto de mais de 50 isoenzimas classificadas em diferentes famílias e subfamílias baseadas na homologia dos genes. A subfamília do CYP3A forma o grupo mais abundante de enzimas e é responsável pelo metabolismo de mais da metade das drogas usadas clinicamente, incluindo o tacrolimus (EVANS; MCLEOD, 2003). Quatro isoenzimas da subfamília CYP3A já foram identificadas: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43 (ZHANG et al., 2005), que são codificadas pelo gene de mesmo nome localizados no q.22.1 do cromossomo 7, possuindo 90kb de tamanho. As isoenzimas da família 3A compartilham 85% de homologia na sequência de aminoácidos, contudo, diferem substancialmente na especificidade com os substratos e expressão (DE WILDT et al., 1999).

Em adultos as isoenzimas 3A4 e 3A5 são responsáveis pelo metabolismo da CsA e do TAC (AOYAMA et al., 1989; KARAMAN et al., 1994; KRONBACH; FISHER; MEYER, 1988). Ambas são expressas no intestino delgado e fígado. Nos rins, a expressão do CYP3A5 é maior do que a do CYP3A4 e concentra-se nas células epiteliais do túbulo proximal e no epitélio do ducto coletor, sendo menor no epitélio do túbulo distal (MURRAY et al., 1999). Existe uma grande diferença na atividade hepática e intestinal do CYP3A entre indivíduos que é, em parte, responsável pela grande variabilidade na farmacocinética dos inibidores de calcineurina (HESSELINK; BOUAMAR; VAN GELDER, 2010). Acredita-se que a predominante expressão do CYP3A5 nas células tubulares renais confira proteção aos rins contra nefrotoxicidade mediada por ICNs, através do aumento no metabolismo da droga e prevenção do acúmulo local (JOY et al., 2007; METADILIS et al., 2011).

Muitas drogas podem aumentar ou diminuir a atividade das enzimas do CYP através do aumento na biossíntese da isoenzima (indução enzimática) ou através da inibição de sua atividade (inibição enzimática). Essas alterações afetam o metabolismo e o clearance de várias drogas, devendo ser analisadas cuidadosamente, especialmente no caso de drogas com importantes efeitos adversos e janela terapêutica estreita, como no caso dos ICNs. Esses processos de indução/inibição enzimática podem ser promovidos por diversos fatores, como

interações com outras drogas, compostos naturais ou endógenos e também polimorfismos genéticos.

Assim como acontece para o gene ABCB1, o gene do CYP3A5 é expresso polimorficamente, como pelo menos 11 variantes tendo sido descritas até agora (THE HUMAN..., 2012). O mais estudado deles envolve uma transição da base adenina (A) para guanina (G) na posição 6986 (A6986G) dentro do íntron 3 (rs776746) e está associado a produção e atividade das proteínas do CYP3A5. Essa mutação A>G resulta em um erro de splicing no mRNA, produzindo uma proteína instável e não funcional (KUEHL et al., 2001). Indivíduos homozigotos ou heterozigotos portadores do alelo selvagem, nomeados CYP3A5*1/*1 e CYP3A5*1/*3 respectivamente, produzem altos níveis de mRNA e expressam níveis elevados da proteína funcional do CYP3A5, ao passo que, os indivíduos homozigotos para o alelo variante, CYP3A5*3/*3, produzem níveis muito baixos ou indetectáveis desta enzima (STAATZ; GOODMAN; TETT, 2010). Acredita-se que essa variação na expressão do CYP3A5 esteja relacionada com a variação individual na farmacocinética dos ICNs. Estudos demonstraram que a presença de pelo menos um alelo *1 esteja fortemente associada a um maior metabolismo *in vitro* de drogas metabolizadas pelo CYP3A5 (HUANG et al., 2004; KUEHL et al., 2001; LIN et al., 2002). Dessa maneira, indivíduos possuindo ao menos um alelo para o CYP3A5*1, teoricamente, deveriam apresentar maior clearance e menor biodisponibilidade das drogas metabolizadas por estas enzimas e, serem menos susceptíveis a problemas em relação à eficácia dos medicamentos quando utilizados nas doses padronizadas.

O polimorfismo A6986G é um polimorfismo incomum, pois frequência do seu alelo selvagem é menor do que a frequência para o alelo variante, sendo, também, altamente dependente da etnia (Tabelas 07 e 08).

Ao longo dos últimos anos, inúmeros estudos investigaram a associação entre os SNPs dos genes ABCB1 e CYP3A5 e a farmacocinética dos ICNs. Receptores de transplantes renais portadores do alelo CYP3A5*3 necessitavam de menores doses de TAC para atingir as concentrações alvo quando comparados a pacientes homozigotos selvagens (6986AA). Maiores doses de TAC foram necessárias em indivíduos portadores do alelo selvagem (CYP3A5*1) que receberam transplante de coração, fígado ou pulmão, sendo o efeito do CYP3A5 muito mais evidente do que o efeito dos polimorfismos do CYP3A4 e ABCB1 (DE JONGE; KUYERS, 2008). Outros estudos mostraram haver uma relação entre a biodisponibilidade de tacrolimus e o genótipo do CYP3A5. Indivíduos homozigotos *3/*3 e

*1/*1 apresentaram as maiores e menores biodisponibilidade, respectivamente (CHEN et al., 2009; SANTORO et al., 2011; WANG, 2009).

Tabela 07 - Frequência alélica do CYP3A5 em diferentes populações

População	n. indivíduos	Alelos		Referência
		G	A	
Britânica	133	0,89	0,11	FREDERICKS et al., 2007
Finlandesa	449	0,92	0,08	HILLI et al., 2007
Espanhola	177	0,91	0,09	GERVASINI et al., 2005
Chinesa	106	0,78	0,22	HU et al., 2006
Coreana	29	0,69	0,31	CHOI et al., 2007
Tanzaniana	110	0,14	0,75	FERREIRA et al., 2008

(Adaptado de TUROLO et al., 2010)

Tabela 08 - Frequência alélica do CYP3A5 na população brasileira

Etnia	Alelos		Referência
	G	A	
Branços	0,78	0,22	
Mestiços	0,64	0,36	SUAREZ-KURTZ et al., 2007
Negros	0,32	0,68	
População Geral	0,73	0,22	SANTORO et al., 2011

Poucos estudos foram realizados avaliando a associação entre os genótipos do CYP3A5 e disfunção renal induzida pelos imunossupressores. Kuypers et al. (2007) relatou uma maior incidência de nefrotoxicidade induzida por TAC em receptores de transplante renal com genótipos CYP3A4*1/CYP3A5*1 e CYP3A4*1B/CYP3A5*1 do que entre pacientes CYP3A4*1/CYP3A5*3. Contrariamente, outros estudos não encontraram uma associação significativa entre o genótipo CYP3A5 e a disfunção renal avaliada em termos de níveis de creatinina ou clearance (FERRARRESSO et al., 2007; HESSELINK et al., 2008; RENDERS et al., 2007; ROY et al., 2006). Quteineh et al. (2008) observou uma relação entre o CYP3A5*1/*1 e maior risco de desenvolvimento de rejeição aguda. Os mesmo resultados foram obtidos em outros estudos mostrando uma relação entre a diminuição na incidência e aumento no tempo de aparecimento dos primeiros episódios de rejeição aguda em pacientes com genótipos homozigotos variantes (FERRARRESSO et al., 2007; MACPHEE et al., 2004). Outros estudos não encontram associações tanto entre o genótipo do CYP3A5 e função renal em relação à sobrevivência do órgão após transplante renal (BANDUR et al., 2008; HESSELINK et al., 2008; KREUTZ et al., 2004; ROY et al., 2006; SANTORO et al., 2011).

2 OBJETIVOS

- Avaliar a associação entre os polimorfismos genéticos do CYP3A5 e da ABCB1 e o desenvolvimento de lesões renais decorrentes do uso de tacrolimus em pacientes transplantados renais;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos e a farmacocinética do tacrolimus;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento de rejeição aguda e crônica do enxerto em pacientes transplantados renais;
- Avaliar a sobrevida do enxerto com relação à conversão ou abandono do tratamento com TAC;
- Estudar a frequência alélica dos genes dos CYP3A5 e ABCB1 e seus polimorfismos na população ribeirão-pretana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Prontuários médicos de trezentos e noventa e oito (398) pacientes em acompanhamento na Unidade de Transplante Renal (UTR) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto foram analisados. Cento e oito (108) pacientes transplantados renais foram, então, selecionados para este estudo retrospectivo.

Os pacientes incluídos haviam sido transplantados a no mínimo 12 e no máximo 120 meses, fizeram uso de tacrolimus por pelo menos 12 meses e possuíam ao menos duas dosagens séricas da concentração deste fármaco realizadas. Não houve restrição quanto ao sexo, idade, etnia ou tipo de doador.

Foram excluídos do estudo pacientes que faziam uso contínuo de alguma de medicação capaz de interferir com a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de tacrolimus durante o período estudado, como os bloqueadores de canal de cálcio (diltiazem, nicardipina, nifedipina e verapamil), antiepiléticos (fenitoína, fenobarbital e carbamazepina), antimicóticos (fluconazol, itraconazol e cetoconazol), antibióticos macrolídeos (eritromicina, claritromicina e rifampicina), procinéticos (cisaprida e metoclopramida) e antiretrovirais (ritonavir e saquinavir). Os pacientes que fizeram uso esporádico de alguma destas medicações durante o período analisado, tiveram os dados relativos ao período de uso do medicamento removidos da análise.

Pacientes com doença hepática avançada (Child B e C), que conhecidamente faziam uso crônico de álcool, drogas e/ou antiinflamatórios não esteroidais (AINES), portadores de transplante duplo (fígado /rins) e, que iniciaram a terapia com tacrolimus mais de dois meses após o transplante também foram excluídos do estudo.

Todos os pacientes que se encaixaram nos critérios estabelecidos e concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP, de acordo com o processo HCRP nº 13464/2010, foram convocados a se submeter à coleta de sangue, em jejum, para extração do DNA.

3.2 TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA

Os pacientes em estudo fizeram uso, em sua maioria, de terapia imunossupressora consistindo de tacrolimus, micofenolato de mofetila (ou micofenolato sódico) e esteróides conforme protocolo de tratamento adotado pela Unidade de Transplante Renal (UTR) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Uma dose inicial de tacrolimus entre 0,2 – 0,3 mg/kg foi administrada no primeiro dia de tratamento e subsequente ajustada para obtenção de concentrações plasmáticas (Co) entre 10 e 14 ng/mL no primeiro mês após o transplante (Tx), entre 08 e 12 ng/mL até o final do primeiro ano e entre 04-06 ng/mL do primeiro ano em diante. Micofenalto de mofetila (MMF) ou micofenolato sódico (MFS) foram administrados oralmente como parte da terapia imunossupressora em doses fixas de 2,00 e 1,44 g/dia, respectivamente.

Alguns pacientes receberam uma dose de 1g intravenosa (IV) de metilprednisona antes do transplante e doses orais de prednisona (0,5 mg/kg/dia) logo após o transplante, sendo reduzidas gradualmente até uma dose de 5 mg/dia do sexto mês em diante.

Pacientes considerados de risco nefrológico (doadores maiores de 60 anos de idade, resultados positivos de painel imunológico e que possuíam mais de três incompatibilidades de HLA) receberam duas (02) doses de 20 mg/cada intravenoso (IV) de basiliximabe no pré-operatório e quatro dias após o transplante ou uma dose de globulina antitímocítica (ATG).

3.3 DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos e demográficos do período compreendendo os primeiros 03 anos (36 meses) após a realização do transplante renal foram obtidos por revisão dos prontuários dos 108 pacientes selecionados no ambulatório de transplante renal das Disciplinas de Urologia e de Nefrologia da FMRP-USP.

Os dados demográficos incluem idade, sexo e etnia do receptor, sendo esta última obtida através da autodeclaração dos pacientes.

Os seguintes dados clínicos foram levantados:

- a. Dados relativos ao doador renal:** Idade, presença de doença de base (se doador cadáver), tempo de isquemia fria (se doador cadáver), creatinina do doador no

momento da retirada do órgão, tipo de doador (vivo ou cadáver) e histórico de doenças cardiovasculares (AVC isquêmico, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca), hipertensão arterial e diabetes mellitus.

- b. Dados relativos ao receptor:** Idade, presença de doença de base, histórico de transplante anterior, histórico de doença auto-imune, número de transfusões sanguíneas, painel imunológico, compatibilidade HLA, medicamentos em uso (antes e início do transplante), tempo de diálise e necessidade de terapia de indução com basiliximabe ou ATG.
- c. Dados relativos à condução do transplante renal:** Esquema de imunossupressão inicial, descontinuação da terapia com esteróides, histórico de infecção grave, de infecção por vírus CMV ou re-internação após a alta.
- d. Dados de desfecho clínico 12 e 36 meses após transplante renal:** clearance de creatinina, episódios de lesão renal, rejeição aguda (RA) e nefropatia crônica do enxerto comprovados por biópsia, nível de FK sérico, dose de FK prescrita, taxa de abandono/conversão de FK, incidência de eventos adversos (HAS, DM e dislipidemia).

