Lucas Augusto Moysés Franco

**Perfil farmacogenômico de pacientes com doença de Chagas
em tratamento com benznidazol**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira
Sabino

São Paulo

2019

Lucas Augusto Moysés Franco

**Perfil farmacogenômico de pacientes com doença de Chagas
em tratamento com benznidazol**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira
Sabino

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Franco, Lucas Augusto Moysés
Perfil farmacogenômico de pacientes com doença de
Chagas em tratamento com benznidazol / Lucas
Augusto Moysés Franco. -- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Farmacogenômica
3.Efeitos colaterais e reações adversas relacionados
a medicamentos 4.Benzonidazol 5.Transcriptoma
6.Genoma humano

USP/FM/DBD-249/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

A minha orientadora, Professora Dra. Ester Cerdeira Sabino, pela confiança em mim e no meu trabalho, pela minha inclusão no seu grupo de pesquisa, pelos valiosos ensinamentos, por todas as oportunidades que culminaram no meu crescimento profissional, amizade, risadas e carinho ao longo desses anos.

Ao Professor Dr. Alexandre da Costa Pereira, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor) e do Departamento de Genética da Harvard Medical School, onde carinhosamente me recebeu e acompanhou durante todo meu estágio de doutorado sanduiche em Boston. Alexandre se tornou um grande colaborador para este projeto, meu aprendizado e aprimoramento profissional.

A professora Dra. Lucia Spangenberg do Institut Pasteur de Montevideo, pelo carinhoso estágio de treinamento e aperfeiçoamento em análise de dados durante minha estadia em seu laboratório, em Montevideo.

Ao Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Ao Professor Dr. Edécio Cunha Neto do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia do LIM-60, pelas sugestões e uso do programa IPA para as análises dos dados.

À Dra. Roberta Cristina Ruedas Martins, por toda amizade, colaboração neste trabalho, aprimoramento profissional, aprendizado e companhia diária de diversão e gargalhadas.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia LIM 46, Erika Regina Manuli, Dra. Léa Campos Oliveira e aos alunos Dr. Carlos Henrique Valente, Flávia Sales, Camila Cruz, Marcia Hage, Natália Souza de Godoy, Ingra Morales, Geovana Pereira, Gaspar Camilo, Gabriel Castanheira e Felipe Silva.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia LIM 54, Professora Dra. Silvia Costa, Andréia Alcaia, Lauro Perdigão, Ana Paula Marchi, Débora Nagano e Bruna Carvalho, Victor Castro.

À Roseli Antonia Santo e à Luiza Maria Assis Vieira, pelo apoio administrativo.

Aos meus pais, Ivani Maria Moyses e Álvaro Augusto, e familiares, Nelson Gaburo Junior, Rachel Moyses Franco, Samyra Moyses Franco e Isabela Franco da Silva, por todo apoio, parceria e incentivo.

A todos parentes e amigos.

A Deus, pela minha existência e por iluminar o meu caminho.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Doença de Chagas	1
1.2	Abordagens terapêuticas para Doença de Chagas	4
1.3	BZN e as reações adversas a medicamentos (RAMs)	9
1.4	Contexto genético – <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNPs)	11
1.5	Contexto genético – Transcriptoma	14
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVO	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Desenho do estudo	19
4.2	População estudada	20
4.2.1	Critérios de exclusão	21
4.3	Análises genômicas	21
4.3.1	Protocolo de coleta e armazenamento de amostras	21
4.3.2	Extração de DNA	22
4.3.3	Quantificação do DNA	23
4.3.4	Avaliação da integridade	23
4.3.5	Axiom™ 2.0 preparação de alvos	24
4.3.5.1	Amplificação do DNA	24
4.3.5.2	Fragmentação e precipitação	25
4.3.5.3	Secagem e ressuspensão	26
4.3.5.4	Desnaturação e Hibridização	27
4.3.5.5	Preparação manual das placas para o equipamento GeneTitan MC	27
4.3.5.6	Processamento das amostras pelo equipamento GeneTitan	28
4.3.6	Métodos de análise de dados	28
4.3.6.1	Axiom Suite Analysis	28
4.3.6.2	Uso da plataforma “R” e PLINK para a análise estatística de dados	29
4.4	Análises de transcriptoma	31
4.4.1	Coleta, extração e quantificação do RNA	31
4.4.2	Preparo das bibliotecas	31
4.4.2.1	Obtenção do cDNA	31
4.4.2.2	Amplificação das sequências alvo	31
4.4.2.3	Digestão parcial dos primers	32
4.4.2.4	Ligação com <i>Barcodes</i>	32
4.4.2.5	Isolamento da biblioteca não amplificada	32
4.4.2.6	Quantificação e diluição da biblioteca utilizando o RT-PCR	33
4.4.2.7	Preparo do template/PCR em emulsão e enriquecimento	33
4.4.3	Reação de Sequenciamento do Ion Torrent Proton	34
4.4.3.1	Preparo das amostras	34
4.4.3.2	Carregamento do chip	34
4.4.4	Análise dos dados transcriptômicos	35
4.4.4.1	Bioinformática e análise estatística	35
5	RESULTADOS	40
5.1	Resultados epidemiológicos	40
5.2	Resultados genômicos	41
5.2.1	Perfil de ancestralidade da população estudada	41
5.2.2	Imputação dos dados e análise de associação	42

5.3	Resultados Transcriptômicos	52
5.4	Busca de marcadores preditivos para RAMs	68
5.5	Associação de resultados genômicos e transcriptômicos para busca de vias de sinalização preditivas de RAMs	75
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	85
8	ANEXOS	86
	Anexo I - Resultados da análise de integridade de RNA (RIN) das amostras obtidos pelo Bioanalyzer 2100	86
	Anexo II – Artigos publicados	88
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Lista de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	2
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação das principais drogas com atividade sobre <i>T. cruzi</i>	5
Figura 3 - Modelo esquemático de SNP	12
Figura 4 - Sangue após centrifugação	22
Figura 5 - Gel para avaliação da integridade do DNA das amostras	24
Figura 6 - Relatório de sequenciamento plataforma Ion Proton	36
Figura 7 - Script de análise transcriptômica	37
Figura 8 - <i>Vulcano Plot</i>	38
Figura 9 - Análise do perfil de ancestralidade das amostras	42
Figura 10 - Gráfico de QQ-plot	43
Figura 11 - Ampliação de região do cromossomo 16	46
Figura 12 – Ampliação de região do cromossomo 3	47
Figura 13 - Ampliação de região do cromossomo 4	48
Figura 14 - Ampliação de região do cromossomo 2	49
Figura 15 - Ampliação de região do cromossomo 12	50
Figura 16 - Ampliação de região do cromossomo 20	51
Figura 17 - Ampliação de região do cromossomo 15	52
Figura 18 - Vulcano plot da comparação de T0 x T60 grupo gNRAM	53
Figura 19 - Vulcano plot da comparação de T0 x T60 grupo gRAM	54
Figura 20 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 24	56
Figura 21 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 42	65
Figura 22 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 39	66
Figura 23 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 10	67
Figura 24 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 1	68

Figura 25 - <i>Heatmap</i> das amostras gRAM e gNRAM T0 normalizadas	69
Figura 26 - <i>Heatmap</i> das amostras gRAM e gNRAM T0 normalizadas e filtradas por amostra.	72
Figura 27 - Modelo de análise spLSDa das amostras gRAM e gNRAM	74
Figura 28 - Genes responsáveis pela separação das amostras em grupos gRAM e gNRAM	74
Figura 29 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 27	77
Figura 30 - Representação da via de sinalização de <i>score</i> 22	78

Lista de tabelas

Tabela 1- Demonstração dos 50 SNPs com menor P Value após imputação dos dados genômicos	44
Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos em pacientes do grupo gNRAM da comparação T0 x T60, filtrados pelo P Value e logFC e associados a vias de sinalização pelo IPA	54
Tabela 3 - Vias ativadas pelo carregamento dos dados da comparação dos pacientes gNRAM T0 x T60	55
Tabela 4 - Pacientes gRAM da comparação T0 x T60, filtrados pelo P Value e logFC e associados a vias de sinalização pelo IPA	57
Tabela 5 - Vias ativadas pelo carregamento dos dados da comparação dos pacientes gRAM T0 x T60	61
Tabela 6 - Genes significativos encontrados na comparação T0 gRAM x gNRAM	70
Tabela 7 - Vias de sinalização apresentadas pela junção dos dados genômicos e transcriptômicos.	75

Resumo

Franco LAM. *Perfil farmacogenômico de pacientes com doença de Chagas em tratamento com benznidazol* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Contexto: A doença de Chagas (DC) continua sendo um grande problema de saúde pública e social na América Latina. O Benznidazol (BZN) é uma das duas drogas antiparasitas disponíveis para o tratamento do agente etiológico *Trypanossoma cruzi*. Esta droga provoca várias reações adversas ao medicamento (RAM). O objetivo deste estudo foi compreender as bases genéticas associadas às RAMs do BZN. **Métodos:** Uma coorte prospectiva de 102 pacientes com DC, tratados com BZN, foi estabelecida para entender os biomarcadores de cura e reações adversas. Os pacientes foram classificados em dois grupos: com pelo menos uma manifestação de RAM (n = 73) e sem RAM (n = 29). Análises genômicas em busca de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) comparando esses grupos foram realizadas usando GeneTitan Axiom 2.0 (Affymetrix, Califórnia, EUA). Dados de transcriptoma foram obtidos utilizando o painel Ion Proton AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) em busca de genes diferencialmente expressos, antes (T0) e ao final do tratamento (T60) com BZN. Dados de expressão gênica deste painel foram utilizados para avaliar as vias de sinalização envolvidas nas principais manifestações clínicas das RAMs. **Resultados e conclusões:** Foi detectada uma região do cromossomo 16 altamente associada à reação adversa ao BZN (rs1518601, rs11861761 e rs34091595). Os dados transcriptômicos revelaram vias de sinalização associadas às RAMs do BZN, em concordância com os sintomas clínicos de RAMs mais comuns apresentados pelos pacientes do estudo.

Descritores: Doença de Chagas; Farmacogenômica; Efeitos colaterais e reações adversas relacionados a medicamentos; Benznidazol; Transcriptoma; Genoma humano.

Abstract

Franco LAM. *Pharmacogenomic profile of patients with Chagas' disease on benznidazole* [thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Background: Chagas' disease (CD) remains a major social and public health problem in Latin America. Benznidazole (BZN) is one of the two antiparasite drugs available for treating the etiological agent *Trypanosoma cruzi*. This drug causes several adverse drug reaction (ADR). The aim of this study was to understand the genetic basis associated with BZN ADRs. **Methods:** A prospective cohort of 102 patients with CD, treated with BZN was established to understand biomarkers of cure and adverse reaction. Patients were classified in two groups: with at least one ADR manifestation (n= 73), and without ADR (n=29). Genomic analyses in search for single nucleotide polymorphisms (SNPs) comparing these groups was performed using GeneTitan Axiom 2.0 (Affymetrix, California, USA). Transcriptome data was obtained using Ion Proton AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression panel (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) in search for genes differentially expressed, before and at the end of the BZN treatment. Expression data was used to evaluate the signaling pathways involved in the main clinical manifestations of ADR. **Results and conclusions:** We have detected one region of chromosome 16 highly associated with BZN adverse reaction (rs1518601, rs11861761 and rs34091595). Transcriptomic data revealed signaling pathways associated with BZN ADRs, in agreement with the most common clinical symptoms of ADRs presented by patients in this study.

Descriptors: Chagas disease; Pharmacogenetics; Drug-related side effects and adverse reactions; Benznidazole; Transcriptome; Genome, human.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* foi identificado há mais de 100 anos como o agente causador da doença de Chagas. Esta doença ainda é um importante problema social e de saúde pública na América Latina, sendo considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Segundo a OMS, e em comum com outras doenças tropicais negligenciadas, “a doença de Chagas exerce uma relação direta com pobreza e desvantagem social: afeta populações com baixa visibilidade e pouca voz política, causa estigma e discriminação, é relativamente negligenciada pelos pesquisadores e tem considerável impacto na morbidade e mortalidade” (1). O *T. cruzi* infectou pelo menos 7.694.500 de indivíduos desde sua descoberta, e entre 60 e 80 milhões continuam em risco de infecção pelo *T. cruzi* em países endêmicos (2). Em países da América Latina, a doença causa a redução aproximada de 752000 dias úteis de trabalho por conta de mortes prematuras e prejuízos de US \$ 1,2 bilhão em produtividade (3). É estimada uma carga anual de US \$ 627,46 milhões em custos de saúde para os portadores da doença e 806170 anos de vida ajustados por incapacidade, 10% deste fardo afeta países não endêmicos como EUA e Europa (4). A migração e os modos específicos de transmissão levaram à disseminação da doença de Chagas além de suas fronteiras geográficas naturais, tornando-a uma questão global (5-7). Além disso, o perfil típico dos pacientes mudou devido ao aumento da idade e comorbidades associadas.

O *T. cruzi* assume duas formas em seres humanos: A forma tripomastigota, com um flagelo que se estende ao longo da borda externa da membrana, não se divide no sangue, mas carrega a infecção por todo o corpo. Enquanto a forma amastigota, não possui flagelo e se multiplica dentro de vários tipos de células, preferindo as de origem mesenquimal (figura 1)(8).

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*. (imagem disponível em [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)31612-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)31612-4/fulltext))

O *T. cruzi* é uma espécie heterogênea com alta diversidade genética e fenotípica. Tal diversidade genética tem sido relacionada à distribuição

geográfica, à patogênese, às características clínicas e à resposta a terapia (9). O *T. cruzi* é transmitido em áreas naturais por várias espécies de insetos triatomíneos sugadores de sangue, popularmente conhecidos como barbeiro (*Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*). Todos os três gêneros do barbeiro são amplamente distribuídos na América Latina, do México à Argentina e ao Chile, e habitam áreas florestais e áreas secas (10,11). O *T. cruzi* pode ser transmitido através de outras rotas além da propagação vetorial. Essas rotas têm um papel importante em países não endêmicos e uma importância crescente em áreas endêmicas. Estima-se que a taxa de transmissão de mãe para filho seja de 4 a 7% (variação de 3,9-5,6%) e que essa taxa poderia ser maior em países endêmicos do que em países não endêmicos (5% vs 2,7%) (12-15). O principal determinante biológico da transmissão congênita é a parasitemia materna, que pode chegar a 31% quando o *T. cruzi* é detectável pela reação em cadeia da polimerase (PCR), embora a transmissão também seja possível quando a PCR é negativa (14,16). O *T. cruzi* também pode ser transmitido através do sangue e produtos sanguíneos; a taxa de transmissão estimada por unidade de sangue infectada é de 10 a 25% (17,18). A contaminação por transfusão de sangue e derivados, oriundas de pacientes crônicos e assintomáticos, em regiões não-endêmicas já foi amplamente reportada. Embora estratégias para evitar este risco já tenham sido empregadas em muitos países dos EUA e Europa o risco ainda é presente em alguns países não-endêmicos (19). As taxas de infecção após o transplante de órgãos sólidos de um doador infectado parecem ser menores para receptores de rins (0–19%) (20-22) do que para receptores de fígado (0–29%) (22,23) e receptores de coração (75-100%) (22,24). A transmissão oral foi demonstrada recentemente pelo consumo de suco não pasteurizado de Açaí na região Amazônica (25). Acidentes de laboratório representam o modo de menor frequência de transmissão (26). A reativação da doença com quadros de sua forma aguda pode ocorrer em infectados por HIV e pacientes em uso de imunossupressores (27,28).

A doença de Chagas caracteriza-se pela presença de uma fase aguda de curto prazo, que em alguns pacientes pode progredir para uma fase crônica da doença, se não tratados, uma vez que em alguns casos, o tratamento nos estágios iniciais da doença leva à cura permanente com baixa possibilidade de

desenvolvimento da fase crônica. Na fase aguda o paciente apresenta sinais e sintomas, como febre e inchaço pontual no local da infecção, enquanto que na fase crônica pode ocorrer a cardiomiopatia ou transtornos gastrointestinais como megacólon, megaesôfago, megaestômago, megaduodeno, megajejuno, megavesícula biliar, e ainda distúrbios motores e gastrointestinais, tais como acalasia da cárdia, distúrbios de esvaziamento gástrico, alteração no trânsito intestinal e distúrbios motores do cólon e da vesícula biliar (29). Os sintomas de fase aguda são comumente associados a outras enfermidades ou ainda ignorados, assim, estes pacientes, em boa parte dos casos, são diagnosticados tardiamente, quando as taxas de cura pelo uso dos medicamentos disponíveis tornam-se menores. Atualmente, não existe vacina para prevenir a infecção e a abordagem quimioterápica é restrita.

1.2 Abordagens terapêuticas para Doença de Chagas.

Já foram relatados na literatura múltiplos alvos farmacológicos com atividade sobre o *T. cruzi*. Em 2017, Sales Junior e colaboradores apresentaram estes alvos, alguns já bem estabelecidos e outros em estudo, de forma esquemática na figura 2. Sendo, (A) ação dos bisfosfonatos na inibição da farnesil pirofosfato sintetase, que reduz os níveis de esteróis e outros compostos poli-isoprenóides essenciais ao parasita, afetando sua viabilidade. (B) Nifurtimox (NFX) e benznidazol (BZN) que exercem efeito após ação enzimática da nitroredutase no parasita, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que danificam diretamente as células do parasita. Para atenuar estes efeitos, a tripanotona redutase auxilia na redução do estresse oxidativo, assim, inibidores desta enzima, como a tioridazina e a sulfoximina butionina, aumentam a quantidade de ROS no espaço intracelular, potencializando os efeitos do NFX e do BZN. (C) A via de sinalização do ergosterol é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi*. O bloqueio dessa via leva à perda da viabilidade celular por meio do esgotamento dos esteróis essenciais e do acúmulo de intermediários tóxicos. Os inibidores de ergosterol e análogos de fenarimol visam atividade regulatória sobre a lanosterol C14 demetilase. A amiodarona e

dronedarona exercem inibição parcial da oxidosqualeno ciclase. Os inibidores fosfolipídicos bloqueiam a síntese de esteróis, inibem a síntese de fosfolípidios através da via de Greenberg e inibem enzimas de transdução de sinal tais como fosfatidilinositol fosfolipase C. (D) Amiodarona e dronedarona liberam Ca^{2+} da mitocôndria e acidocalcisomes, que aumentam os níveis de Ca^{2+} no espaço citoplasmático e comprometem a sobrevivência celular. (E) Cruzipain é tipicamente localizada no aparelho de Golgi, bolsa flagelar e glicosomas e é uma protease de cisteína essencial envolvida na diferenciação do parasita, invasão celular, multiplicação e evasão imune. Inibidores da cruzipain alteram o aparato de Golgi, devido ao acúmulo de precursores cruzipain (1)(30).

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação das principais drogas com atividade sobre *T. cruzi*. As caixas verdes representam drogas atualmente usado para tratamento, as caixas amarelas representam drogas em ensaios clínicos, e as caixas vermelhas representam

drogas experimentais. (Imagem disponível em <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.16-0761>).