Presença dos efeitos adversos foi avaliada pela alteração dos valores de pressão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg), glicose sanguínea (≥ 126 mg/dL) e lipidograma (colesterol ≥ 200 mg/dL; HDL ≥ 35 mg/dL; LDL ≥ 130 mg/dL e triglicérides ≥ 150 mg/dL) e/ou necessidade de introdução de terapia medicamentosa. Consideramos infecções graves, casos provenientes de agentes bacterianos, fúngicos ou virais nos quais os pacientes necessitavam de internação por um período superior a três (03) dias. Casos de re-internação após a alta hospitalar só foram documentados quando o motivo não era a realização de biópsias.

A dosagem de creatinina, glicemia e lipidograma foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do HCFMRP-USP com metodologia padrão. A dosagem plasmática de tacrolimus foi realizada pelo laboratório de Imunologia Molecular pelo método de Elisa (*Abbott ARCHITECT tacrolimus assay*).

3.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS:

3.4.1 Obtenção e Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA, amostras de sangue de 08 mL dos pacientes foram obtidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Parte desta amostra (03 mL) foi centrifugada e o plasma separado e congelado à -70°C , e 01 mL restante foi armazenado como back-up. A camada leucocitária (buffy coat) foi separada do restante da amostra (04 mL) e submetida à extração de DNA pelo método de salting-out (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Após a extração, as amostras de DNA foram divididas em alíquotas de 30 ng/ μL de DNA em água milliQ autoclavada e armazenadas no Laboratório da Nefrologia (Anexo A- FMRP-USP) à -20°C em freezer apropriado até o ensaio de PCR. O restante do DNA foi armazenado para estudos futuros no banco de Amostras FARMAGEN (Lab. Nefrologia, Anexo A FMRP-USP), registrado como banco de amostras pelo CEP do HCFMRP-USP e pela CONEP (processo HCRP 3416/2003). As amostras armazenadas serão utilizadas para estudos futuros somente após a obtenção de novo TCLE específico para o novo estudo em questão.

3.4.2 Identificação dos polimorfismos genéticos

Os SNPs rs776746 (6986 A>G) do gene do CYP3A5 e rs1045642 (3435 C>T), rs1128503 (1236 C>T) e rs2032582 (2677 G>T/A) do gene ABCB1 relacionados a alterações de função do CYP450 e PGP, respectivamente, foram genotipados através da reação da polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), utilizando os ensaios de discriminação alélica TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), identificados segundo a tabela 09.

Tabela 09 - Descrição das sequências referências e identificação dos ensaios Taqman®

Gene	ID do ensaio*	SNP ID*	Polimorfismo	Sequência Contexto
ABCB1	C_7586657_20	rs1045642	3435 C>T	TGTTGGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC[A/G]ATCTTCTCTGTGACACCACCCGGC
	C_7586662_10	rs1128503	1236 C>T	GCCCACTCTGCACCTTCAGGTTTCAG[A/G]CCCTTCAAGATCTACCAGGACGAGT
	C_11711720D_40	rs2032582	2677 G>A	TATTTAGTTTGACTCACCTTCCCAG[C/T]ACCTTCTAGTTCTTTCTTATCTTTC
	C_11711720C_30	rs2032582	2677 G>T	TATTTAGTTTGACTCACCTTCCCAG[C/A]ACCTTCTAGTTCTTTCTTATCTTTC
CYP3A5	C_26201809_30	rs776746	6986 A>G	ATGTGGTCCAAACAGGGAAGAGATA[T/C]TGAAAGACAAAAGAGCTCTTTAAAG

*ID: identificação

Amostras de 30 ng de DNA foram adicionadas aos primers e ao Master Mix (Roche, Branchburg, New Jersey, USA) em um volume final de reação de 10 µL por tubo e processadas de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 10).

Tabela 10 - Conteúdo dos poços da placa de PCR

Reagentes	Volume (µL/poço)
Master Mix (2x)	5,00
Taqman® (20x)	0,50
DNA (30 ng/µL)	1,00
H ₂ O milliQ	3,50
Volume final	10,00 µL

A amplificação do PCR foi realizada utilizando o equipamento Roche LightCycler® 480, e os resultados analisados com o software versão 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

A termociclagem consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto e, um ciclo de resfriamento a 37 °C por 10 segundos. Análise de controles positivos e negativos foi realizada em cada corrida e a discriminação alélica foi realizada pela medida da fluorescência final (Endpoint Genotyping Analysis) dos fluoróforos VIC® e FAM® (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

3.5. ANÁLISE DO DESFECHO CLÍNICO

Para análise do desfecho clínico do transplante renal foram analisados os seguintes parâmetros:

- Surgimento de lesões renais avaliadas histologicamente por um patologista e classificadas em vacuolização isométrica (VI), necrose tubular aguda (NTA), fibrose intersticial (FI) e atrofia tubular (AT). Os casos de NTA diagnosticados até 3 meses após o transplante renal não foram incluídos neste estudo;
- Rejeição celular aguda confirmada através da análise das biópsias ou necessidade de terapia com pulso de corticóides e a nefropatia crônica, também confirmada por biópsia seguindo BANFF 07 analisada por um patologista (SOLEZ et al., 2008);
- Clearance de creatinina foi avaliado pela equação de Cockcroft-Gault (abaixo), utilizando os dados retirados dos prontuários dos pacientes ao longo do período estudado;

$$\text{Clearance de creatinina} = \frac{(140 - \text{idade}) \times \text{Peso (kg)}}{72 \times \text{creatinina (mg/dL)}} \times 0,85 \text{ para mulheres}$$

- Sobrevida do enxerto e frequência de abandono/conversão utilizando a análise de Kaplan-Meier. Considerou-se abandono do tratamento os casos nos quais os pacientes tiveram remoção completa da medicação no período superior a 12 meses pós-transplante e casos de conversão aqueles nos quais os pacientes mudaram o tratamento farmacológico de TAC para um fármaco não ICNs.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

No presente estudo, consideramos desfechos primários a análise de sobrevida do enxerto livre de nefrotoxicidade e a preservação da função renal em 12 e 36 meses. A hipótese em teste é a de que o grupo sem mutações genéticas para a PGP apresente proteção contra nefrotoxicidade pelo TAC. Assim, estimamos que a presença de lesões renais reduzirá a função renal medida pelo clearance de creatinina em pelo menos 20% ao longo do primeiro ano de transplante. Utilizando os dados da literatura, observamos que ao final de 12 meses o

clearance de creatinina encontra-se com valor médio de $58,8 \pm 20,5$ mL/min/1,73m² (VINCENTI et al., 2008).

Utilizando o programa Power and Sample Calculation (PS versão 2.1.30 – Vanderbilt University) e estabelecendo uma alocação 1:2 (Controle vs mutado), poder de 0,80 e erro tipo 1 de 0,05, foi calculado um tamanho amostral de 100 transplantados.

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada locus. Para a associação de haplótipos utilizamos o software PHASE, versão 2.1. O programa EH (Estimating Haplotype, acessado em <http://linkage.rockefeller.edu/ott/eh.htm> na data de 27 de fevereiro de 2012) foi utilizado para avaliação dos desequilíbrios de ligação. O programa calcula o D' (máxima probabilidade de desequilíbrio), que é a medida padrão para cálculo do desequilíbrio de ligação. Os valores de desequilíbrio D' estimados para cada par de variantes foi calculado como $D' = D/D_{\text{máx}}$, onde $D' = h - (p \times q)$ (MARRONI et al., 2005). Neste cálculo, p e q são as frequências das variantes mais raras dos dois polimorfismos testados para o desequilíbrio, de maneira que $p \leq q \leq 0,5$, e h é a frequência do haplótipo que inclui as duas variantes em estudo. Quando $D < 0$, $D_{\text{máx}} = -p \times q$; quando $D > 0$, $D_{\text{máx}} = p(1 - q)$. Assim, os valores D' podem variar de +1 a -1, com valores positivos de D' indicando que as variantes mais raras estão associadas e valores de D' negativos indicando que as variantes mais raras de um polimorfismo estão associadas com a variante mais comum do outro locus.

Dados quantitativos estão expressos como média e desvio padrão e mediana e percentis. Grupos foram comparados utilizando teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparação entre pares de colunas e teste de Mann-Whitney U para a avaliação da função renal ao fim de 12 ou 36 meses. Variáveis categóricas ordinais estão representados como frequência e porcentagem, sendo considerados não paramétricos e avaliados utilizando teste de Fischer e χ^2 .

As análises foram feitas com o uso do software Minitab 15 Statistical Software (2007) (Computer software, State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)) e GraphPad Prism version 5.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, (www.graphpad.com)) e com o auxílio do Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ) da FMRP-USP.

Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

Um total de 108 pacientes transplantados renais foram incluídos neste estudo. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o genótipo apresentado. As tabelas 09 a 12 apresentam as características clínicas e demográficas dos pacientes estudados com relação aos genótipos do CYP3A5 (Tabela 11) e da PGP (Tabela 12 a 14) ao final de 12 meses após o transplante.

A idade média do pacientes no momento do transplante era de $50,04 \pm 11,53$ anos. Quarenta e nove (49) dos 108 pacientes eram do sexo feminino e não houve distinção entre os grupos, mostrando haver uma distribuição equilibrada entre os gêneros e idade. No momento da coleta dos dados, os pacientes se autodeclararam brancos, negros, mulatos ou amarelos, porém os pacientes negros e mulatos foram agrupados em um único grupo denominado não branco. Um único paciente declarou-se amarelo e não foi incluído no estudo. Observamos uma tendência de diminuição na frequência alélica no grupo não branco para os pacientes homozigotos variantes para o CYP3A5 e ABCB1 2677G>T/A, porém, em virtude da ampla variação na frequência alélica entre os grupos étnicos, tal fato já era esperado.

A maioria dos transplantes foi de doadores cadáveres (90/108), seguindo a tendência presente atualmente no Brasil. Dos 108 pacientes, 65 (60%) deles necessitaram de terapia de indução com o anticorpo monoclonal basiliximabe e 06 (06%) fizeram uso da terapia com globulina antitimocítica (ATG). O tempo médio de isquemia fria (TIF) foi de $24,29 \pm 9,77$ horas e o tempo de diálise pré-transplante $54,49 \pm 44,22$ meses. Vinte e dois por cento (22%) dos pacientes desenvolveram infecção por citomegalovírus (CMV) e 34% algum tipo de infecção grave caracterizada por internação por um período superior a 03 dias.

Esses e outros parâmetros clínicos (colesterol total e frações, glicemia e pressão arterial) analisados ao longo do primeiro ano após o transplante renal não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados, tanto em relação ao genótipo do CYP3A5 quanto da PGP.

Tabela 11 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais relação ao gene CYP3A5

Parâmetros	Todos pacientes (n=108)	CYP3A5*1/*1 (n=12)	CYP3A5*1/*3 (n=33)	CYP3A5*3/*3 (n=63)	Valor p*
Idade (anos)	50,04 ± 11,53	52,58 ± 14,05	49,52 ± 11,65	49,70 ± 11,08	0,790
Sexo (masc./feminino)	59/49	07/05	16/17	36/27	0,694
Etnia (n.%)					0,001
Branco	88 (82%)	05 (42%)	27 (82%)	56 (89%)	
Não branco	20 (18%)	07 (58%)	06 (18%)	07 (11%)	
Peso (kg)	66,49 ± 14,04	63,41 ± 16,54	66,93 ± 16,15	66,84 ± 12,44	0,770
Colesterol Total (mg/dL)	195,70 ± 41,36	188,70 ± 53,70	200,90 ± 44,11	194,30 ± 37,68	0,601
HDL (mg/dL)	45,63 ± 11,26	47,78 ± 15,67	48,89 ± 12,17	43,50 ± 9,41	0,120
LDL (mg/dL)	108,80 ± 31,72	90,73 ± 43,45	107,00 ± 33,66	113,10 ± 27,14	0,081
Triglicerídeos (mg/dL)	194,70 ± 101,00	201,20 ± 113,1	207,00 ± 115,9	186,90 ± 90,79	0,748
PA sistólica (mmHg)	126,90 ± 13,70	122,20 ± 17,57	124,60 ± 12,57	129,10 ± 12,29	0,050
PA diastólica (mmHg)	78,89 ± 7,40	77,86 ± 9,69	78,34 ± 6,66	79,38 ± 7,37	0,592
Glicemia (mg/dL)	100,60 ± 20,04	103,1 ± 30,22	99,36 ± 18,62	100,80 ± 18,70	0,929
Tipo doador (cadáver/ vivo)	90/18	9/3	27/6	54/09	0,634
Histórico de Tx anterior (n.%)	13 (12%)	02 (17%)	03 (09%)	08 (12%)	0,764
Terapia de indução (n.,%)					
Basiliximabe	65 (60%)	09 (75%)	17 (51%)	39 (62%)	0,331
ATG	06 (06%)	0 (0%)	02 (06%)	04 (6%)	-
Histórico de Infecção Grave (n., %)	37 (34%)	03 (25%)	10 (30%)	24 (38%)	0,578
Infecção por CMV (n.,%)	24 (22%)	01 (08%)	06 (18%)	17 (27%)	0,290
Reinternação (n., %)	64 (59%)	05 (42%)	19 (58%)	40 (63%)	0,360
Tempo de isquemia fria (h)	24,29 ± 9,77	24,65 ± 8,73	24,08 ± 11,74	24,35 ± 8,84	0,906
Tempo diálise pré-Tx (meses)	54,49 ± 44,22	66,17 ± 44,31	53,03 ± 44,22	52,98 ± 44,93	0,340
Dose Corticóide/kg (mg/dia/kg)	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,370

HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PA: pressão arterial; Tx: transplante; ATG: globulina antitimocítica; CMV: citomegalovírus
Os dados representam a média ± desvio padrão

Tabela 12 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais em relação ao gene ABCB1 1236C>T

Parâmetros	Todos pacientes (n=108)	1236CC (n=40)	1236CT (n=51)	1236TT (n=17)	Valor p*
Idade (anos)	50,04 ± 11,53	49,93 ± 10,16	49,75 ± 12,36	51,18 ± 12,56	0,858
Sexo (masc./feminino)	59/49	24/16	26/25	09/08	0,684
Etnia (n.%)					0,955
Branco	88 (82%)	32 (80%)	42 (83%)	14 (82%)	
Não branco	20 (18%)	08 (20%)	09 (17%)	03 (18%)	
Peso (kg)	66,49 ± 14,04	66,00 ± 13,13	66,20 ± 15,91	68,48 ± 10,07	0,646
Colesterol Total (mg/dL)	195,70 ± 41,36	193,70 ± 44,55	195,70 ± 42,30	198,70 ± 31,50	0,691
HDL (mg/dL)	45,63 ± 11,26	46,18 ± 12,10	44,22 ± 10,25	48,64 ± 12,17	0,307
LDL (mg/dL)	108,80 ± 31,72	107,20 ± 33,70	110,00 ± 28,97	108,80 ± 36,94	0,957
Triglicérides (mg/dL)	194,70 ± 101,00	187,90 ± 110,20	204,00 ± 95,95	182,30 ± 96,55	0,375
PA sistólica (mmHg)	126,90 ± 13,70	127,90 ± 13,79	125,10 ± 12,68	130,10 ± 13,05	0,544
PA diastólica (mmHg)	78,89 ± 7,40	79,16 ± 7,20	78,76 ± 8,29	78,66 ± 4,99	0,938
Glicemia (mg/dL)	100,60 ± 20,04	102,80 ± 21,51	100,10 ± 20,95	97,00 ± 12,63	0,850
Tipo doador (cadáver/ vivo)	90/18	34/06	39/12	17/0	0,074
Histórico de Tx anterior (n.%)	13 (12%)	06 (15%)	06 (12%)	01 (6%)	0,628
Terapia de indução (n.,%)					
Basiliximabe	65 (60%)	27 (68%)	26 (51%)	12 (71%)	0,177
ATG	06 (06%)	02 (05%)	03 (06%)	01 (6%)	-
Histórico de Infecção Grave (n.,%)	37 (34%)	13 (33%)	20 (39%)	04 (23%)	0,477
Infecção por CMV (n.,%)	24 (22%)	09 (23%)	10 (20%)	05 (29%)	0,701
Reinternação (n., %)	64 (59%)	24 (60%)	29 (57%)	11 (65%)	0,844
Tempo de isquemia fria (h)	24,29 ± 9,77	24,26 ± 8,78	23,20 ± 11,60	27,44 ± 4,93	0,420
Tempo diálise pré-Tx (meses)	54,49 ± 44,22	58,50 ± 48,54	49,51 ± 37,50	60,47 ± 54,33	0,745
Dose Corticóide/kg (mg/dia/kg)	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,616

HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PA: pressão arterial; Tx: transplante; ATG: globulina antitimocítica; CMV: citomegalovírus
Os dados representam a média ± desvio padrão

Tabela 13 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais em relação ao gene ABCB1 3435C>T

Parâmetros	Todos pacientes (n=108)	3435CC (n=40)	3435CT (n=49)	3435TT (n=19)	Valor p*
Idade (anos)	50,04 ± 11,53	50,25 ± 10,19	50,24 ± 12,26	49,05 ± 12,76	0,942
Sexo (masc./feminino)	59/49	24/16	25/24	10/09	0,686
Etnia (n.%)					0,172
Branco	88 (82%)	29 (73%)	42 (86%)	17 (89%)	
Não branco	20 (18%)	11 (27%)	07 (14%)	02 (11%)	
Peso (kg)	66,49 ± 14,04	66,71 ± 13,38	66,17 ± 14,98	66,82 ± 13,24	0,969
Colesterol Total (mg/dL)	195,70 ± 41,36	198,20 ± 44,18	191,40 ± 37,39	201,70 ± 46,16	0,506
HDL (mg/dL)	45,63 ± 11,26	46,74 ± 13,90	45,34 ± 9,30	44,03 ± 10,04	0,917
LDL (mg/dL)	108,80 ± 31,72	105,50 ± 35,32	110,10 ± 30,32	112,03 ± 27,96	0,940
Triglicérides (mg/dL)	194,70 ± 101,00	201,60 ± 120,80	178,20 ± 67,77	223,00 ± 123,50	0,657
PA sistólica (mmHg)	126,90 ± 13,70	126,90 ± 14,29	126,70 ± 12,59	127,60 ± 12,84	0,895
PA diastólica (mmHg)	78,89 ± 7,40	78,16 ± 7,44	79,56 ± 7,48	78,71 ± 7,37	0,567
Glicemia (mg/dL)	100,60 ± 20,04	102,30 ± 21,18	99,32 ± 19,72	100,40 ± 19,17	0,803
Tipo doador (cadáver/ vivo)	90/18	33/07	41/08	16/03	0,983
Histórico de Tx anterior (n.%)	13 (12%)	04 (10%)	08 (16%)	01 (5%)	0,426
Terapia de indução (n.,%)					
Basiliximabe	65 (60%)	26 (65%)	28 (57%)	11 (58%)	0,734
ATG	06 (06%)	02 (05%)	03 (06%)	01 (5%)	0,972
Histórico de Infecção Grave (n., %)	37 (34%)	15 (38%)	16 (33%)	06 (32%)	0,859
Infecção por CMV (n.,%)	24 (22%)	10 (25%)	12 (25%)	02 (10%)	0,401
Reinternação (n., %)	64 (59%)	25 (63%)	29 (59%)	10 (53%)	0,771
Tempo de isquemia fria (h)	24,29 ± 9,77	23,66 ± 9,10	24,81 ± 10,37	24,32 ± 10,11	0,942
Tempo diálise pré-Tx (meses)	54,49 ± 44,22	56,92 ± 43,65	51,18 ± 44,27	58,16 ± 48,10	0,679
Dose Corticoide/kg (mg/dia/kg)	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,560

HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PA: pressão arterial; Tx: transplante; ATG: globulina antitimocítica; CMV: citomegalovírus
Os dados representam a média ± desvio padrão

Tabela 14 - Dados clínicos e demográficos de 108 pacientes transplantados renais em relação ao gene ABCB1 2677G>T/A

Parâmetros	Todos pacientes (n=108)	2677GG (n=48)	2677GT (n=44)	2677TT (n=16)	Valor p*
Idade (anos)	50,04 ± 11,53	50,73 ± 10,64	48,52 ± 12,00	52,13 ± 12,94	0,600
Sexo (masc./feminino)	59/49	26/22	24/20	09/07	0,989
Etnia (n.%)					0,037
Branco	88 (82%)	34 (71%)	40 (91%)	14 (88%)	
Não branco	20 (18%)	14 (29%)	04 (9%)	02 (12%)	
Peso (kg)	66,49 ± 14,04	66,75 ± 13,91	65,27 ± 15,28	69,04 ± 10,88	0,720
Colesterol Total (mg/dL)	195,70 ± 41,36	193,30 ± 42,76	196,40 ± 43,66	201,60 ± 30,80	0,479
HDL (mg/dL)	45,63 ± 11,26	47,42 ± 13,26	43,43 ± 7,82	46,31 ± 12,43	0,593
LDL (mg/dL)	108,80 ± 31,72	103,40 ± 34,74	112,60 ± 30,14	114,90 ± 24,42	0,508
Triglicérides (mg/dL)	194,70 ± 101,00	188,30 ± 109,90	194,00 ± 92,22	216,30 ± 99,55	0,384
PA sistólica (mmHg)	126,90 ± 13,70	125,90 ± 14,40	127,20 ± 12,49	129,10 ± 11,47	0,683
PA diastólica (mmHg)	78,89 ± 7,40	78,33 ± 7,54	79,76 ± 8,03	78,18 ± 4,85	0,529
Glicemia (mg/dL)	100,60 ± 20,04	104,40 ± 24,33	97,04 ± 16,45	99,05 ± 12,14	0,333
Tipo doador (cadáver/ vivo)	90/18	40/08	34/10	16/0	0,113
Histórico de Tx anterior (n.%)	13 (12%)	07 (15%)	04 (09%)	02 (12%)	0,743
Terapia de indução (n.,%)					
Basiliximabe	65 (60%)	32 (67%)	22 (50%)	11 (69%)	0,198
ATG	06 (06%)	03 (06%)	01 (02%)	02 (12%)	-
Histórico de Infecção Grave (n. %)	37 (34%)	16 (33%)	16 (36%)	05 (31%)	0,919
Infecção por CMV (n.,%)	24 (22%)	08 (17%)	13 (30%)	03 (19%)	0,311
Reinternação (n., %)	64 (59%)	29 (60%)	26 (59%)	09 (56%)	0,957
Tempo de isquemia fria (h)	24,29 ± 9,77	24,23 ± 9,25	22,90 ± 11,30	28,17 ± 5,25	0,230
Tempo diálise pré-Tx (meses)	54,49 ± 44,22	54,04 ± 44,15	55,98 ± 44,19	51,69 ± 48,49	0,700
Dose Corticóide/kg (mg/dia/kg)	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,350

HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; PA: pressão arterial; Tx: transplante; ATG: globulina antitimocítica; CMV: citomegalovírus
Os dados representam a média ± desvio padrão

4.2 FREQUÊNCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA

Para a análise dos genótipos dos genes do CYP3A5 e da PGP incluímos 108 indivíduos transplantados renais. Ambos os genótipos não apresentaram desvios significativos do esperado de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg.

Nossa análise segue em acordo com vários trabalhos da literatura mostrando que polimorfismo do CYP3A5 6986A>G é um polimorfismo incomum com menor frequência do alelo selvagem em relação ao alelo variante. Em nosso trabalho mostramos que a frequência do genótipo variante GG (*3/*3) é em torno de 58%, sendo frequência do alelo variante G (*3) 74% (Tabela 15).

Em relação aos genótipos da PGP, encontramos frequências muito parecidas com a de trabalhos recém-publicados sobre população brasileira. O polimorfismo 1236C>T possui uma frequência de 60% para o alelo selvagem C, sendo a frequência genotípica dos indivíduos heterozigotos levemente superior (47%). Frequências similares foram observadas para os indivíduos 3435C>T, com predomínio dos indivíduos heterozigotos (45,4%) e do alelo selvagem C (60%). O polimorfismo 2677G>T/A é um SNP tri-alélico que pode resultar na mudança do aminoácido alanina para treonina (2677G>T) ou serina (2677G>A). Ambos os aminoácidos, serina e treonina, são compostos polares química e estruturalmente semelhantes. Em consonância com estudos realizados por outros autores, também encontramos uma frequência muito baixa do alelo A (02%), sendo que nenhum dos indivíduos é homozigoto variante AA. O alelo G apresentou a maior frequência (65%), com o genótipo GG sendo o mais comum (44%). O alelo variante T possui uma frequência de 33% estando presente em 13% dos genótipos homozigotos (Tabela 15). Devido à baixa frequência do alelo A e por codificar um aminoácido química e estruturalmente semelhante ao aminoácido codificado pelo alelo T, neste trabalho incluímos os indivíduos GA, que apresentam somente um alelo variante (A), no grupo dos indivíduos heterozigotos GT e os indivíduos AT (com dois alelos variantes) no grupo dos homozigotos TT.

A tabela 16 mostra a distribuição dos haplótipos do gene ABCB1. Encontramos 09 haplótipos possíveis, sendo o haplótipo homozigoto selvagem 2677G-3435C-1236C o mais comuns deles (49%), seguido pelo haplótipo homozigoto variante 2677T-3435T-1236T que aparece em 30% dos indivíduos. Os demais haplótipos apresentaram frequências muito inferiores e, portanto, não foram considerados em nossas análises.

O estudo do desequilíbrio de ligação nos mostra que todos os polimorfismos da PGP encontram-se em desequilíbrio de ligação, 1236C>T – 2677G>T/A ($D' = 1,0000$), 1236C>T – 3435C>T ($D' = 0,5579$) e 3435C>T – 2677G>T/A ($D' = 1,000$). Além disso, o CYP3A5 também localizado no braço longo cromossomo 7 encontra-se em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,4603$) com o SNP 1236C>T (Figura 07).

Tabela 15 - Frequências alélicas e genotípicas dos genes do CYP3A5 e ABCB1 de 108 pacientes transplantados renais

Gene	Genótipo	Alelo	Frequência Genótipo	Frequência Alélica	n. Pacientes	Equilíbrio HW ^a (P valor)
CYP3A5	*1/*1	AA	11,1%	F(A) = 26%	12	0,09
	*1/*3	AG	30,6%		33	
	*3/*3	GG	58,3%	F(G) = 74%	63	
ABCB1	1236C>T	CC	37,0%	F(C) = 60%	40	0,99
		CT	47,2%		51	
		TT	13,9%	F(T) = 40%	17	
	3435C>T	CC	37,0%	F(C) = 60%	40	0,84
		CT	45,4%		49	
		TT	17,6%	F(T) = 40%	19	
	2677G>A/T	GG	44,4%	F(G) = 65%	48	0,93
		GT	38,0%		41	
		GA	2,8%	F(A) = 02%	3	
		AT	1,9%		2	
		TT	13,0%	F(T) = 33%	14	
		AA	0,0%		0	

a. Valor de P calculado pelo teste χ^2 entre a distribuição de frequência de genótipos observada e a distribuição de genótipos esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW)

Tabela 16 - Frequência dos haplótipos do gene ABCB1 em 108 pacientes transplantados renais

Haplótipos	Posição			Frequência (%)	n. fitas
	2677	3435	1236		
GCC	G	C	C	49,07%	106
TTT	T	T	T	30,09%	68
GTC	G	T	C	8,80%	19
GCT	G	C	T	6,48%	14
TCT	T	C	T	2,31%	05
ACC	A	C	C	1,85%	04
GTT	G	T	T	0,46%	01
ATC	A	T	C	0,46%	01
TTC	T	T	C	0,46%	01

Figura 07 - Esquema mostrando o desequilíbrio de ligação entre os genes do CYP3A5 e ABCB1 presentes no cromossomo 7. D' é a máxima probabilidade de desequilíbrio. Os valores D' podem variar de +1 a -1, com valores positivos de D' indicando que as variantes mais raras estão associadas.

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E FARMACOCINÉTICA

4.3.1 CYP3A5 e Farmacocinética do TAC

As figuras 08 a 13 mostram a influência dos polimorfismos do CYP3A5 sobre alguns parâmetros farmacocinéticos, como concentração plasmática do tacrolimus (Co); a dose corrigida pelo peso do paciente (dose/kg) e a razão entre a concentração plasmática do fármaco e a dose ingerida (Co/dose) ao final de 12 e 36 meses após o transplante. Os indivíduos foram separados em três genótipos distintos CYP3A5*1/*1 (6986AA), CYP3A5*1/*3 (6986AG) e CYP3A5*3/*3 (6986GG).

Não observamos diferenças significativas na concentração plasmática (Co) de tacrolimus entre os três genótipos avaliados nos diferentes períodos estudados, porém observamos que os indivíduos portadores do alelo selvagem *1 possuíam uma necessidade de dose maior de tacrolimus para indivíduos homozigotos e heterozigotos para atingirem concentrações plasmáticas semelhantes as do grupo homozigoto variante ($0,10 \pm 0,03$ e $0,09 \pm 0,03$ vs. $0,06 \pm 0,03$ mg/dia/kg, respectivamente) tanto ao final de 12 meses quanto 36 meses após o transplante.

A presença do alelo *1 também se encontrou fortemente associada à razão entre concentração plasmática do fármaco e a dose ingerida (Co/dose) em ambos os períodos estudados. Ao final do primeiro ano de transplante pacientes CYP*3/*3 apresentavam praticamente o dobro da razão Co/dose quando comparados com os pacientes CYP*1/*1 ($144,60 \pm 67,29$ vs. $70,44 \pm 56,05$ ng*mL⁻¹/mg*kg⁻¹/dia).

Figura 08 – Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos do CYP3A5 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 12 homozigotos selvagens (*1), 33 heterozigotos (*1/*3) e 63 homozigotos para o alelo variante (*3). Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 09 – Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos do CYP3A5 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 08 homozigotos selvagens (*1), 21 heterozigotos (*1/*3) e 35 homozigotos para o alelo variante (*3). Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 10 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos do CYP3A5 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 12 homozigotos selvagens (*1), 33 heterozigotos (*1/*3) e 63 homozigotos para o alelo variante (*3).

** diferença significativa entre *1/*1 x *3/*3 ($p < 0,01$)
 • • • diferença significativa entre *1/*3 x *3/*3 ($p < 0,001$)
 Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 11 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos do CYP3A5 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 08 homozigotos selvagens (*1), 21 heterozigotos (*1/*3) e 35 homozigotos para o alelo variante (*3).

*** diferença significativa entre *1/*1 x *3/*3 ($p < 0,001$)
 • • diferença significativa entre *1/*3 x *3/*3 ($p < 0,01$)
 Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 12 - Relação entre a razão Co/dose do TAC e os genótipos do CYP3A5 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 12 homozigotos selvagens (*1), 33 heterozigotos (*1/*3) e 63 homozigotos para o alelo variante (*3).

*** diferença significativa entre *1/*1 x *3/*3 ($p < 0,001$)

• • • diferença significativa entre *1/*3 x *3/*3 ($p < 0,001$)

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 13 - Relação entre a razão Co/dose do TAC e os genótipos do CYP3A5 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 08 homozigotos selvagens (*1), 21 heterozigotos (*1/*3) e 35 homozigotos para o alelo variante (*3).

** diferença significativa entre *1/*1 x *3/*3 ($p < 0,01$)

• • • diferença significativa entre *1/*3 x *3/*3 ($p < 0,001$)

Os dados representam a mediana e os percentis.

4.3.2 ABCB1 na farmacocinética do TAC

Os mesmos parâmetros farmacocinéticos avaliados em relação ao CYP3A5 foram utilizados para avaliar influência dos genótipos da ABCB1 ao longo período de análise (Figuras 14 a 31). Conforme explicado anteriormente, os indivíduos 2677GA foram incluídos no grupo dos indivíduos heterozigotos 2677GT e os indivíduos 2677AT no grupo dos homozigotos variantes 2677TT.

Ao final do período de 12 meses, observou-se que apesar de não significativo, os indivíduos homozigotos selvagens para os três SNPs estudados apresentavam necessidade de doses maiores para alcançarem as mesmas concentrações plasmáticas dos indivíduos com genótipo variante (Figuras 16, 22 e 28). Quando avaliamos a razão entre concentração plasmática e dose ingerida (Co/dose), observamos que os indivíduos homozigotos para os alelos variantes apresentavam maiores valores do que indivíduos selvagens em todos os genótipos estudados individualmente (Figuras 18, 24 e 30). Nenhum dos polimorfismos estudados individualmente, contudo, estava significativamente associado com a concentração plasmática (Co) de tacrolimus, dose ingerida (dose/dia/kg) ou razão Co/dose ao final de 36 meses após o

transplante (Figuras 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31), embora possa se observar uma tendência de acompanhamento dos valores apresentados ao final de 12 meses. Possivelmente esses índices não apresentaram significantes em função da redução no número de indivíduos avaliados ao final de 36 meses (n=64).

Considerando que os genótipos da ABCB1 se encontram em forte desequilíbrio de ligação, conforme mostrado na figura 07, e que os genótipos variantes estão individualmente relacionados a uma maior razão Co/dose do TAC, analisamos a influência dos haplótipos mais frequentes, 2677G-3435C-1236C presente em 49% dos indivíduos e 2677T-3435T-1236T encontrado em 30% dos pacientes, sobre esse parâmetro e observamos que os indivíduos homozigotos variantes para os três alelos (T-T-T), de fato, apresentavam maiores valores tanto ao final de 12 quanto ao final de 36 meses (Figuras 32 e 33).

4.3.2.1 ABCB1 3435C>T

Figura 14 – Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 40 homozigotos selvagens (CC), 49 heterozigotos (CT) e 19 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 15 – Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 21 homozigotos selvagens (CC), 32 heterozigotos (CT) e 11 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 16 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 40 homozigotos selvagens (CC), 49 heterozigotos (CT) e 19 homozigotos para o alelo variante (TT). Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 17 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 3435C>T 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 21 homozigotos selvagens (CC), 32 heterozigotos (CT) e 11 homozigotos para o alelo variante (TT). Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 18 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os genótipos da ABCB1 3435C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 40 homozigotos selvagens (CC), 49 heterozigotos (CT) e 19 homozigotos para o alelo variante (TT).
* diferença significativa entre $*1/*1$ x $*3/*3$ ($p<0,05$)
• diferença significativa entre $*1/*3$ x $*3/*3$ ($p<0,05$)
Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 19 - Relação a razão Co/dose de TAC e os genótipos da ABCB1 3435C>T 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 21 homozigotos selvagens (CC), 32 heterozigotos (CT) e 11 homozigotos para o alelo variante (TT). Os dados representam a mediana e os percentis.

4.3.2.2 ABCB1 1236C>T

Figura 20 - Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 40 homozigotos selvagens (CC), 51 heterozigotos (CT) e 17 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 21 - Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 26 homozigotos selvagens (CC), 30 heterozigotos (CT) e 08 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 22 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 40 homozigotos selvagens (CC), 51 heterozigotos (CT) e 17 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 23 - Relação entre a dose diária de TAC corrigida em relação ao peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 1236C>T 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 26 homozigotos selvagens (CC), 30 heterozigotos (CT) e 08 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 24 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os genótipos 1236C>T 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 40 homozigotos selvagens (CC), 51 heterozigotos (CT) e 17 homozigotos para o alelo variante (TT).

* diferença significativa entre CC x TT ($p = 0,04$)

Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 25 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os genótipos 1236C>T 36 meses após Tx. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 26 homozigotos selvagens (CC), 30 heterozigotos (CT) e 08 homozigotos para o alelo variante (TT).

Os dados representam a mediana e os percentis.

4.3.2.3 ABCB1 2677G>T/A

Figura 26 - Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 48 homozigotos selvagens (GG), 44 heterozigotos (GT) e 16 homozigotos para o alelo variante (TT). Os indivíduos GA (n=03) e AT (n=02) foram incluídos nos grupos GT e TT, respectivamente. Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 27 - Relação entre a concentração plasmática de TAC (ng/mL) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 27 homozigotos selvagens (GG), 29 heterozigotos (GT) e 08 homozigotos para o alelo variante (TT). Os indivíduos GA (n=02) e AT (n=01) foram incluídos nos grupos GT e TT, respectivamente. Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 28 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 48 homozigotos selvagens (GG), 44 heterozigotos (GT) e 16 homozigotos para o alelo variante (TT). Os indivíduos GA (n=03) e AT (n=02) foram incluídos nos grupos GT e TT, respectivamente. Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 29 - Relação entre dose diária de TAC corrigida pelo peso do paciente (mg/dia/kg) e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 27 homozigotos selvagens (GG), 29 heterozigotos (GT) e 08 homozigotos para o alelo variante (TT). Os indivíduos GA (n=02) e AT (n=01) foram incluídos nos grupos GT e TT, respectivamente. Os dados representam a mediana e os percentis.

Figura 30 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 12 meses após Tx. Foram avaliados 108 pacientes, sendo 48 homozigotos selvagens (GG), 44 heterozigotos (GT) e 16 homozigotos para o alelo variante (TT). Os indivíduos GA (n=03) e AT (n=02) foram incluídos nos grupos GT e TT, respectivamente. * diferença significativa entre GG x TT ($p = 0,03$) Os dados representam a mediana e os percentis

Figura 31 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os genótipos da ABCB1 2677G>T/A 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo 27 homozigotos selvagens (GG), 29 heterozigotos (GT) e 08 homozigotos para o alelo variante (TT). Os indivíduos GA (n=02) e AT (n=01) foram incluídos nos grupos GT e TT, respectivamente. Os dados representam a mediana e os percentis

4.3.2.4 Haplótipos ABCB1

Figura 32 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os haplótipos da ABCB1 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 72 pacientes, sendo 30 homozigotos selvagens (2677G-3435C-1236C), 29 heterozigotos (GCC TTT) e 12 homozigotos para o alelo variante (TTT).

* diferença significativa entre GCC GCC x TTT TTT ($p = 0,02$)

Os dados representam a mediana e os percentis

Figura 33 - Relação entre a razão Co/dose de TAC e os haplótipos da ABCB1 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 32 pacientes, sendo 17 homozigotos selvagens (2677G-3435C-1236C), 19 heterozigotos (GCC TTT) e 06 homozigotos para o alelo variante (TTT).

* diferença significativa entre GCC GCC x TTT TTT ($p = 0,04$)

Os dados representam a mediana e os percentis

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS E DESFECHO CLÍNICO

A associação dos polimorfismos do CYP3A5 e ABCB1 no desfecho clínico do transplante foi avaliada através da avaliação dos seguintes parâmetros: análise da sobrevivência do enxerto (Figuras 34 e 35), avaliação do clearance de creatinina (Figuras 36 a 39) e análise da porcentagem de pacientes que desenvolveram lesões renais na forma de necrose tubular aguda (NTA) ou nefropatia crônica do enxerto (NFC) comprovadas por biópsias (Figuras 40 a 43).