Embora muitos estudos foram realizados na busca farmacológica de drogas com ação sobre o *T. Cruzi*, atualmente a abordagem quimioterápica de tratamento clínico é restrita a dois compostos: nifurtimox (NFX) (4 [(5-nitrofurfurylidene)amino] -3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) derivado de nitrofurano e o BZN (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (31,32). O NFX tem sido usado desde 1967, comercializado pela Bayer sob a marca Lampit^R, e o BZN foi lançado pela Roche em 1972, sob a marca Rochagan^R.

O BZN é geralmente preferido em relação ao NFX devido ao seu melhor perfil de tolerabilidade, penetração no tecido e, possivelmente, eficácia, além de ser o único comercializado no Brasil e disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Ele é administrado por via oral em duas ou três doses, geralmente por 60 dias em doses de 5 mg/Kg/dia. Doses mais altas de até 15 mg/kg/dia são recomendadas em casos de meningoencefalite (11). Segundo alguns relatos, 30 dias de tratamento podem ser úteis para adultos cronicamente infectados (33). O BZN tem atividade considerável durante as fases aguda e precoce da infecção por *T. cruzi*: a cura sorológica é alcançada em até 100% dos pacientes com doença congênita tratados no primeiro ano de vida (34,35) e em 76% dos pacientes com doença aguda (36). No início da fase crônica o BZN apresenta resultados encorajadores, como soroconversão negativa alcançada em 58% a 62% dos casos após 3 a 4 anos de acompanhamento de crianças infectadas (37,38). Na fase crônica tardia da doença, as taxas de cura são muito menores em adultos 2 a 40%, embora esses valores melhorem com maior tempo de seguimento (33,36,39). Além disso, um pequeno estudo não-randomizado, aberto, mostrou uma progressão mais lenta de cardiomiopatia grave em adultos tratados com BZN (33). Por fim, uma revisão sistemática de cinco ensaios clínicos, que estudaram 756 pacientes, sugere que o uso de BZN pode reduzir os níveis do parasita nos pacientes com a doença de Chagas, assim como resultar em xenodiagnóstico negativo e taxas mais altas de sororreversão (40). Estes estudos foram a base para a indicação do uso do BZN pelo Centro para

Prevenção e Controle de Doenças (41) (CDC do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) dos EUA e recentemente pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (42). Atualmente acredita-se que o tratamento direto contra o parasita *T. cruzi* seja necessário para evitar as consequências da doença em longo prazo (41,43).

A eficácia e a tolerância ao BZN estão inversamente relacionadas com a idade dos pacientes, com menores taxas de resposta em adultos, tal como referido acima. Efeitos colaterais adversos, principalmente dermatológicos, gastrointestinais, neurológicos e hematológicos, são relativamente raros em crianças, mas ocorrem em 30 a 60% dos pacientes adultos (32,40). A ausência de provas sólidas para apoiar o tratamento universal com BZN de todos os pacientes soropositivos para *T. cruzi* trouxe a questão do tratamento específico da doença de Chagas para a agenda global de saúde pública, com um apelo para o desenvolvimento de drogas mais eficazes e seguras (44).

Sobre o mecanismo de ação, de forma mais detalhada, para o BZN já é sabido que este é um composto nitroheterocíclico que contém um grupo nitro ligado a um anel de imidazole. Como uma pró-droga, o BZN sofre ativação por ação enzimática para ter efeitos citotóxicos dentro do parasita, as enzimas responsáveis por esta atividade são denominadas nitrorredutases (NTR) (45). Por existirem duas possíveis enzimas agindo sobre o BZN, existem duas hipóteses propostas para a sua ação tóxica. A primeira delas postula a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), seguindo uma redução de um elétron causada pela atividade enzimática da NTR tipo II. Em condições aeróbicas, este induz a produção de superóxido e causa reciclagem da droga (46). No entanto, sabe-se que o *T. cruzi* possui tanto defesas antioxidantes enzimáticas como não enzimáticas. O que torna improvável que a geração medicamentosa de ROS afete a viabilidade do parasita, pelo menos nas doses utilizadas para o tratamento da doença (45,47-50). A segunda hipótese propõe uma redução de dois elétrons na droga pela ação da NTR tipo I. Esta reação passa o BZN de espécie nitrosa, para um derivado de hidroxilamina usando NADPH como uma fonte de doadores de elétrons. Hidroxilaminas podem reagir para produzir o cátion nitrenium, que induz quebras no DNA. Além disso, o BZN pode intermediar e afetar outras moléculas vizinhas dentro das células do parasito (51).

O BZN, como qualquer molécula exógena, ao ser absorvido pelo organismo será fatalmente transportado pelos sistemas e metabolizado para futuramente ser eliminado. O fígado desempenha o papel principal na eliminação de compostos endógenos e exógenos. A expressão e atividade de sistemas de biotransformação e transporte podem ser alteradas por vários fatores, incluindo a dieta, hormônios, envelhecimento, doenças ou substâncias indutoras (52). Esta poderia ser uma explicação para a eficácia e a tolerância ao BZN estarem inversamente relacionadas com a idade dos pacientes, tal como referido acima.

Devido à co-localização e função coordenada entre enzimas e transportadores, uma regulação simultânea destes sistemas tem sido sugerida (53-55). Tal regulação pode ocorrer tanto no nível transcricional como no pós-transcricional, resultando em alterações nos níveis de RNAm e proteína, ou ao nível de processamento pós-translacional (56,57). Em geral, a regulação da transcrição envolve ativação nuclear por receptores ligantes. O receptor pregnano X (PXR) é um receptor nuclear, muito promíscuo, e considerado o principal xenosensor, que regula genes envolvidos no metabolismo e eliminação de compostos endo e exógenos (52). Estes incluem os genes codificadores de enzimas de biotransformação de fase I e II (58,59). O PXR funciona como um mecanismo de defesa contra subprodutos tóxicos oriundos do metabolismo de diferentes substâncias, participando ativamente de processos de detoxificação destes elementos, e também constitui a base molecular para interações fármaco-fármaco indesejados (52).

A ativação do PXR mediada pelo fármaco pode acelerar a sua própria depuração (autoindução) ou a depuração de fármacos administrados concomitantemente conduzindo a concentrações plasmáticas reduzidas e, assim, diminuindo a eficácia da terapia. Curiosamente, um estudo realizado em pacientes que receberam BZN (7 mg / kg / dia durante 30 dias, duas vezes por dia), demonstrou que as concentrações plasmáticas máximas de BZN após a primeira dose da manhã tende a diminuir com o tempo de tratamento (em média, após 25 dias de tratamento) (60), sugerindo a possibilidade de auto-indução do metabolismo ou mecanismos de absorção limitada.

Rigalli JP e colaboradores (2012), demonstraram o efeito do tratamento com BZN (200 mM, 48 h) sobre a modulação da expressão da CYP3A4. Foi gerada uma indução de 43% destas proteínas em células HepG2, um modelo experimental de linhagem celular de hepatócitos humanos. P-gp e MRP2 são proteínas de efluxo localizadas principalmente na membrana plasmática. Neste mesmo estudo, Rigalli JP et al, demonstraram que o BZN (200 mM, 48 h) gera um aumento significativo de 38% e 50%, respectivamente, na expressão da proteína MRP2 e P-gp em membranas plasmáticas das células HepG2. Ainda para validar se a *up-regulation* proteica da P-gp e MRP2 era resultante do aumento dos níveis de mRNA, este grupo determinou a sua expressão por RT-PCR (do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*). Foi demonstrado que o tratamento com BZN (200 mM, 48 h) produziu um aumento significativo nos níveis de RNAm para P-gp e MRP2, sugerindo regulação transcricional destes genes de RNAm, ambos mediados por um receptor nuclear (61,62). Ainda nesta publicação, este grupo demonstrou que o silenciamento do receptor nuclear PXR neste modelo experimental com células HepG2, levavam à transcrição proteica para CYP3A4, P-gp e MRP2 nos mesmos níveis das células controle. Sugerindo então que o receptor PXR estaria envolvido diretamente com a modulação farmacocinética gerada pelos tratamentos com BZN nestes sistemas (52).

1.3 BZN e as reações adversas a medicamentos (RAMs)

Uma RAM é definida como "uma reação sensivelmente prejudicial ou desagradável, resultante de uma intervenção relacionada ao uso de um medicamento. Esta prevê risco de administração futura e justifica prevenção, tratamento específico, alteração do regime posológico ou interrupção do produto" (63).

Os efeitos adversos relacionados a administração de medicamentos não são apenas uma questão importante na prática clínica, mas também um risco para a saúde pública (64,65). Assim, a elucidação e a compreensão dos mecanismos subjacentes a essas RAMs são fundamentais para o diagnóstico clínico e o manejo de diferentes RAMs. Principalmente no caso do tratamento da

doença de Chagas, que no Brasil possui o BZN como única alternativa medicamentosa.

Um estudo prospectivo de coorte estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa seguiu 93 adultos (idade entre 18-65 anos) infectados por *T. cruzi* com a forma crônica indeterminada da doença. Estes apresentavam acometimento cardíaco ou digestivo leve a moderado, durante o tratamento com BZN (na dose de 5mg / kg / dia, até 300 mg / dia durante 60 dias). Os pacientes foram avaliados em três visitas ambulatoriais para avaliação de aderência e surgimento de RAMs (aproximadamente 15, 30 e 60 dias após o início do tratamento). A eles foi solicitado que ligassem para um telefone exclusivo em que um médico do grupo avaliaria a severidade da reação e orientaria quanto à necessidade de pronta avaliação ou somente em consulta ambulatorial. Durante as visitas, além de anamnese e exame físico, foi preenchido instrumento de coleta de dados para reportar as seguintes reações adversas: dermatológicas (prurido, lesões cutâneas); gastrointestinais (vômitos, náuseas, intolerância gástrica); neurológicas (parestesias, dor nas mãos ou pés); supressão de medula óssea (citopenias periféricas); disfunção renal ou hepática (creatinina acima do valor de referência, aumento de transaminases > 3x o limite superior da normalidade). A interrupção do tratamento foi realizada nos casos em que houve disfunção hepática ou renal, neuropatia periférica, disgeusia, dermatopatia grave com febre e linfadenopatia, supressão de medula óssea flagrada por citopenias. Dos 87 pacientes que completaram o seguimento, 66.7% (58/87) apresentaram uma ou mais reações adversas durante o tratamento, sendo que destas, 63.8% estavam relacionadas a manifestações cutâneas, 41.4% a gastrointestinais e 36.2% neurológicas. A maior parte das reações adversas, 77.6% (45/58) ocorreram nos primeiros 15 dias de tratamento. Na visita do trigésimo dia de tratamento, foi observada uma taxa de 39.7% (23/58) dos pacientes manifestando ao menos uma RAMs, dos quais, 60.9% foram relacionadas a manifestações dermatológicas. Na visita do sexagésimo dia de tratamento, 46,6% (27/58) dos pacientes referiram RAMs, das quais 48.1% eram neurológicas (neuropatia periférica ou alteração de paladar). Os sintomas das RAMs desapareceram após interrupção da administração do BZN. Dois pacientes com RAMs graves foram internados na emergência por menos de

24hs para receberem glicocorticoides intravenosos. Não houve qualquer evento fatal nesta coorte.

Na literatura pode se observar que os efeitos adversos mais comuns envolviam hipersensibilidade, principalmente na forma de erupção cutânea (29–50%), intolerância digestiva (5–15%) e sintomas gerais como anorexia, astenia, cefaleia e distúrbios do sono (40%). Neuropatia e depressão da medula óssea foram consideradas raras. O tratamento foi descontinuado em 9-29% dos casos, embora essas reações sejam reversíveis e graves em menos de 1% dos casos (30,66-68). Não foram encontrados níveis séricos elevados nem altas doses diárias (> 300 mg) associadas a um aumento na frequência de eventos adversos (66,69)', demonstrando assim que as RAMs oriundas do tratamento com BZN não se relacionam com quadros de intoxicação, por doses plasmáticas elevadas do fármaco, uma vez que, os níveis séricos não ultrapassam o limite superior da janela terapêutica. É possível ainda inferir que tais quadros se relacionam com características pessoais e genéticas de uma parcela de seus usuários que manifestam as RAMs.

1.4 Contexto genético – *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs)

Com os avanços tecnológicos, surgiram grandes plataformas do tipo SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*. Cada SNP tem quatro possíveis alelos (A, C, G e T). Foi a partir do International HapMap Project (2003) que houve a introdução do conhecimento sobre os SNPs. Os SNPs são polimorfismos, variações de um único nucleotídeo que ocorrem na população e são utilizados como marcadores em estudos genômicos que informam sobre a localização de genes, em geral, posicionados na sua vizinhança, que estão associados com a doença ou características específicas de outros tipos de estudos. São considerados muito pouco polimórficos, isto é, assumem somente três classes genótípicas, por exemplo, para um certo loco de SNP, tem-se as possíveis categorias AA, Aa e aa, que podem ter a seguinte codificação: 0 para indivíduos homozigotos para o alelo de maior frequência na população, 1 correspondendo a indivíduos heterozigotos e 2 correspondendo a indivíduos homozigotos para alelos de menor frequência, respectivamente. Acredita-se que

existam em torno de 10 a 13 milhões desses marcadores ou mudanças no genoma humano. Nestes marcadores, o que acontece é uma diferença na sequência de DNA nas bases A (adenina), T (timina), C (citossina) e G (guanina), por exemplo, na sequência AAGCCTA pode-se ter a sequência alterada para AAGCTTA. Como ilustração deste tipo de marcador segue na Figura 3 duas moléculas de DNA, em que a primeira difere da segunda em um único nucleotídeo (polimorfismo C/T).

Figura 3 - Modelo esquemático de SNP: Duas moléculas de DNA demonstrando um polimorfismo de único nucleotídeo, do inglês *single-nucleotide polymorphism* (SNP) (imagem disponível em https://isogg.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism)

Nos estudos de associação entre fatores de risco genéticos e doença (em geral, categorizada de forma dicotômica), existem diferentes alternativas de coleta de dados, como os delineamentos observacionais (transversal, prospectivo e retrospectivo) que podem ou não incorporar informação familiar (31,70). Os estudos caso-controle (retrospectivos) são os mais comumente adotados e sua análise estatística é feita, em geral, por meio de modelos de regressão logística (71). Na análise de associação genética considerando um

único marcador, Batista (2006) apresenta diferentes aplicações deste modelo, enfatizando as vantagens e limitações das análises genótípicas e cromossômicas (72). A utilização de análises no nível cromossômico, com dados coletados em nível de indivíduos (genótipos), envolve o diagnóstico criterioso de hipóteses que são assumidas na reestruturação dos dados, as quais correspondem a população infinita, casamentos aleatórios e genes em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, EHW (73,74).

Nos delineamentos caso - controle, pessoas diagnosticadas no início do experimento como tendo uma certa característica (caso) são comparadas com pessoas que não têm a característica (controle). Pode-se definir, por exemplo, os grupos de caso e controle como formado por indivíduos com e sem uma determinada doença de interesse como diabetes, hipertensão, entre outras. Uma das preocupações neste tipo de delineamento é com a obtenção dos dados amostrais, pois a partir de como estes são obtidos pode existir um efeito de confusão gerado pelo desbalanceamento na constituição genômica dos indivíduos caso e controle, conduzindo a falsas conclusões resultantes de testes de hipóteses de interesse. Existem várias propostas na literatura para contornar este tipo de efeito. Batista et al. (2008) e Giolo et al. (2011) comparam modelos logísticos com e sem covariáveis genéticas e concluíram que para dados de caso-controle são necessários ajustes para controlar o efeito de estratificação (75,76).

Com o avanço nos estudos de marcadores, grandes plataformas de SNPs foram criadas e o desafio que se impôs foi o de encontrar regiões de SNPs associados com a doença ou característica definida pela relação entre os grupos estudados. A partir da avaliação de um espaço de variáveis preditoras de alta dimensão, com estudos de até 1 milhão de SNPs estudados inicialmente, até que se determine que muitos destes SNPs apresentem efeito nulo na diferença estatística entre os grupos. Tal abordagem pode resultar em problemas de múltiplos testes, isto é, na necessidade de correções nos níveis descritivos (valor p) das estatísticas de associação. Lazeroni and Lange (1998) propuseram uma correção do tipo Bonferroni para valores p correspondentes às análises de uma sequência de SNPs adjacentes, associados entre si e associados com a doença ou parâmetros vistos pelos grupos estudados (77).

Desequilíbrio de ligação é a associação probabilística entre locos. Em genética é implicitamente usado nos estudos de associação entre loco genético (“gene”) e uma determinada doença ou fator estudado. Quando os locos estão em associação é mais fácil identificar uma região genômica candidata com base na amostragem de um único loco da região. Por isso sabe-se que o efeito individual do SNP é pequeno (78,79), devido ao pouco desequilíbrio de ligação entre cada SNP e genes associados com a doença ou parâmetros vistos pelos grupos estudados, o que pode não acontecer quando mais de um SNP é avaliado na associação com uma doença ou na relação dos grupos casos e controles. Desta maneira, análises uniloco que consideram o efeito de cada SNP por vez ignoram a informação adicional que a dependência entre estes marcadores pode trazer para o estudo de associação de genes com a doença ou grupos estudados (80).

Estes estudos de associação genética realizados em larga escala genômica são conhecidos como GWAS (do inglês, Genome-Wide Associations), isto é, estudos que pesquisam muitos locos do genoma simultaneamente. Estes têm ganhado grande atenção de epidemiologistas nos últimos anos, principalmente devido ao crescimento acelerado e disponibilidade de mapas densos de SNPs (81). Apesar do sucesso que estes estudos têm trazido na identificação de genes (70,82), ainda existem muitos desafios analíticos e de interpretação funcional/causal dos resultados a serem pesquisados. Neste cenário, os problemas que mais caracterizam a análise de dados genômicos são: (i) efeitos de desarranjo devido à estratificação genética da população, (ii) efeito individual do SNP pequeno, (iii) alta dimensionalidade do espaço das variáveis preditoras (SNPs) a serem avaliadas e, (iv) tamanho amostral pequeno para a ocorrência das classes genótípicas de SNPs na amostra.

1.5 Contexto genético – Transcriptoma

O maquinário para a realização de vários processos em uma célula envolve uma complexa estrutura de dinâmica interação entre milhares de proteínas e outras moléculas biológicas. Estas células utilizam proteínas, entre

outras substâncias, para regulação de sistemas frente a um objetivo, como a resposta a um dano, produzindo proteínas de reparação. A homeostase celular, e do sistema biológico como um todo, é o objetivo final a ser alcançado através da expressão gênica que envolvem a transcrição de milhares de genes de maneira coordenada. A expressão de um gene pode ser facilitada pela regulação da transcrição de proteínas que reconhecem sequências promotoras específicas. A associação de proteínas reguladoras com o genoma gera uma cascata contínua de processamento de informações. Este fenômeno é detectado e controlado conforme a síntese de novas proteínas ocorrem e eles são moduladas dentro de uma célula, constituindo uma rede reguladora da transcrição, denominada de rede transcricional (do inglês *transcription networks*) (83,84).