Os indivíduos foram separados em dois grupos distintos para o CYP3A5, sendo um grupo formado pelos indivíduos que possuíam ao menos um alelo *1 (CYP3A5*1/*1 + CYP3A5*1/*3) e o outro pelos indivíduos ausentes desse alelo (CYP3A5*3/*3). Em relação ao gene ABCB1, utilizamos somente os haplótipos mais comuns e de maior interesse para a análise, sendo um grupo de indivíduos que portavam o haplótipo 2677G-3435C-1236C em ao menos uma das fitas e outro que portavam o haplótipo variante (TTT) para ambas as fitas.

Considerando que a constante monitorização clínica dos pacientes leva a mudança na terapia medicamentosa ao menor sinal de nefrotoxicidade relacionada ao uso de tacrolimus, utilizamos a taxa de abandono ou mudança na terapia com tacrolimus como uma medida do desenvolvimento de nefrotoxicidade nos diferentes grupos. Assim, avaliamos se os grupos submetidos a diferentes concentrações de tacrolimus ao longo do tempo tinham uma tendência a alterar o tratamento precocemente em função do desenvolvimento de nefrotoxicidade, porém também não encontramos diferenças entre os grupos estudados, conforme pode ser observado nas figuras 34 e 35. Quando consideramos o clearance de creatinina como uma medida da função renal, também não encontramos associação com os genótipos do CYP3A5 e os haplótipos da ABCB1 ao final de 12 ou 36 meses (Figuras 36 a 39).

Entre os 108 pacientes estudados, 66 realizaram biópsias renais para verificação da presença de sinais de lesão renal e/ou nefropatia do enxerto. Destes 66, somente 42 deles eram portadores dos haplótipos mais comuns (GCC ou TTT) da ABCB1. Não encontramos associações entre os genótipos estudados e o desenvolvimento de danos renais, como NTA (Figuras 40 a 41). No entanto, os pacientes homozigotos para o haplótipo variante da PGP apresentaram menores índices de desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto (Figuras 42 e 43).

4.4.1 Curva de sobrevivência do enxerto

Figura 34 – Curva de sobrevivência do enxerto avaliada pelo tempo (meses) até a necessidade de alteração no tratamento farmacológico com relação aos genótipos do CYP3A5. Wilcoxon test: $p = 0,875$

Figura 35 - Curva de sobrevivência do enxerto avaliada pelo tempo (meses) até a necessidade de alteração no tratamento farmacológico com relação aos haplótipos da ABCB1. Wilcoxon test: $p = 0,583$

4.4.2 Clearance de Creatinina

Figura 36 - Relação entre o clearance de creatinina (ml/minuto/1,73m²) e os genótipos do CYP3A5 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 108 pacientes, sendo que 45 eram portadores de menos um alelo *1 e 63 deles não eram portadores desse alelo.

Figura 37 - Relação entre o clearance de creatinina (ml/minuto/1,73m²) e os genótipos do CYP3A5 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 64 pacientes, sendo que 29 eram portadores de menos um alelo *1 e 35 deles não eram portadores desse alelo.

Figura 38 - Relação entre o clearance de creatinina (ml/minuto/1,73m²) e os haplótipos da ABCB1 12 meses após Tx renal. Foram avaliados 71 pacientes, sendo 59 portadores do haplótipo selvagem (2677G-435C-1236C) e 12 homozigotos para o haplótipo variante (TTT).

Figura 39 - Relação entre o clearance de creatinina (ml/minuto/1,73m²) e os haplótipos da ABCB1 36 meses após Tx renal. Foram avaliados 42 pacientes, sendo 36 portadores do haplótipo selvagem (2677G-3435C-1236C) e 06 homozigotos para o haplótipo variante (TTT).

4.4.3 Lesões Renais (NTA) e Nefropatia Crônica do Enxerto (NFC)

Figura 40 – Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de necrose tubular aguda (NTA) no período posterior a 03 meses da realização do transplante renal em relação ao genótipo do CYP3A5.

Os dados representam a média de 05 pacientes (04 portadores de menos um alelo *1 e 01 deles não portador desse alelo).

Figura 41 - Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de necrose tubular aguda (NTA) no período posterior a 03 meses da realização do transplante renal em relação aos haplótipos da PGP.

Os dados representam a média de 05 pacientes (04 portadores do haplótipo selvagem (2677G-3435C-1236C) e 01 homozigoto para o haplótipo variante (TTT)).

Figura 42 – Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de nefropatia crônica do enxerto (NFC) ao longo dos 36 meses de estudo após da realização do transplante renal em relação ao genótipo do CYP3A5.

Os dados representam a média de 14 pacientes (08 portadores de menos um alelo *1 e 06 não portadores desse alelo).

Figura 43 - Porcentagem das biópsias que apresentavam sinais de nefropatia crônica do enxerto (NFC) ao longo dos 36 meses de estudo após da realização do transplante renal em relação aos haplótipos da PGP.

Os dados representam a média de 08 pacientes, todos portadores do haplótipo selvagem (2677G-3435C-1236C) (*p = 0,003)

5 DISCUSSÃO

Um dos pontos críticos no uso clínico de tacrolimus é seu baixo índice terapêutico e ampla variabilidade farmacocinética intra e interindividual (VENKATARAMAN et al., 1995), tornando a manutenção do balanço razoável entre eficácia (evitar rejeição) e toxicidade (nefrotoxicidade) a principal preocupação após a realização de um transplante renal. O CYP3A5 é a principal enzima responsável pela biotransformação do tacrolimus que também é substrato da proteína de efluxo PGP, limitando sua absorção. Nos últimos anos tem se discutido muito o papel das enzimas metabolizadoras, especialmente do sistema do citocromo P450 e proteínas transportadoras, na fisiopatologia dos processos de nefrotoxicidade e da rejeição (HESSELINK; BOUAMAR; VAN GELDER, 2010).

Em nosso estudo encontramos resultados semelhantes a outros trabalhos mostrando haver uma evidente relação entre os genótipos do CYP3A5, razão Co/dose e dose de tacrolimus ao final de 12 e 36 meses após o transplante renal. Tal relação, embora menos evidente, foi também observada em relação à razão Co/dose do fármaco e com os genótipos e haplótipos do gene ABCB1 ao final de 12 meses após transplante. Contudo, não foi possível verificar uma relação entre os polimorfismos de ambos os genes e o desenvolvimento de lesões renais.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), 55,5% da população de 190.000.000 de brasileiros possuem entre 18 e 61 anos de idade, sendo que 55% se autodeclararam brancos; 37% mulatos; 6,5% negros; 0,4% indígenas; 0,5% orientais (amarelos) e 0,6% não se incluem em nenhuma etnia. Em nossa amostra de 108 pacientes transplantados renais da população de Ribeirão Preto e região, agrupamos os indivíduos em dois grupos étnicos classificados como brancos, representando 82% da população estudada, e não brancos, incluindo negros e mulatos representados por 18%. Em seguida separamos nossa população em grupos de acordo com o genótipo estudado e não observamos influências significativas dos genótipos sobre as características demográficas (idade, sexo e peso), características bioquímicas (colesterol total e frações, glicemia), sobre a pressão arterial e sobre alguns dados clínicos do transplante (tipo de doador, necessidade de terapia de indução, histórico de infecções, tempo de isquemia fria e tempo de diálise antes do transplante). Estudos mostram que algumas dessas variáveis, como a idade, gênero e tipo do doador, além da dose de corticóides podem exercer influência significativa sobre a farmacocinética do tacrolimus e também no desfecho do tratamento implicando em piora precoce da função renal ou perda do enxerto (FERRARIS et al., 2011; KIM et al., 2011; STRATTA et al., 2011; YOUNG et al., 2011). A distribuição semelhante destes fatores entre os grupos em nosso estudo minimiza os efeitos destes parâmetros sobre nossa análise.

Observamos uma diferença entre os grupos com relação à etnia para os genótipos do CYP3A5 e ABCB1 2677G>T/A. Inúmeros estudos mostram que frequência alélica desses polimorfismos varia amplamente entre os diferentes grupos étnicos (TUROLO et al., 2010; SCHEINER; DAMASCENO; MAIA, 2010; ESTRELA et al., 2008; SANTORO et al., 2011; SUAREZ-KURTZ et al., 2007). Todos esses estudos mostram que polimorfismo 6986A>G é incomum, pois frequência do alelo selvagem (A ou *1) para este SNP é menor do que a frequência do alelo variante (G ou *3). Suarez-Kurtz et al. (2007) observou em um estudo com 308 voluntários sadios que a porcentagem de indivíduos portadores do alelo *3 era de 63% na população geral, com predomínio do indivíduos brancos (78%) e era menor nos indivíduos negros (33%). Em um trabalho mais recente com a população brasileira receptora de transplante renal, Santoro et al. (2011) encontrou frequências muito semelhantes, com o alelo variante (*3) representando 73% da população estudada. Kuypers et al. (2010) estudando transplantados renais caucasianos encontrou frequências de 91% para alelo *3 e 01% para o alelo *1. Barrera-Pulido et al. (2008) também encontrou frequências genóticas de 90% para o homozigotos mutados (*3/*3), 10% de heterozigotos, não encontrando nenhum indivíduo homozigoto selvagem entre os 53 pacientes transplantados renais caucasianos. Por outro lado Ferreira et al. (2008) estudando a população tanzaniana mostrou que alelo G (*3) é o menos frequente (14,1%) nessa população. A comparação dos dados da literatura com os dados obtidos em nosso estudo mostra que, apesar de haver um predomínio da população branca em nossa amostra, encontramos valores semelhantes aos estudos realizados com a população brasileira e quando comparados a outras populações podemos perceber a mistura étnica que compõe a população brasileira.

Scheiner, Damasceno e Maia (2010) estudando os polimorfismos 3435C>T e 1236C>T do gene ABCB1 em adultos saudáveis da população brasileira não observou diferenças significativas entre as etnias e predomínio do alelo selvagem C (61% e 55%, respectivamente). Kuypers et al. (2010) encontrou frequências equilibradas na população caucasiana entre os alelos selvagens e mutados, tanto para o SNP 3435C>T (48% C vs. 52% T) quanto para o SNP tri-alélico 2677G>T/A (59% alelo G, 40% alelo T e 01% para o alelo A). Em outro estudo com 320 voluntários sadios, Estrela et al. (2008), observando os SNPs 1236C>T, 3435C>T e 2677G>A/T também não encontrou diferenças na distribuição dos alelos entre os grupos étnicos para o SNP 1236C>T, com predomínio do alelo selvagem (60%), mas observou um menor percentual de indivíduos não brancos portadores genótipo TT para o SNP 3435C>T (45% brancos vs. 31% negros), e ainda mais evidente para o genótipo 2677G>T/A (38% brancos vs. 18% negros). Nesse mesmo estudo, oito haplótipos foram

estudados, sendo o haplótipo 2677G-3435C-1236C o mais frequente deles, com aproximadamente 48% de ocorrência na população branca. Somado ao haplótipo homozigoto variante (TTT), esses haplótipos representam 84% da variabilidade genética destes polimorfismos. Nosso estudo encontrou 09 possíveis haplótipos, e de maneira semelhante à Estrela et al. (2008), Santoro et al. (2011) e outros autores (BANDUR et al., 2008; KIM et al., 2001, KIMCHI-SARFATY et al., 2007; TANABE et al., 2001; TANG et al., 2002), somente dois deles ocorreram em frequências elevadas. 2677G-3435C-1236C ocorreu em 49% dos pacientes e TTT em 30% dos casos, sugerindo um alto grau de desequilíbrio de ligação entre esses loci. A análise do desequilíbrio de ligação (D') revelou a existência de associação entre as variantes mais raras, além disso, uma vez que o gene do CYP3A5 também se localiza no cromossomo 07 em uma região próxima ao gene ABCB1, pudemos também observar a existência de desequilíbrio de ligação entre o CYP3A5 e o SNP 1236C>T. Esse é o primeiro estudo que mostra a existência de um desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do CYP3A5 e PGP e pode auxiliar na melhor compreensão de uma possível associação entre esses polimorfismos e os parâmetros farmacocinéticos do TAC.

Em rins humanos saudáveis, a PGP é expressa nas células epiteliais do túbulo contorcido proximal (CORDON-CARDO et al., 1989; FOJO et al., 1987; NAESENS et al., 2009; THIEBAUT et al., 1987), nos podócitos, células mesangiais, segmento espesso da alça de Henle e intracelularmente nos túbulos distais e na membrana apical do ducto coletor (ERNEST et al., 1997; KOZIOLEK et al., 2001). A expressão da PGP nas artérias e arteríolas renais e capilares glomerular e peritubular é muito baixa ou ausente (CORDON-CARDO et al., 1989; KOZIOLEK et al., 2001; NAESENS et al., 2009).

As primeiras evidências do papel desta proteína na nefrotoxicidade foram descritas por del Moral et al. (1995) mostrando que a exposição *in vitro* de células tubulares renais caninas a CsA levava a um aumento na expressão da PGP. O mesmo era observado quando células endoteliais e células do túbulo proximal de ratos eram incubadas com CsA ou TAC (HAUSER et al., 1998). *In vivo*, mostrou-se haver um aumento reversível na expressão de PGP nas células tubulares renais de ratos (DEL MORAL et al., 1997; JETTÉ et al., 1996). Koziolk et al. (2001), observaram que a expressão intrarenal de PGP era maior em rins transplantados renais que haviam sofrido de necrose tubular aguda (NTA), rejeição aguda ou nefropatia crônica do enxerto quando comparados a rins saudáveis ou rins transplantados livres de tratamento com inibidores de calcineurina. Por outro lado, conforme observado neste mesmo estudo e comprovado mais tarde por Joy et al. (2005), biópsias de rins transplantados de pacientes sofrendo de NFTx relacionada ao uso de CsA não apresentavam aumento da

expressão da PGP. Naesens et al. (2009), observou que a diminuição da expressão de PGP consistia em um fator de risco para o desenvolvimento de danos histológicos crônicos relacionados ao uso de tacrolimus. Essas observações sugerem que o tratamento com ICNs induz a expressão tanto *in vivo* quanto *in vitro* da PGP que pode proteger os rins dos efeitos nocivos dos ICNs através da expulsão dos mesmos do interior celular. Consequentemente, a expressão inadequada nas células renais pode levar a um acúmulo intrarenal dos ICNs e predispor os pacientes a nefrotoxicidade (HESSELINK; BOUAMAR; GELDER, 2010). Da mesma maneira, a significância clínica dos SNPs da PGP ainda se mantém controversa, com inúmeros estudos mostrando uma associação entre os SNPs e menor expressão intestinal ou diminuição da atividade *in vivo* e *in vitro* da PGP, que resultaria em um ineficiente transporte da droga para o exterior celular, aumentando sua absorção e, consequentemente, as concentrações plasmáticas e intracelulares. Outros estudos, no entanto, observaram uma associação oposta entre os SNPs e a expressão da proteína ou não encontraram associação alguma (STAATZ; GOODMAN; TETT, 2010).

Em uma revisão de 2010, Staatz, Goodman e Tett relataram que influência dos SNPs da ABCB1 3435C>T, 1236C>T e 2677G>T/A na farmacocinética do tacrolimus ainda é muito incerta, com a maioria dos estudos não conseguindo demonstrar uma associação e outros nos quais os indivíduos homozigotos variantes 1236TT, 3435TT e 2677TT apresentaram maior razão Co/dose do que os indivíduos homozigotos selvagens para esses alelos individualmente. Observou-se também que influência dos haplótipos pode ser maior do que a de polimorfismos individuais, com estudos demonstrando que os haplótipos homozigotos variantes (TTT) apresentam maior razão Co/dose e menores doses (ANGLICHEAU et al., 2003; FREDERICKS et al., 2006). No entanto, na maioria dos estudos em diferentes populações, ainda não foi possível estabelecer uma relação clara entre os polimorfismos da PGP e alterações nos parâmetros farmacocinéticos (BANDUR et al., 2008; OP DEN BUIJSCH et al., 2007; GERVASINI et al. 2012; JUN et al., 2009; KUYPERS et al., 2007; PROVENZANI et al., 2009; SANTORO et al., 2011).

Diferentemente do reportado na maioria dos trabalhos analisados, observamos que os pacientes homozigotos para os genótipos variantes do gene ABCB1 apresentavam maior razão Co/dose do fármaco ao final de 12 meses do estudo, enquanto que ao fim de 36 meses essa relação, apesar de manter a tendência, não se mostrou significativa. No entanto, ao estudarmos os haplótipos observamos que esse aumento da razão Co/dose em pacientes portadores do haplótipo variante estava presente tanto ao final de 12 quanto 36 meses após o transplante. Esses dados mostram que, de fato, o efeito aditivo do haplótipos pode ser maior

que o efeito dos SNPs analisados individualmente e que a não observação desse efeito nos SNPs individuais pode ter sido em função na redução no número de indivíduos estudados.

Os dados de associação entre a farmacocinética e os genótipos da PGP auxiliam na hipótese de que os genótipos variantes podem ter expressão diminuída da proteína, e consequente, maior absorção da droga observada através das maiores razões Co/dose. Alguns autores, no entanto, sugeriram que essas diferenças podem ser devido ao efeito das variantes do CYP3A5 e alguns deles observaram que o impacto dos SNPs do gene ABCB1 na farmacocinética do TAC não mais era evidenciado após a eliminação da influência deste gene (CHEUNG et al., 2006; FREDERICKS et al., 2006; LOH et al., 2008). Conforme discutido anteriormente, os polimorfismos da PGP encontram-se em forte desequilíbrio de ligação e um deles (1236C>T) está em desequilíbrio com o CYP3A5, dessa forma não podemos descartar a hipótese de que a influência dos polimorfismos PGP sobre a farmacocinética do TAC seja, na verdade, um efeito dos polimorfismo do CYP3A5.

A influência do CYP3A5 na farmacocinética do TAC, por sua vez, parece estar muito bem estabelecida. O SNP 6986A>G é associado à produção de proteínas instáveis e não funcionais do CYP3A5, assim indivíduos portando pelo menos um alelo CYP3A5*1 expressam altos níveis desta enzima e, portanto apresentam uma maior metabolização dos fármacos substratos dessa proteína, que pode resultar em menor biodisponibilidade e necessidade de maiores doses.

Macphee et al. (2004) mostrou haver uma relação entre a concentração plasmática de TAC (Co) e os polimorfismos do CYP3A5. Pacientes que expressam essa proteína (*1) levam mais tempo para atingir as concentrações requeridas. Além desse, inúmeros outros trabalhos mostraram relação semelhante (HESSELINK et al., 2008; KIM et al., 2011; ROY et al., 2006; ZHANG et al., 2005). Os pacientes analisados retrospectivamente em nosso estudo eram sujeitos a monitorização terapêutica de rotina e assim as variações nas concentrações plasmáticas do TAC eram prontamente corrigidas. Por essa razão, não foi possível estabelecer uma associação entre a concentração plasmática do TAC e os polimorfismos estudados.

Em uma revisão de 2008, realizada Hesselink, Bouamar e van Gelder, e outra de 2010 por Staatz, Goodman e Tett, estudos mostram que indivíduos portadores de ao menos um alelo selvagem (*1) e, portanto, que expressam o CYP3A5, apresentam menor razão Co/dose e necessidade de doses maiores para atingir a concentração plasmática esperada (Co). Estes estudos mostraram que os indivíduos que não expressam o CYP3A5 (*3/*3) necessitam de metade da dose necessária aos indivíduos *1 e a apresentam metade da razão Co/dose. Essa relação é consistente com o fato de indivíduos que expressam o CYP3A5 possuem uma maior

capacidade metabólica. Nosso estudo comprova esses dados, evidenciando claramente, que os indivíduos homozigotos para o alelo variante (*3) necessitam de doses menores, em torno de 50%, para atingir a mesma concentração plasmática e demonstram ter maior razão Co/dose de TAC que os indivíduos selvagens ao longo dos três anos estudados. Estudos mais recentes encontraram resultados muito parecidos (GERVASINI et al., 2012; GLOWACKI et al., 2011; LI et al., 2011). No primeiro estudo deste tipo realizado na população brasileira, Santoro et al. (2011) analisou durante três meses após o transplante renal 200 pacientes que receberam TAC ou CsA como terapia imunossupressora, e também observou que a dose diária de TAC e a razão Co/dose estavam significativamente associadas ao número de alelos variantes para o CYP3A5. Todos estes estudos reforçam a hipótese de o CYP3A5 ser o principal responsável pela alta variabilidade intra e interindividual do tacrolimus.

A nefrotoxicidade (NFTx) é um bem estabelecido efeito adverso e maior problema clínico do uso de inibidores de calcineurina (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009) e pode ser revertida através da diminuição da dose do fármaco, e em casos mais graves, descontinuação do tratamento. No entanto, a diminuição da dose está associada com aumento no risco de desenvolvimento de RA, que por sua vez, está associada a um aumento no risco de desenvolvimento de danos renais crônicos ou perda do enxerto (DE FIJTER, 2010; HARADA et al., 2009; LASKOW et al., 1996; MAHALATI et al., 1999; STAATZ; TAYLOR; TEET, 2001). A identificação dos pacientes com maior risco antes da realização do transplante nos fornece uma oportunidade de selecionar os pacientes que melhor se beneficiariam do uso em doses baixas dos ICNs, ou necessitariam de monitorização pós-transplante mais cuidadosa.

A patogênese da NFTx relacionada ao uso de ICNs, contudo, é complexa. Alguns autores sugerem que a concentração do fármaco no tecido renal é um fator mais preditivo do dano renal do que os níveis sistêmicos, uma vez que a concentração de TAC nas células renais não se correlaciona diretamente com a concentração plasmática (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009). Parte disso deve-se as enzimas metabolizadoras e transportadores expressos nas células renais, e como é bem estabelecido que o CYP3A5 é a isoforma predominante no tecido renal (HAEHNER et al., 1996), acredita-se que essa isoforma possa proteger o rim dos efeitos tóxicos dos ICNs através da metabolização do fármaco, prevenindo o acúmulo local. Outros autores, contudo, sugerem que a produção local de metabólitos tóxicos possa contribuir para o desenvolvimento de NFTx (KUYPERS et al., 2010). Os polimorfismos genéticos no ABCB1 e CYP3A5 podem levar a diferenças na expressão destas proteínas que, por sua vez, promove variabilidade na concentração intracelular do TAC e seus

metabólitos. No entanto, a influência destes polimorfismos na farmacodinâmica dos ICNs ainda é controversa.

Em uma recente revisão Staatz, Goodman e Tett (2010) relataram que apesar da forte relação entre a farmacocinética do TAC e o SNP do CYP3A5 (6986A>G), ainda não existem evidências consistentes do desenvolvimento de rejeição aguda como resultado de uma imunossupressão ineficiente relacionada ao genótipo. Entre os estudos avaliados nesta revisão, três estudos, dois em transplantados renais e um em transplante de pulmão, não encontraram relação entre o genótipo do CYP3A5 e desenvolvimento de RA comprovada por biópsia (HESSELINK et al., 2008; ROY et al., 2006; ZHENG et al., 2005). Em contraste, um estudo mostrou uma menor incidência de RA (FERRARESSO et al., 2007) e um maior tempo até o desenvolvimento do primeiro episódio nos pacientes homozigotos *3 (MACPHEE et al., 2004). Os resultados relativos à nefrotoxicidade também se mostram conflitantes. Cinco estudos revisados, sendo um deles em transplante cardíaco, não encontraram associação entre o SNP 6986A>G e a função renal dos pacientes quando os parâmetros avaliados foram os níveis de creatinina ou clearance (FERRARESSO et al., 2007; HESSELINK et al., 2008; KLAUKE et al., 2008; RENDERS et al., 2007; ROY et al., 2006). Em um estudo com pacientes japoneses que receberam transplante de fígado, 17% dos pacientes que desenvolveram NFTx eram portadores do alelo *1 enquanto 47% dos homozigotos *3 apresentaram nefrotoxicidade (FUKUDO et al., 2008).

A PGP, conforme já dito anteriormente, é uma proteína transmembrana com especificidade por inúmeras drogas, incluindo o TAC, que atua como uma bomba de efluxo impedindo a entrada dos substratos do interior celular. Acredita-se que a baixa expressão ou função desta proteína pode levar a acúmulo intracelular do TAC e, conseqüente, toxicidade (ANGLICHEAU et al., 2006). Acredita-se também que a expressão da PGP na superfície dos linfócitos pode ser importante na regulação do acesso dos inibidores de calcineurina ao seu sítio de ação (KOCK et al., 2007), sugerindo que um alto grau de expressão ou atividade desta proteína pode levar a episódios de rejeição em pacientes transplantados.

Poucos estudos avaliando a influência dos genótipos da ABCB1 com relação aos SNPs 3435C>T, 2677G>T/A, 1236C>T conseguiram encontrar uma associação com o desfecho clínico do transplante em pacientes submetidos ao uso de tacrolimus. A mesma revisão de Staatz, Goodman e Tett (2010) relatou que um estudo feito com 136 transplantados renais durante 01 ano (HESSELINK et al., 2008), outro com 206 também transplantados renais na fase estável após o transplante (FREDERICKS et al., 2006) e outro com 95 caucasianos transplantados renais estudados durante 5 anos (KUYPERS et al., 2007) não encontraram

associação entre os três polimorfismos da ABCB1 e a incidência de RA e NFTx comprovada por biópsia. Um estudo conduzido com 117 pacientes com transplante de pulmão, no entanto, reportou uma maior incidência de rejeição em indivíduos com genótipo 3435CC (ZHENG et al., 2005), reforçando a hipótese de maior absorção da droga pelo intestino e maior concentração sistêmica e no interior dos linfócitos devido a menor funcionalidade dos alelos variantes da PGP. Outro estudo conduzido em portadores de transplante hepático, avaliando creatinina sérica mostrou que a ocorrência de disfunção renal foi muito menos freqüente em pacientes homozigotos 2677GG (HEBERT et al., 2003).