Sabemos que as redes de transcrição representam a interação entre fatores de transcrição e genes. O processo de transcrição garante que a RNA polimerase produza o RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) correspondente à sequência codificadora de um gene. O RNAm é traduzido para formar uma proteína que também é conhecida como produto do gene. Cada gene é precedido por um pequeno trecho de DNA regulador chamado promotor. O promotor é uma sequência de DNA específica que pode ligar a RNA polimerase, que é um complexo de várias proteínas. A taxa na qual o gene é transcrito é determinado pela qualidade do local de ligação e do promotor que controla o número de RNAm gerado por unidade de tempo. O complexo da RNA polimerase atua em vários genes, enquanto os fatores de transcrição regulam alterações nos perfis de expressão de genes específicos. Os fatores de transcrição quando ligados modulam a atividade da RNA polimerase em permanecer ligada ao promotor para produzir o RNAm. Fatores de transcrição também podem funcionar como ativadores, aumentando a taxa de transcrição de um gene ou como repressores diminuindo-a. As proteínas do fator de transcrição são codificadas por genes, que por sua vez, podem ser modulados por fatores de transcrição de uma rede transcriptômica no genoma independente da sua. Assim, através da ampla comunicação de redes transcriptômicas independentes é possível alcançar um ajuste fino entre os sistemas para chegar a homeostase (83,84).

O transcriptoma é uma ferramenta poderosa que pode expor padrões de expressão genética para definir estados celulares ou para identificar genes com padrões de expressão semelhantes frente a um estímulo. O transcriptoma é definido como uma coletânea de moléculas de RNAm expressas por um organismo em um determinado momento específico, permitindo assim avaliar genes diferencialmente expressos para elucidação da resposta molecular do organismo frente a diferentes situações e estímulos. Este método pode oferecer informações valiosas sobre os processos biológicos significativos por trás da manutenção da funcionalidade da célula. O transcriptoma fornece fundamentos para estudos e orientações mais definitivos sobre a funcionalidade de genes e sua relação com redes transcriptômicas associadas (85).

Com o rápido crescimento no campo da biologia molecular e da genômica, um maior entendimento sobre a complexidade das RAMs foi obtido tanto em modelos animais quanto em seres humanos. A recente aplicação de tecnologias geradoras de grande e robustos dados no campo das “ômicas” na última década, como a transcriptômica (perfil genômico amplo de genes), proteômica (perfil de expressão de proteínas em toda a célula e tecido) e metabolômica (perfis de metabólitos), seriam a abordagem de biologia de sistemas que poderia aprofundar a compreensão dos efeitos adversos de drogas. Estes métodos permitem avaliar a estrutura e a dinâmica do genoma na interação com fármacos e suas respostas fenotípicas frente a diferentes populações. Assim, levando a maior compreensão, no nível molecular, da modulação de vias de sinalização do organismo frente a RAMs.

Um dos estudos pioneiros na avaliação de dados genômicos com quadros de intoxicação examinou o perfil de transcrição de *Saccharomyces cerevisiae* após exposição ao agente alquilante metil metanossulfonato por uma técnica de *arrays* que representou todo o genoma da levedura (86). Foi demonstrado aumento na transcrição de mais de 300 genes, induzidos pela exposição, muito mais do que o número de genes conhecidos por serem induzidos por um agente danificador de DNA na época, e a diminuição de expressão de 76 genes. Além disso, as mudanças no perfil de expressão gênica também forneceram evidências para o início de um processo para eliminar e substituir proteínas alquiladas na célula. Este trabalho demonstrou que um perfil global de expressão

gênica é útil na descoberta de novos genes e vias envolvidos em quadros de intoxicação por agentes químicos exógenos.

2. JUSTIFICATIVA

A alta taxa de RAMs é uma das principais causas para que os médicos não prescrevam BZN aos seus pacientes. Pouco se conhece sobre o metabolismo do BZN e as razões que levam os pacientes a apresentar RAMs.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Buscar polimorfismos genéticos associados as RAMs relacionadas ao uso de BZN
- Compreender quais vias transcricionais foram alteradas nos pacientes que apresentaram RAMs durante o tratamento com BZN.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional em que foram avaliadas amostras coletadas no projeto **“Centro de Pesquisa em Biomarcadores em Doenças Negligenciadas Tropicais de São Paulo/Minas Gerais”** (CAAE00580612.8.0000.0065). Nele, pacientes com doença de Chagas, com indicação de tratamento etiológico, conforme recomendação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas (87), foram acompanhados e tratados com BZN. Após término do projeto as amostras foram catalogadas e arquivadas no Biobanco do Instituto de Medicina Tropical de SP.

Pacientes com DC, indicativos de tratamento com BZN e em acompanhamento ambulatorial no Hospital Emilio Ribas e Hospital das Clinicas tiveram suas visitas supervisionadas pelos médicos assistentes responsáveis, respectivamente por cada ambulatório, Dr. Carlos Henrique Valente Moreira ou Dra. Noêmia Barbosa Carvalho. O projeto acompanhou prospectivamente uma coorte de 102 pacientes em diversos momentos de visitas periódicas com coletas de dados e amostras de sangue total. Para este projeto foram usados os dados de questionários, prontuários e amostras dos pacientes antes do início do tratamento com BZN (T0), durante (T15) e no término do tratamento (T60).

Para as análises genômicas, o material biológico, sangue total, foi coletado em tubos EDTA. Uma vez que os polimorfismos genéticos estudados são de caráter constitucional do genoma do indivíduo, o material utilizado para as análises poderia ser coletado a qualquer momento. Para as análises transcriptômicas foram avaliadas amostras de sangue total, dos tempos T0 e T60, coletadas em tubos PAX gene blood RNA.

O tratamento realizado com BZN foi na dose de 5mg/Kg/dia, com duas administrações diárias nesta concentração, durante 60 dias. O grupo denominado controle (gNRAM) foi aquele que recebeu BZN nesta posologia e ao término do tratamento não apresentou qualquer RAM. No grupo gRAM, houve a administração da droga, na mesma posologia, entretanto os pacientes apresentaram obrigatoriamente pelo menos um evento adverso, dos mencionados abaixo:

- Dermatite alérgica (alterações cutâneas, sejam sintomas de prurido ou erupções)
- Supressão da função da medula óssea, incluindo leucopenia, granulocitopenia e / ou trombocitopenia (avaliado a partir de resultados de hemograma completo).
- Disfunção hepática ou renal por análises químicas sanguíneas (elevação de transaminases acima do limite superior da normalidade - LSN, assim como nível de creatinina acima de 1,5x o LSN)
- Intolerância gástrica (presença de dispepsia, náuseas, eructações, diarreia, constipação).
- Perda do paladar (hipogeusia, ageusia ou disgeusia)
- Neuropatia periférica (quaisquer alterações em sensibilidade térmica, dolorosa ou tátil).

O tratamento foi interrompido a critério da equipe medica, especialmente em vigência de sintomas graves, tais como:

- Perda do paladar
- Leucopenia (< 2500) ou purpura trombocitopenica ou agranulocitose
- Neuropatia periférica
- Dermopatia grave e / ou dermatite associada com febre e linfadenopatia e / ou Síndrome Steven-Johnson
- Disfunção hepática ou renal

4.2 População estudada

Pacientes que participaram do projeto “**Centro de Pesquisa em Biomarcadores em Doenças Negligenciadas Tropicais de São Paulo/Minas Gerais (CAAE00580612.8.0000.0065)**”, que doaram amostras de sangue total ao Biobanco do IMT, e que estão dentro dos parâmetros supramencionados.

4.2.1 Critérios de exclusão

Os pacientes foram excluídos do estudo mediante aos seguintes critérios:

- Pacientes com uso prévio de BZN.
- Pacientes com miocardiopatia avançada, consistentes com insuficiência cardíaca classe funcional IV ou insuficiência cardíaca descompensada.
- Grávidas ou mulheres amamentando.
- Disfunção hepática ou renal (elevação de transaminases acima do limite superior da normalidade - LSN, assim como nível de creatinina acima de 1,5x o LSN).
- Abuso de álcool e drogas (conforme critérios do DSM-V e CID-10) (88).
- Megaesôfago e megacolon avançado (diagnosticados mediante esofagograma baritado com classificação de Rezende III ou IV ou evidenciado em enema opaco conforme classificação de Ximenes) (89).

4.3 Análises genômicas

4.3.1 Protocolo de coleta e armazenamento de amostras

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas diretamente em tubo BD Vacutainer® tratado com EDTA K2, substância anticoagulante, e armazenadas em refrigerador, de 0 a 8 graus Celsius por até 3 horas. No próprio tubo em que foram coletadas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 G. Foi possível verificar visualmente a separação de 3 fases, fase plasmática, fase intermediária com o “creme leucocitário”, onde encontramos as células nucleadas e fase rica em hemácias, conforme a figura 2 abaixo:

Figura 4 - Sangue após centrifugação: Nesta figura vemos as 3 fases do sangue, plasma, leucócitos e plaquetas e eritrócitos, após sua centrifugação. Imagem extraída de JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004 (90).

Cada uma das fases foi coletada e então armazenada em tubos identificados e próprios para congelamento (0 a -30 graus Celsius). Estas amostras foram cadastradas no sistema do Biobanco, e acondicionadas para estudos futuros ou, caso haja necessidade de uso, para repetições ou futuros experimentos. A fase de creme leucocitário, rica em células nucleadas, foi usada para o protocolo de extração de DNA.

4.3.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído de 200 µl da fase de creme leucocitário utilizando o kit de extração manual QIAamp® DNA Mini, conforme protocolo do fabricante pela técnica de centrifugação. Cada paciente teve o DNA extraído em duplicata, sendo que a primeira alíquota foi utilizada para a realização do ensaio e a segunda alíquota ficou armazenada para repetições, se necessário. O restante

do material extraído e não utilizado foi acondicionado em tubo apropriado e armazenado em freezer (0 a -20° C).