Conforme relatado anteriormente, o diagnóstico diferencial entre a nefrotoxicidade relacionada à tacrolimus e lesões renais de outra natureza é muito difícil. Várias situações de dano renal por mecanismos distintos possuem o mesmo quadro clínico de diminuição da função do rim transplantado e desenvolvimento de lesões que podem levar a perda do rim transplantado (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009) e, lesões consideradas mais específicas da nefrotoxicidade renal, como a vacuolização tubular e hialinização arteriolar podem ser causas secundárias a outros processos. Em virtude da difícil precisão no diagnóstico da nefrotoxicidade e, considerando que a constante monitorização clínica dos pacientes leva a mudança na terapia medicamentosa ao menor sinal de suspeita de NFTx relacionada ao uso de tacrolimus, a taxa de abandono ou mudança na terapia com tacrolimus foi um indicador do desenvolvimento de nefrotoxicidade nos diferentes grupos.

Esperava-se que os pacientes que fossem mais susceptíveis a NFTx tivessem uma alteração no tratamento mais precoce em relação aos demais pacientes, contudo, não foi observada uma associação significativa entre os genótipos do CYP3A5 e da PGP ao longo dos três anos avaliados, embora pudéssemos observar que pacientes TTT possuem uma tendência maior em terem o tratamento alterado e esta alteração acontecer mais tardiamente. É importante notar que estes dados não incluem o primeiro de ano após o transplante, mas podemos sugerir que em longo prazo, a expressão da PGP, talvez, seja um fator protetor contra lesões renais.

O clearance de creatinina como indicador de alteração da função renal, também não se mostrou diferente entre os genótipos. Nós hipotetizamos que o grupo mutado estaria exposto a uma maior probabilidade de deterioração do enxerto, pois, teoricamente, estaria exposto a uma maior concentração plasmática do TAC. Nosso estudo foi desenhado para detectar alterações de ao menos 30% da função renal ao final de 24 meses de seguimento. Nossos dados permitem atestar com poder de 80% que não há associação entre os SNPs estudados e maior dano em longo prazo (ou pior evolução do enxerto).

Idealmente, o diagnóstico preciso de nefrotoxicidade mediada por inibidores da calcineurina deveria levar em consideração a combinação de várias características histológicas associadas ao uso de ICNs e a exclusão de outros processos que poderiam levar a danos histológicos similares. Em virtude da dificuldade de acesso aos dados em tal detalhamento e dificuldade na precisão do diagnóstico das biópsias que em geral são classificadas de acordo com a lesão que tecido renal apresenta e não em forma de um diagnóstico conclusivo de nefrotoxicidade, optamos por avaliar a associação dos genótipos com o diagnóstico de necrose tubular aguda (NTA), que se trata de uma condição na qual as células epiteliais dos túbulos renais são destruídas através de mecanismos isquêmicos ou tóxicos, e se constitui em uma das causas que leva a insuficiência renal aguda (GUYTON; HALL, 1996). No entanto, para minimizar a influência do componente isquêmico neste estudo, optou-se por utilizar somente os diagnósticos obtidos passados três meses do transplante renal. O número muito reduzido de pacientes com esse diagnóstico (somente cinco dos 108 pacientes) dificultou a análise, diminuindo o poder do teste, contudo observa-se uma tendência de indivíduos variantes para o CYP3A5 e para o haplótipo da PGP apresentarem maior incidência de lesão renal na forma de necrose tubular aguda. Estudos considerando o genótipo do doador mostram que a expressão anormal destas proteínas pode levar ao acúmulo intracelular do TAC e, conseqüente aumento na incidência de lesões renais. Assim, para confirmação desta hipótese seria necessário que obtivéssemos, também, o genótipo do doador.

A maioria dos pacientes transplantados deste estudo recebeu terapia de indução com anticorpo monoclonal (60%) o que contribui em grande parte com a baixa incidência de rejeição aguda. Somente dois dos 108 pacientes foram histologicamente diagnosticados com RA, não sendo possível avaliar a influência dos genótipos sobre esse parâmetro. No entanto, pudemos verificar um número maior de pacientes que foram classificados de acordo com BANFF com nefropatia crônica do enxerto e observou-se que os indivíduos homozigotos variantes para o haplótipo da PGP tiveram uma menor tendência em desenvolver tal condição. Essa observação vai de encontro a outros estudos que mostram uma maior incidência de perda do enxerto em pacientes com haplótipo selvagem (ZHENG et al., 2005) e contribui com a hipótese de que pacientes com menor expressão da PGP teriam maior acesso do TAC ao interior dos linfócitos, que poderia contribuir para melhor ação do fármaco e menor incidência de perda do enxerto (KOCK et al., 2007), sugerindo que embora os polimorfismo não estejam significativamente associados com aumento na toxicidade, eles podem implicar em alterações na eficácia do fármaco.

Algumas limitações de nosso estudo devem ser consideradas. Em primeiro lugar, o desenho do estudo e cálculo do tamanho da população foi baseado na função renal, o que limita a análise estatística do desfecho em relação a lesões renais e rejeição. Em segundo lugar, não investigamos o genótipo do doador que pode ser mais relevante do que o genótipo do receptor em casos de nefrotoxicidade associada ao uso de ICNs, especialmente com relação ao CYP3A5 (HESSELINK et al., 2008). Assim como em outros estudos, encontramos dificuldade em obter um diagnóstico clínico e histológico adequado de nefrotoxicidade e lesões renais, parte pela complexidade em obter marcadores histológicos ou clínicos apropriados, e parte por se tratar de um estudo observacional no qual as biópsias foram obtidas somente no período pós-transplante e a critério médico.

O fato de se tratar de um estudo observacional implica que algumas associações encontradas nesse estudo necessitam de confirmação através de outros estudos prospectivos. Thervet et al. (2010) realizou um ensaio clínico controlado com 280 receptores de transplante renal provenientes de doadores cadáveres para comparar a eficácia entre utilizar a dose do TAC baseado no genótipo dos indivíduos para o CYP3A5 e utilizar o procedimento padrão de dose baseada no peso. Os pacientes, randomizados, receberam além da terapia de indução, micofenolato de mofetila e iniciaram o tratamento com tacrolimus no sétimo dia após o transplante. Três dias após o início do tratamento, um maior número de pacientes cuja dose de TAC foi baseada no genótipo estava dentro da janela terapêutica alvo (43% vs. 29%). Além disso, esses pacientes alcançaram as concentrações alvo mais precocemente, o que motivou uma menor alteração do tratamento imunossupressor. Contudo, quando a variável analisada era o desfecho, em forma de rejeição aguda e restabelecimento tardio da função renal, não foram encontradas diferenças entre os grupos. Esse estudo, no entanto, foi realizado com pacientes com baixo risco imunológico para rejeição, já que fizeram uso de terapia de indução, e o tratamento com TAC não foi iniciado logo ao primeiro dia, o que pode reduzir a probabilidade de retardo no restabelecimento função renal. Em outro estudo clínico multicêntrico com 508 receptores de transplante renal, avaliou-se a melhora na taxa de filtração glomerular e incidência de rejeição aguda em pacientes que tiveram uma retirada precoce dos inibidores da calcineurina. Ambos os grupos receberam CsA durante os primeiros quatro meses e meio pós-transplante e, após isso um dos grupos continuou a fazer do inibidor de calcineurina (CsA) e o outro grupo passou a usar um inibidor da mTor (Everolimus). Ao final de 12 meses, observou-se que os pacientes em uso de everolimus tiveram melhora na taxa de filtração glomerular e ambos os grupos tiveram semelhantes taxas de eficácia avaliada

para incidência de rejeição aguda, embora o grupo no grupo livre de ICNs a incidência tenha sido pouco maior após a conversão (BUDDE et al., 2011).

Os dados dos estudos retrospectivos aliado a esses estudos clínicos nos fornecem evidências da aplicabilidade da incorporação de testes genéticos na personalização dos tratamentos farmacológicos, no entanto, estudos multicêntricos maiores necessitam ser desenvolvidos antes que possamos tornar essa prática uma aplicação clínica efetiva.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nosso estudo confirmam o efeito dos polimorfismos do CYP3A5 e sugerem um efeito dos polimorfismos da PGP na farmacocinética do tacrolimus, especialmente na razão Co/dose. Por outro lado, não foi possível estabelecer nenhuma associação clinicamente relevante entre os polimorfismos de ambas as proteínas e os desfechos clínicos relevantes do transplante renal.

Esses achados, aliados a outras evidências encontradas em outros estudos clínicos prospectivos e retrospectivos sugerem que a genotipagem para o CYP3A5 ou ABCB1 ainda não deva ser incorporada como uma ferramenta clínica para o manejo do transplante renal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (RTBO). Registro Brasileiro de Transplantes: veículo oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. São Paulo, v. 17, n. 4, p. 1-35, jan./dez. 2011.

AMBUDKAR, S. V. et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, Hampshire, v. 22, n. 47, p. 7468-7485, Oct. 2003.

ANGLICHEAU, D. et al. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. **Kidney Int**, New York, v. 70, n. 6, p. 1019-1025, Sep. 2006.

_____. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. **J Am Soc Nephrol**, Washington DC, v. 14, n. 7, p. 1889-1896, July 2003.

AOYAMA, T. et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 264, n. 18, p. 10388-10395, June 1989.

BANDUR, S. et al. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. **Transplantation**, Baltimore, v. 86, n. 9, p. 1206-1213, Nov. 2008.

BARRERA-PULIDO, L. et al. Clinical relevance and prevalence of polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 genes that encode tacrolimus biotransformation enzymes in liver transplant recipients. **Transplant Proc**, New York, v. 40, n. 9, p. 2949-2951, Nov. 2008.

BUDDE, K. et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. **Lancet**, London, v. 377, n. 9768, p. 837-847, Mar. 2011.

CASCORBI, I. et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 69, n. 3, p. 169-174, Mar. 2001.

CHEN, J. S. et al. Effect of CYP3A5 genotype on renal allograft recipients treated with tacrolimus. **Transplant Proc**, New York, v. 41, n. 5, p. 1557-1561, June 2009.

CHEUNG, C. Y. et al. Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients. **Pharmacogenomics**, London, v. 7, n. 4, p. 563-574, June 2006.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023

CHOI, J. H. et al. Influence of the CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Korean subjects. **Br J Clin Pharmacol**, Oxford, v. 64, n. 2, p. 185-191, Aug. 2007.

CORDON-CARDO, C. et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, DC, v. 86, n. 2, p. 695-698, Jan. 1989.

DE FIJTER, J. W. Rejection and function and chronic allograft dysfunction. **Kidney Int Suppl**, New York, n. 119, p. S38-S41, Dec. 2010.

DE JONGE, H.; KUYPERS, D. R. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. **Transplant Rev (Orlando)**, Orlando, v. 22, n. 1, p. 6-20, Jan. 2008.

DE JONGE, H.; NAESENS, M.; KUYPERS, D. R. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation. **Ther Drug Monit**, New York, v. 31, n. 4, p. 416-435, Aug. 2009.

DE WILDT, S. N. et al. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v. 37, n. 6, p. 485-505, Dec. 1999.

DEL MORAL, G. R. et al. Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistological and cell culture study. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 146, n. 2, p. 398-408, Feb. 1995.

DEL MORAL, R. G. et al. Chronic cyclosporin A nephrotoxicity, P-glycoprotein overexpression, and relationships with intrarenal angiotensin II deposits. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 151, n. 6, p. 1705-1714, Dec. 1997.

ERNEST, S. et al. Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney. **Nephron**, Basel, v. 77, n. 3, p. 284-289, 1997.

ESTRELA, R. C. et al. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. **Pharmacogenomics**, London, v. 9, n. 3, p. 267-276, Mar. 2008.

EVANS, W. E.; MCLEOD, H. L. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. **N Engl J Med**, Boston, v. 348, n. 6, p. 538-549, Feb. 2003.

FERRARESSO, M. et al. Influence of the CYP3A5 genotype on tacrolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in young kidney transplant recipients. **Pediatr Transplant**, Copenhagen, v. 11, n. 3, p. 296-300, May 2007.

FERRARIS, J. R. et al. Influence of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus maintenance doses and serum levels after renal transplantation: age dependency and pharmacological interaction with steroids. **Pediatr Transplant**, Copenhagen, v. 15, n. 5, p. 525-532, Aug. 2011.

FERREIRA, P. E. et al. Polymorphism of antimalaria drug metabolizing, nuclear receptor, and drug transport genes among malaria patients in Zanzibar, East Africa. **Ther Drug Monit**, New York, v. 30, n. 1, p. 10-15, Feb. 2008.

FOJO, A. T. et al. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. **J Clin Oncol**, Alexandria, v. 5, n. 12, p. 1922-1927, Dec. 1987.

FREDERICKS, S. et al. Multi-drug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes and the CYP3A5*1 genotype have no influence on ciclosporin dose requirements as assessed by C0 or C2 measurements. **Clin Transplant**, Copenhagen, v. 21, n. 2, p. 252-257, Mar./Apr. 2007.