4.3.3 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA extraído das amostras foi realizada por espectrofotometria em equipamento utilizado para quantificação e determinação da pureza de ácidos nucleicos (Nanodrop, E.U.A). A pureza é determinada pela razão 260/280 e 260/230, no qual 260nm é a absorbância dos ácidos nucleicos, 280nm é a absorbância de proteínas, fenol ou outros contaminantes, com absorbância maior ou próxima de 280nm e 230nm é avaliada absorbância de carboidratos, fenol e trizol. Se o resultado destas leituras, 260/280, estivesse dentro da margem de 1.8 a 2.0, e 260/230, estivesse dentro da margem de 2.0 a 2.2, a amostra estava dentro dos padrões de qualidade.

4.3.4 Avaliação da integridade

Para a avaliação da integridade do material, as amostras extraídas foram submetidas a uma corrida de eletroforese em gel de Agarose a 2% em tampão TAE 1X (4,8g/L Tris-base, 1,14mL ácido acético glacial, 2mL EDTA 0,5M, pH 8,0), contendo brometo de etídio (0,5µg/µL). A figura 3 apresenta o resultado de algumas amostras após a realização da corrida, demonstrando integridade das amostras, assim, apropriadas para sequenciamento.

Figura 5 - Gel para avaliação da integridade do DNA das amostras: A imagem demonstra que na análise da corrida eletroforética das amostras não há “arrastes” ou mais de uma banda por poço, demonstrando a integridade do DNA das amostras.

As amostras, que se encontravam dentro dos critérios pré-analíticos supramencionados, foram diluídas para uma concentração final de 10ng/uL em um volume mínimo de 50uL, estando assim, pronta para a próxima etapa.

4.3.5 Axiom™ 2.0 preparação de alvos

4.3.5.1 Amplificação do DNA

As amostras foram homogeneizadas e brevemente centrifugadas, posteriormente diluídas para uma concentração final de 5 ng/μL, 20 μL de gDNA das amostras, bem como, 20 μL do controle positivo da reação, Axiom Reference Genomic DNA 103 (Life Technologies). Elas foram aliquotadas na placa de poço fundo, proveniente do kit Axiom 2.0 Reagent Kit (Life Technologies). Cada uma das 95 amostras e o controle positivo da reação foram alocados nos poços, conforme desenho prévio e planejamento do experimento no sistema GeneTitan Array Plate Registration. Em seguida, a placa foi selada e congelada até a próxima etapa.

A placa, contendo amostras e controle positivo, ficou em temperatura ambiente. Em um tubo foi preparado o Master Mix de Denaturação conforme especificação do protocolo, Axiom 2.0 Denat Soln 10x e Axiom Water. A mistura foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente. A placa foi centrifugada rapidamente para que todas as amostras se depositassem no fundo dos poços, no momento da adição dos 20 µL por poço do Mix de Denaturação. Posteriormente foi selada, homogeneizada e centrifugada. O tempo total de incubação à temperatura ambiente foi de 10 minutos. Posteriormente foi adicionado a cada poço 130 µL do reagente Axiom 2.0 Neutral Soln para neutralização da reação. O Master Mix de Amplificação foi preparado mediante a combinação dos reagentes Axiom 2.0 Amp Soln e Axiom 2.0 Amp Enzyme. Duzentos e trinta (230) µL desta mistura foi adicionado lentamente à parede de cada poço da placa que depois foi selada, homogeneizada e inserida no forno de amplificação, previamente ligado à temperatura de 37°C. A placa permaneceu por no mínimo 24 horas sem perturbações no forno. Ao término deste período a placa foi armazenada a -20°C ou seguiu para a próxima etapa.

4.3.5.2 Fragmentação e precipitação

A placa nesta etapa estava à temperatura ambiente, e então foi inserida no forno de amplificação, previamente estabilizado a 65°C, e incubada por 20 minutos para assim parar em definitivo a reação de amplificação iniciada na etapa anterior. Ao término desta incubação a placa foi alocada em outro forno de amplificação, previamente estabilizado a 37°C, onde permaneceu por 45 minutos. Durante esta segunda incubação foi preparado o reagente para a etapa de fragmentação pela combinação do Axiom 10X Frag Buffer, Axiom Frag Diluent, Axiom Frag Enzyme, mistura esta que pronta foi deixada em gelo até o término da etapa de incubação a 37°. Inserimos em cada poço da placa 57 µL do Mix de Fragmentação, preparado anteriormente. A placa retornou selada ao forno de amplificação para uma nova incubação a 37°C, por 30 minutos. Ao término da etapa anterior a placa foi retirada do forno e colocada à temperatura ambiente. Foi então adicionado a cada poço da placa 19 µL da Stop Solution.

Pela combinação do Axiom Precip Soln 1 e o Axiom Precip Soln 2, geramos o Master Mix de precipitação. Duzentos e quarenta (240) μL deste mix foram adicionados à parede cada um dos poços da placa, que foi selada, homogeneizada e rapidamente centrifugada. Removemos o selante da placa e adicionamos 600 μL de Isopropanol em cada poço. Foram feitas no mínimo 7 homogenizações por poço com a própria pipeta. Ao término desta etapa, a placa foi selada e acondicionada em freezer à -20°C *overnight*, período de 16 a 24 horas.

4.3.5.3 Secagem e ressuspensão

A placa foi removida do freezer a -20°C e centrifugada a 4°C por 40 minutos a 400 G, para remoção do líquido. Após a remoção do selante, a placa foi invertida (5 minutos), sobre uma camada de gases na bancada, para que ocorresse um descarte do sobrenadante remanescente. Finalmente inserida no forno de amplificação, previamente estabilizado a 37°C , por 20 minutos para completar a etapa de secagem.

O selante da placa foi removido e então adicionamos a cada um dos poços 35 μL do Axiom Resusp Buffer. A placa foi selada novamente e posicionada no agitador Tiler Plate Shakers (Thermo Fischer Scientific) na velocidade 9 por 10 minutos, posteriormente centrifugada brevemente. As amostras foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, seguindo a mesma orientação da placa anterior. O Master Mix de Hibridização foi preparado pela combinação dos reagentes Axiom Hyb Buffer, Axiom Hyb Soln 1 e Axiom Hyb Soln 2. Desta mistura adicionamos 80 μL por poço da placa com as amostras anteriormente alocadas, denominada agora de placa de hibridização, que foi selada, homogeneizada e rapidamente centrifugada.

4.3.5.4 Desnaturação e Hibridização

A placa de hibridização da etapa anterior foi submetida ao protocolo de desnaturação no termociclador ABI 9700 (Life Technologies); 95° C por 10 minutos e 48° C até o momento da coleta da placa. Ao coletar a placa de hibridização, esta foi acoplada ao bloco térmico que manterá a temperatura da placa a 48° C. O conteúdo da placa foi totalmente transferido para uma nova placa denominada Hyb tray do kit Axiom Array GeneTitan Consumables kit, evitando-se ao máximo a inserção de bolhas neste processo. A placa de “arrays”, que estava previamente à temperatura ambiente, foi acoplada a Hyb tray e ambas inseridas no equipamento GeneTitan MC (Life Technologies). Esta reação de hibridização demorou aproximadamente 24 horas. Quando estivesse faltando aproximadamente 1h 30 min para o término da reação, iniciou-se a próxima etapa.

4.3.5.5 Preparação manual das placas para o equipamento GeneTitan MC

Seguindo o protocolo do fabricante, Axiom TM 2.0 (91), nesta etapa os reagentes foram descongelados para o preparo manual, todos os reagentes menos a enzima. Após processamento estes foram armazenados (-20°C para a enzima e em banho de gelo para os demais) até sua utilização.

Baseando-se na descrição do protocolo foram preparados os seguintes reagentes: Stain 1 Master Mix, Stain 2 Master Mix, Stabilization Master Mix e Ligation Master Mix. Todos estavam acondicionados em gelo e ao abrigo da luz. Foi adicionado 105 µL dos reagentes citados acima respectivamente na placa, evitando-se ao máximo a presença de bolhas e a exposição da placa à luz. Ao término desta etapa foi adicionado 150 µL do Axiom Hold Buffer a cada poço da placa, que foi selada. Nesta etapa a placa encontra-se pronta para o processamento no GeneTitan.

4.3.5.6 Processamento das amostras pelo equipamento GeneTitan

Após a criação e planejamento da corrida no software AGCC (91), foi registrado cada escaneamento de placa e reagentes utilizados no GeneTitan. O equipamento foi abastecido com os reagentes Axiom Wash Buffer A, Axiom Wash Buffer B e a Axiom Water, todos previamente à temperatura ambiente. As placas preparadas em todas as etapas posteriores foram acondicionadas, sem selante, dentro de gavetas específicas para cada uma delas, dentro do equipamento. Após a confirmação e checagem dos insumos iniciamos as reações de hibridização. Depois o GeneTitan seguiu para as etapas de ligação, lavagem e marcação para posterior leitura das amostras.

4.3.6 Métodos de análise de dados

4.3.6.1 Axiom Suite Analysis

Os dados genômicos finais foram coletados do GeneTitan e exportados para o software Axiom Suite Analysis (Affymetrix), que realizou as análises iniciais dos dados brutos utilizando o algoritmo BRLMM-P. O primeiro passo deste programa foi normalizar a intensidade da sonda e estimar o sinal do alelo para cada SNP do experimento. As estimativas dos sinais foram então transformadas em dados de espaço bidimensional em que os agrupamentos dos genótipos foram distribuídos pelas variâncias semelhantes para cada um dos "clusters" formados. Como o descritor primário do genótipo é a dimensão "contraste", a dimensão "tamanho" é descartada. Na resultante espacial de 1 dimensão, para cada SNP, foi avaliada a probabilidade de todas as divisões plausíveis dos dados observados em três (ou menos) sementes genotípicas usando um modelo de probabilidade Gaussiana combinada às informações prévias encontradas. Os dados mais altos das divisões de probabilidade das informações em genótipos plausíveis foram mantidos e combinados para formar

uma estimativa final das atribuições. Estes dados foram combinados e formam uma distribuição que resume a melhor estimativa do atual centro de agrupamento dos genótipos e variância para o SNP. Finalmente, um genótipo e uma pontuação de confiança foram atribuídos para cada observação de acordo com a distância relativa para os centros do “cluster”.

Estes processos iniciais foram de grande importância para as análises seguintes, uma vez que para métricas de qualidade e eficiência do experimento do total de 842007 SNPs avaliados 7,8% (65826/842007) são “probes” distintas, mas que em duplicidade avaliam o mesmo SNP. Uma das atribuições do algoritmo BRLMM-P é a de excluir um destes resultados, para que somente uma análise do mesmo SNP seja avaliada nas etapas seguintes. Ao término destes processos os dados foram exportados no formato ped. e map.

4.3.6.2 Uso da plataforma “R” e PLINK para a análise estatística de dados

Sendo o objetivo destas análises a descrição de SNPs diferencialmente expressos entre casos (gRAM) e controles (gNRAM), inicialmente foi realizada a filtragem dos SNPs que apresentaram o mesmo resultado entre os grupos estudados. Realizamos estas filtrações baseando-se no princípio matemático de entropia condicional, aplicado nas amostras pelo pacote “infotheo” no programa “R”.

Para pesquisar regiões candidatas fizemos análises de associação entre os grupos para os locos de SNPs. A estratégia é encontrar janelas de dependência entre os SNPs e nelas realizar análises de associação comparando os grupos de casos e controles. Estas análises em geral consideram pares de SNPs adjacentes para cobrir todo o genoma e usam testes de associação, conhecidos como testes de desequilíbrio de ligação (r^2) (92,93), classificados de 0,2 a 1. O PLINK (94), disponível no site www.pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink, é uma das ferramentas mais comuns para este tipo de abordagem e foi utilizada para estas etapas.

A limpeza dos genótipos de SNPs foi realizada com base em alguns modelos de genética populacional que resultam na filtragem e remoção dos SNPs cuja frequência não segue tais preceitos de controle de qualidade. Um deles é o equilíbrio de Hardy-Weinberg, cujo limite estabelecido foi de 5%. Em seguida, foram retirados os SNPs cuja frequência alélica (MAF, do inglês, *Minor Allele Frequency*) foi inferior a 1%. Também foram retirados os SNPs com dados faltantes em mais que 5% das amostras, ou, indivíduos com mais de 5% dos dados de SNPs faltantes. Todas estas precauções fazem parte do controle de qualidade dos dados.

Para a análise estatística foi usado o teste de Fisher através do programa PLINK. Esta metodologia tem boa aplicabilidade para projetos como este, uma vez que ele é capaz de determinar o valor de P com exatidão, mesmo diante de baixos números amostrais, ao invés de confiar em aproximação de valores, como outras funções estatísticas de análise (95,96). Além disso, na plataforma PLINK foi possível avaliar nas amostras, antes da imputação, modelos de análise de associação alélica, dominante e recessiva comparando os grupos gRAM e gNRAM.

Imputação de genótipos é a predição de marcadores genotípicos faltantes, desconhecidos ou que não foram avaliados por características metodológicas do experimento, em amostras de indivíduos de uma população estudada. A imputação pode ser utilizada para aumentar o número de SNPs que podem ser observados nos estudos de observação genômica (97). Assim, para uma exploração mais completa de SNPs que não foram observados no experimento, GeneTitan, foi realizada a imputação dos dados genômicos na plataforma do *Michigan Imputation Server* (<https://imputationserver.sph.umich.edu/>). Para isso os dados foram convertidos em VCF pelo PLINK e separados por cromossomo e enviados para este servidor. O mapeamento genômico foi realizado utilizando a referência humana GRCh37/hg19. No PLINK estes dados, separados por cromossomos, são convertidos em um único e robusto arquivo para as análises finais de associação alélica entre os grupos gRAM e gNRAM. Foi utilizado o site <http://db.systemsbiology.net/kaviar/cgi-pub/Kaviar.pl> para a conversão dos SNPs, que encontravam-se com as coordenadas genômicas, na codificação rs.

4.4 Análises de transcriptoma

4.4.1 Coleta, extração e quantificação do RNA

As amostras para avaliação de transcriptoma foram coletadas em tubos PAX gene blood RNA, para a preservação da integridade do RNA das amostras, e armazenadas a -80° Celsius. O isolamento de RNA total foi automatizado e realizado pela plataforma QIAasympy (Qiagen) utilizando o kit PAXgene blood RNA do mesmo fabricante. Realizada esta etapa as amostras foram quantificadas inicialmente por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop (Life Technologies) para posteriormente terem sua integridade avaliada utilizando o equipamento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) com o kit Nanochip 6000. No **Anexo I**, são apresentados todos os resultados da análise de integridade das amostras obtidos pelo Bioanalyzer 2100.

4.4.2 Preparo das bibliotecas

4.4.2.1 Obtenção do cDNA

O cDNA é sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro pelo processo de transcrição reversa, seguindo o protocolo do fabricante. Para isso foi utilizado o termociclador 9700 (Life Technologies) mediado pela enzima SuperScript® III e o mix VILO™ RT (Life Technologies). O RNA foi armazenado a -80°C e o cDNA a 4°C, se em até 24 horas a amostra seguir para o preparo de biblioteca, ou -20°C, para períodos maiores que 24 horas até o momento de uso para a etapa seguinte.

4.4.2.2 Amplificação das sequencias alvo

Nesta etapa foi utilizado o kit Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression (Life Technologies). Seguindo o protocolo do fabricante, foi preparado um mix, com o painel de primers AmpliSeq Transcriptome Human

Gene Expression Core Panel em combinação com a Ampliseq HiFi Mix, juntamente com o cDNA no termociclador 9700 (Life Technologies).

4.4.2.3 Digestão parcial dos primers

A digestão dos primers, em excesso e não utilizados na reação anterior, se deu com a adição direta de 2uL do reagente Fupa (Ion AmpliSeq Library kit 2.0, Life Technologies) em cada amostra e posterior ciclagem no termociclador 9700 (Life Technologies).

4.4.2.4 Ligação com *Barcodes*

Nesta fase o material resultante de etapa anterior recebeu a adição de sequências nucleotídicas conhecidas, identificadas como adaptador P1 e o *barcode* (Ion Xpress™, Life Technologies), selecionado especificamente para cada amostra. Estes, se ligara em cada uma de suas extremidades das amostras, tal ligação garante a identidade de cada amostra quando forem agrupadas em *pool* para a etapa de PCR em emulsão. Os *barcodes* ainda permitem rastrear as fontes potenciais de contaminação do material sequenciado, evitando a interpretação falsa ou errônea do material sequenciado. Segundo protocolo do fabricante, para cada *barcode* X escolhido, foi preparado uma mistura de Ion Adaptador P1 e *barcode* X a uma diluição final de 1:4. Esta mistura, mediada pela enzima DNA Ligase e a *Switch Solution* (Ion AmpliSeq Library kit 2.0, Life Technologies) no termociclador 9700 (Life Technologies), resultou na ligação do adaptador P1 e do *barcode* às amostras.

4.4.2.5 Isolamento da biblioteca não amplificada

Os amplicons gerados, no passo anterior foram purificados com 45uL do reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter). A solução de biblioteca resultante foi transferida para um tubo Lobind (Eppendorf®), já contendo Agencourt® AMPure® XP. Em uma *rack* magnético (DynaMag™), as amostras foram incubadas e lavadas em etanol 70% duas vezes. Por fim, as amostras

foram eluídas em tampão (Low TE) em volume final de 50uL, etapas estas todas especificadas segundo protocolo padronizado pela Life Technologies.

4.4.2.6 Quantificação e diluição da biblioteca utilizando o RT-PCR

Para esta etapa uma alíquota do material purificado da etapa anterior foi inicialmente submetida a uma diluição seriada de 1:1000. As bibliotecas foram então adicionadas, em duplicata, à placa de leitura óptica, já contendo a mistura de reagentes para a quantificação do kit Ion Library TaqMan™ Quantification (Life Technologies). Como referência foi utilizada uma curva em 5 pontos, em duplicata, de E. Coli DH10B (Ion Control Library), proveniente do mesmo kit, submetida a uma diluição seriada de 1:10, conforme protocolo do fabricante. Ainda foi utilizado como controle negativo da reação dois poços contendo os reagentes de quantificação e a água. Após a reação de RT-PCR (do inglês Real Time PCR), as bibliotecas foram calculadas e diluídas para que fiquem em uma concentração final de 100 pM.

4.4.2.7 Preparo do template/PCR em emulsão e enriquecimento

Foi realizado o *pool* de amostras, que nada mais é do que a adição de volumes iguais de até nove bibliotecas diferentes, depois de estarem diluídas em equimolaridade na concentração de 100 pM. Neste momento, é importante a diluição correta das amostras para garantir a proporção de fragmentos amplificados e esferas. O *pool* de amostras foi adicionado ao filtro de reação juntamente com os outros reagentes do kit Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 (Life Technologies) e este filtro carregado foi então acoplado ao equipamento Ion Touch 2 (Life Technologies) para a realização do PCR em emulsão. Ao término desta reação, as amostras foram coletadas, e juntamente com os reagentes dos kits Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 e Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (Life Technologies) foi então realizada a reação de enriquecimento, que seria a separação das esferas contendo o material amplificado das esferas vazias no sistema Ion Touch 2 ES (Life Technologies).