_____. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. **Transplantation**, Baltimore, v. 82, n. 5, p. 705-708, Sep. 2006.

FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. **Trends Pharmacol Sci**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 423-429, Aug. 2004.

FUKUDO, M. et al. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. **Pharmacogenet Genomics**, Hagerstown, v. 18, n. 5, p. 413-423, May 2008.

GARCIA, S. C. et al. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 6, p. 393-401, Dec. 2004.

GERVASINI, G. et al. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. **Transpl Int**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 471-480, Apr. 2012.

_____. Differences in CYP3A5*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. **Ther Drug Monit**, New York, v. 27, n. 6, p. 819-821, Dec. 2005.

GLOWACKI, F. et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. **Nephrol Dial Transplant**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 3046-3050, Sep. 2011.

GRINYO, J. et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. **Transpl Int**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 879-891, Sep. 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAEHNER, B. D. et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. **Mol Pharmacol**, Bethesda, v. 50, n. 1, p. 52-59, July 1996.

HARADA, K. M. et al. Risk factors associated with graft loss and patient survival after kidney transplantation. **Transplant Proc**, New York, v. 41, n. 9, p. 3667-3670, Nov. 2009.

HAUFROID, V. et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. **Pharmacogenetics**, London, v. 14, n. 3, p. 147-154, Mar. 2004.

_____. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. **Am J Transplant**, Hoboken, v. 6, n. 11, p. 2706-2713, Nov. 2006.

HAUSER, I. A. et al. Therapeutic concentrations of cyclosporine A, but not FK506, increase P-glycoprotein expression in endothelial and renal tubule cells. **Kidney Int**, New York, v. 54, n. 4, p. 1139-1149, Oct. 1998.

_____. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. **J Am Soc Nephrol**, Washington DC, v. 16, n. 5, p. 1501-1511, May 2005.

HEBERT, M. F. et al. Association between ABCB1 (multidrug resistance transporter) genotype and post-liver transplantation renal dysfunction in patients receiving calcineurin inhibitors. **Pharmacogenetics**, London, v. 13, n. 11, p. 661-674, Nov. 2003.

HESSELINK, D. A.; BOUAMAR, R.; VAN GELDER, T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. **Ther Drug Monit**, New York, v. 32, n. 4, p. 387-393, Aug. 2010.

HESSELINK, D. A. et al. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. **Pharmacogenet Genomics**, Hagerstown, v. 18, n. 4, p. 339-348, Apr. 2008.

_____. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 74, n. 3, p. 245-254, Sep. 2003.

HILLI, J. et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450s and P-glycoprotein in the Finnish population. **Fundam Clin Pharmacol**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 379-386, Aug. 2007.

HU, Y. F. et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1093-1098, Nov. 2006.

HUANG, W. et al. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. **Drug Metab Dispos**, Bethesda, v. 32, n. 12, p. 1434-1445, Dec. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

IEIRI, I.; TAKANE, H.; OTSUBO, K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v. 43, n. 9, p. 553-576, 2004.

IWASAKI, K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. **Drug Metab Pharmacokinet**, Tokyo, v. 22, n. 5, p. 328-335, Oct. 2007.

IWASAKI, K. et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. **Drug Metab Dispos**, Bethesda, v. 23, n. 1, p. 28-34, Jan. 1995.

JETTE, L. et al. Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 270, n. 5 Pt 2, p. F756-F765, May 1996.

JOY, M. S. et al. Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. **Pharmacotherapy**, Boston, v. 25, n. 6, p. 779-789, June 2005.

_____. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. **Nephrol Dial Transplant**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 1963-8, Mar. 2007.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 455, n. 1, p. 152-162, Nov. 1976.

JUN, K. R. et al. Tacrolimus concentrations in relation to CYP3A and ABCB1 polymorphisms among solid organ transplant recipients in Korea. **Transplantation**, Baltimore, v. 87, n. 8, p. 1225-1231, Apr. 2009.

KARANAM, B. V. et al. FK 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. **Drug Metab Dispos**, Bethesda, v. 22, n. 5, p. 811-814, Sep./Oct. 1994.

KIM, I. W. et al. Clinical and genetic factors affecting tacrolimus trough levels and drug-related outcomes in Korean kidney transplant recipients. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v. 68, n. 5, p. 657-669, Dec. 2011.

KIM, R. B. et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 70, n. 2, p. 189-199, Aug. 2001.

KIMCHI-SARFATY, C. et al. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. **Pharmacogenomics**, London, v. 8, n. 1, p. 29-39, Jan. 2007.

KLAUKE, B. et al. No association between single nucleotide polymorphisms and the development of nephrotoxicity after orthotopic heart transplantation. **J Heart Lung Transplant**, Philadelphia, v. 27, n. 7, p. 741-745, July 2008.

KLIMECKI, W. T. et al. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. **Blood**, Washington DC, v. 83, n. 9, p. 2451-2458, May 1994.

KOCK, K. et al. Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v. 46, n. 6, p. 449-470, 2007.

KOZIOLEK, M. J. et al. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in kidney allografts from cyclosporine A-treated patients. **Kidney Int**, New York, v. 60, n. 1, p. 156-166, July 2001.

KREUTZ, R. et al. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. **Pharmacogenetics**, London, v. 14, n. 10, p. 665-671, Oct. 2004.

KRONBACH, T.; FISCHER, V.; MEYER, U. A. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 43, n. 6, p. 630-635, June 1988.

KUEHL, P. et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. **Nat Genet**, New York, v. 27, n. 4, p. 383-391, Apr. 2001.

KUYPERS, D. R. et al. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 82, n. 6, p. 711-725, Dec. 2007.

_____. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. **Ther Drug Monit**, New York, v. 32, n. 4, p. 394-404, Aug. 2010.

LASKOW, D. A. et al. An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. **Transplantation**, Baltimore, v. 62, n. 7, p. 900-905, Oct. 1996.

LI, L. et al. Tacrolimus dosing in Chinese renal transplant recipients: a population-based pharmacogenetics study. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v. 67, n. 8, p. 787-795, Aug. 2011.

LIN, Y. S. et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. **Mol Pharmacol**, Bethesda, v. 62, n. 1, p. 162-172, July 2002.

LINDEN, P. K. History of solid organ transplantation and organ donation. **Crit Care Clin**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 165-184, ix, Jan. 2009.

LOH, P. T. et al. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. **Transplant Proc**, New York, v. 40, n. 5, p. 1690-1695, June 2008.

MACPHEE, I. A. et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. **Transplantation**, Baltimore, v. 74, n. 11, p. 1486-1489, Dec. 2002.

_____. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. **Am J Transplant**, Hoboken, v. 4, n. 6, p. 914-919, June 2004.

MAHALATI, K. et al. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 55-62, July 1999.

MAI, I. et al. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. **Br J Clin Pharmacol**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 548-553, Nov. 2004.

MARRONI, A. S. et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. **Nitric Oxide**, Milwaukee, v. 12, n. 3, p. 177-182, May 2005.

MARZOLINI, C. et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 75, n. 1, p. 13-33, Jan. 2004.

METALIDIS, C. et al. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. **Transplantation**, Baltimore, v. 91, n. 10, p. 1098-1102, May 2011.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb. 1988.

MOURAD, M. et al. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v. 44, n. 10, p. 1192-1198, 2006.

MURRAY, G. I. et al. Cytochrome P450 CYP3A in human renal cell cancer. **Br J Cancer**, London, v. 79, n. 11-12, p. 1836-1842, Apr. 1999.

MYERS, B. D. et al. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. **N Engl J Med**, Boston, v. 311, n. 11, p. 699-705, Sep. 1984.

NAESENS, M.; KUYPERS, D. R.; SARWAL, M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. **Clin J Am Soc Nephrol**, Washington DC, v. 4, n. 2, p. 481-508, Feb. 2009.

NAESENS, M. et al. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. **J Am Soc Nephrol**, Washington DC, v. 20, n. 11, p. 2468-2480, Nov. 2009.

NANKIVELL, B. J.; KUYPERS, D. R. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. **Lancet**, London, v. 378, n. 9800, p. 1428-1437, Oct. 2011.

OP DEN BUIJSCH, R. A. et al. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. **Fundam Clin Pharmacol**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 427-435, Aug. 2007.

PROVENZANI, A. et al. The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients. **Ann Transplant**, Warsaw, v. 14, n. 1, p. 23-31, Jan./Mar. 2009.

QUTEINEH, L. et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Copenhagen, v. 103, n. 6, p. 546-552, Dec. 2008.

RANDOLPH, G. J. et al. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, DC, v. 95, n. 12, p. 6924-6929, June 1998.

RENDERS, L. et al. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. **Clin Pharmacol Ther**, New York, v. 81, n. 2, p. 228-234, Feb. 2007.

ROWSHANI, A. T. et al. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. **J Am Soc Nephrol**, Washington DC, v. 17, n. 1, p. 305-312, Jan. 2006.

ROY, J. N. et al. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. **Pharmacogenet Genomics**, Hagerstown, v. 16, n. 9, p. 659-665, Sep. 2006.

SAEKI, T. et al. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 268, n. 9, p. 6077-6080, Mar. 1993.

SAKAEDA, T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? **Drug Metab Pharmacokinet**, Tokyo, v. 20, n. 6, p. 391-414, Dec. 2005.

SANTORO, A. et al. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in Brazilian renal transplant patients. **Pharmacogenomics**, London, v. 12, n. 9, p. 1293-1303, Sep. 2011.

SCHEINER, M. A.; DAMASCENO, A. M.; MAIA, R. C. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. **Mol Biol Rep**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 111-118, Jan. 2010.

SCOTT, L. J. et al. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. **Drugs**, Auckland, v. 63, n. 12, p. 1247-1297, 2003.

SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics**, London, v. 9, n. 1, p. 105-127, Jan. 2008.

SISSUNG, T. M. et al. Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. **Mol Biotechnol**, Totowa, v. 44, n. 2, p. 152-167, Feb. 2010.

SOLEZ, K. et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. **Am J Transplant**, Hoboken, v. 8, n. 4, p. 753-760, Apr. 2008.

STAATZ, C.; TAYLOR, P.; TETT, S. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. **Nephrol Dial Transplant**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1905-1909, Sep. 2001.

STAATZ, C. E.; GOODMAN, L. K.; TETT, S. E. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v. 49, n. 3, p. 141-175, Mar. 2010.

STRATTA, P. et al. The interactions of age, sex, body mass index, genetics, and steroid weight-based doses on tacrolimus dosing requirement after adult kidney transplantation. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v. 68, n. 5, p. 671-680, 2011.

- SUAREZ-KURTZ, G. et al. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. **Pharmacogenomics**, London, v. 8, n. 10, p. 1299-1306, Oct. 2007.
- SUN, J. et al. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. **Med Sci Monit**, Warsaw, v. 10, n. 1, p. RA5-14, Jan. 2004.
- TADA, H. et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. **Transplant Proc**, New York, v. 37, n. 4, p. 1730-1732, May 2005.
- TAKAHASHI, N.; HAYANO, T.; SUZUKI, M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. **Nature**, London, v. 337, n. 6206, p. 473-475, Feb. 1989.
- TANABE, M. et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v. 297, n. 3, p. 1137-1143, June 2001.
- TANG, K. et al. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. **Pharmacogenetics**, London, v. 12, n. 6, p. 437-450, Aug. 2002.
- THE HUMAN Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Disponível em: <<http://www.cypalleles.ki.se/>>. Acesso em: 13 mar. 2012.
- THERVET, E. et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. **Clin Pharmacol Ther**, New York, v. 87, n. 6, p. 721-726, June 2010.
- THIEBAUT, F. et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, DC, v. 84, n. 21, p. 7735-7738, Nov. 1987.
- TSAI, C. J. et al. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. **J Mol Biol**, Amsterdam, v. 383, n. 2, p. 281-291, Nov. 2008.
- TSUCHIYA, N. et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. **Transplantation**, Baltimore, v. 78, n. 8, p. 1182-1187, Oct. 2004.
- TUROLO, S. et al. Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in Italian teenagers after kidney transplantation. **Pharmacol Rep**, Krakow, v. 62, n. 6, p. 1159-1169, Nov./Dec. 2010.
- VENKATARAMANAN, R. et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v. 29, n. 6, p. 404-430, Dec. 1995.
- VINCENTI, F. et al. A randomized, multicenter study of steroid avoidance, early steroid withdrawal or standard steroid therapy in kidney transplant recipients. **Am J Transplant**, Hoboken, v. 8, n. 2, p. 307-316, Feb. 2008.

WANG, J. CYP3A polymorphisms and immunosuppressive drugs in solid-organ transplantation. **Expert Rev Mol Diagn**, London, v. 9, n. 4, p. 383-390, May 2009.

YOUNG, A. et al. Accepting kidneys from older living donors: impact on transplant recipient outcomes. **Am J Transplant**, Hoboken, v. 11, n. 4, p. 743-750, Apr. 2011.

ZHANG, X. et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. **Clin Transplant**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 638-643, Oct. 2005.

ZHENG, H. X. et al. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. **Transpl Immunol**, Dunto Green, v. 14, n. 1, p. 37-42, Mar. 2005.