4.4.3 Reação de Sequenciamento do Ion Torrent Proton

4.4.3.1 Preparo das amostras

O reagente Ion PI™ Control Ion Sphere™ foi adicionado diretamente ao material após a realização da reação de enriquecimento. Foi adicionado também ao material, 15 µL of Ion PI™ Annealing Buffer e 20 µL of Ion PI™ Primers de sequenciamento para posterior ciclagem em termociclador 9700 (Life Technologies) em programa recomendado pelo fabricante. Ao fim da ciclagem, foi adicionado 10 µL of Ion PI™ Loading Buffer. As amostras foram vortexadas rapidamente e centrifugadas, encontrando-se prontas para o carregamento no chip de sequenciamento.

4.4.3.2 Carregamento do chip

Todo o volume do material (~ 55 µL) foi coletado e dispensado no poço do chip com posterior centrifugação por 10 minutos para acomodação apropriada das esferas carregadas com amostras nos poços do chip. Sequencialmente foi injetado no chip, uma combinação da solução de Annealing Buffer e Foaming Solution (10% Triton® X-100), oriundas do kit Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 (Life Technologies), com subsequente lavagem com o tampão de anelamento a 50%, este processo se repetiu mais uma vez. Posteriormente o chip recebeu duas lavagens com 100 µL da solução de *flushing* e três lavagens com 100 µL do tampão de anelamento a 50%, ambas introduzidas na porta de carregamento do chip, com grande cautela para que não seja introduzida nenhuma bolha de ar, o que poderia atrapalhar na performance do sequenciamento. Foram combinados 6 µL de Ion PI™ Sequencing Polymerase v3 com 60 µL do tampão de anelamento a 50%. Dessa solução, foram injetados 65 µL na porta de carregamento do chip, removendo o líquido expelido na porta oposta à de carregamento e tomando cuidado para que não ocorra a formação de bolhas de ar. O chip foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente inserido no sequenciador. Um total de até nove amostras foram sequenciadas por chip (Ion Proton PI), assegurando assim, a profundidade necessária (próximo a 2 milhões de leituras) para garantir maior confiabilidade aos resultados.

4.4.4 Análise dos dados transcriptômicos

4.4.4.1 Bioinformática e análise estatística

Foram utilizados filtros de qualidade padrão do sistema do sequenciador (<http://ioncommunity.iontorrent.com/docs/DOC-3054>). Além disso, foram utilizados os controles de qualidade ERCC (External RNA Controls Consortium, <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4456740>) para validar os níveis de expressão em relação aos valores esperados para esses controles externos. A análise de bibliotecas Ion AmpliSeq™ transcriptoma foi realizada em duas etapas:

a) Alinhamento da sequência obtida, com a sequência de referência g19_AmpliSeq_Transcriptome_ERCC_v1.fasta, utilizando-se o mapeador TMAP do sistema.

b) Estimativa da abundância dos transcritos através do ampliSeqRNA (<http://ioncommunity.iontorrent.com/docs/DOC-8965>).

No relatório do sequenciamento da plataforma Ion Proton, figura 6, foram verificados todos os resultados brutos e as métricas iniciais das etapas descritas acima. Além disso, observamos a liberação dos dados finais do chip sequenciado, e o número de *reads* por amostra, que, se inferior a $2 \cdot 10^6$, indica necessidade de ressequenciamento da amostra. Os dados finais estavam no formato “Compressed Files” disponível na ferramenta “FileExporter”, um dos *Plugins* utilizados na etapa de planejamento de corrida. Destes, foram obtidas todas as informações das amostras sequenciadas no chip, para futura importação no programa R e análise de expressão diferencial, filtragem e normalizações.

Run Summary

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	454,516,959	393,309,568	3,730,590	122 bp
IonXpress_033	105-60	1,568,526,057	1,439,219,253	14,021,182	112 bp
IonXpress_037	96-0	1,273,470,891	1,153,532,080	10,868,111	117 bp
IonXpress_038	84-0	810,164,372	737,387,699	6,744,195	120 bp
IonXpress_039	85-0	1,797,065,863	1,628,768,043	14,947,436	120 bp
IonXpress_040	105-0	1,335,906,229	1,210,276,832	11,497,105	116 bp

Figura 6 - Relatório de sequenciamento plataforma Ion Proton. Relatório padrão de sequenciamento emitido pelo sequenciador Ion Proton ao término da corrida onde observamos os resultados brutos do chip sequenciado. Na coluna *reads*, amostras com menos de 2.10^6 *reads* demonstram baixa eficiência de sequenciamento e necessidade repetição.

Com a coletânea de todas as 15 corridas de sequenciamento iniciaram-se as etapas de organização, identificação das amostras, análise estatística e

elaboração dos *Vulcano Plots* no programa R (<https://www.r-project.org>). Foi utilizado algoritmo edgeR (<http://bioconductor.org/packages/edgeR/>), onde foi possível realizar análises de perfil de expressão diferencial RNA-seq. Este pacote implementa uma série de metodologias estatísticas baseadas nas distribuições binomiais negativas, incluindo a estimativa empírica de Bayes, testes exatos e modelos lineares generalizados. Este pacote é bem citado na literatura devido a sua ampla capacidade de análise com dados de RNA-seq e também para análise diferencial de sinais de outros tipos de dados genômicos que produzem contagens, incluindo ChIP-seq, bissulfito-seq, SAGE e CAGE (98,99).

Com as ferramentas disponíveis no pacote edgeR, e outros pacotes padrões do R, foi desenvolvido um *script* de análise denominado rodaRNAseq, onde métricas de normalização, filtragem de dados e análise estatística foram aplicadas, figura 7.

```
#=====Funcao Generica - Exact Test =====#
rodaRNAseq <- function(group,counts_limited, name, par1,par2,pmin=0.005,fold_change=1.25){
  yoriginal <- DGEList(counts=counts_limited,group=group)

  #Filtrando
  yFiltrado = yoriginal
  keep <- rowSums(cpm(yFiltrado)>2) >= 2
  yFiltrado <- yFiltrado[keep, , keep.lib.sizes=FALSE]
  design <- model.matrix(~group)
  yFiltrado <- estimatedDisp(yFiltrado,design)
  etFiltrado <- exactTest(yFiltrado, pair=c(par1,par2))
  print(summary(de <- decideTestsDE(etFiltrado,p.value=pmin)))
  topTags(etFiltrado, sort.by = 'logFC')
  filtrOrder=etFiltrado$table
  ordenado = filtrOrder[order(filtrOrder$logFC),]
  ordenado <- cbind("Gene" = rownames(ordenado), ordenado)
  rownames(ordenado) <- NULL
  write.table(ordenado,file=paste(name,".filtrado.xls",sep=""),dec="," ,sep = "\t",row.names = F)
  png(paste(name,"png",sep="."),height = 540,width = 1080)
  print(plot_deseq2(ordenado,par1,par2,pvalueMin=pmin,minFoldchange=fold_change))
  dev.off()
  return(ordenado)
}

plot_deseq2 = function(data,par1,par2, pvalueMin=0.005, minFoldchange=1.25){
  data$cor_diff = ifelse(data$logFC < -minFoldchange & data$pvalue < pvalueMin,
    yes = "<",ifelse(data$logFC > minFoldchange & data$pvalue < pvalueMin, yes = ">",no = NA))
  simple <- ggplot(data, aes(x = logFC, y = -log10(pvalue))) +
    geom_point(size = 3, alpha = 0.7, na.rm = T,aes(colour=cor_diff)) + # Make dots bigger
    theme_bw(base_size = 16) + # change theme
    ggtitle(label = paste(par1,"X",par2), subtitle = paste("p.value <",pvalueMin,"; FC>[",minFoldchange,"]"))
  xlab(expression(log[2](paste(par1,"/",par2)))) + # x-axis label
  ylab(expression(-log[10]("p-value"))) + # y-axis label
  geom_vline(xintercept = c(-minFoldchange,minFoldchange), colour = "darkgrey") + # Add cutoffs
  geom_hline(yintercept = -log10(pvalueMin), colour = "darkgrey") + # Add cutoffs
  geom_vline(xintercept = 0, colour = "black") + # Add 0 lines
  scale_x_continuous(limits = c(-18, 18)) # min/max of lfc
  simple + guides(fill=guide_legend(title="New Legend Title"))
  #diff$pvalue=log10(diff$pvalue)
  # Plot figure
  return(simple)
}

print(plot_deseq2(diff,par1,par2))
```

Figura 7 - Script de análise transcriptômica. Scripts do pacote EdgeR, e outros mais comuns do R, elaborados para as análises de expressão diferencial, normalização e filtragem dos dados e geração das figuras de Vulcano plot.

O resultado destes processos gerou 2 tabelas. A tabela inventário contempla a contagem de cada gene por amostra com a normalização entre amostras e entre corridas e a tabela expressão diferencial, onde temos uma comparação entre 2 grupos, em modelo de avaliação transcriptômica longitudinal, ou seja, interpretação da mesma resposta ao tratamento, mas em tempos diferentes. Este segundo modelo de tabela, ao ser exportada, contemplou as informações de aumento ou diminuição de expressão gênica pelo log de *Fold Change* (logFC), seu poder estatístico pelo valor de P Value e o log de Counts per Million (logCPM) para os genes filtrados e normalizados. Juntamente com esta segunda tabela o *script* de análise proposto ainda montou um gráfico de pontos, bem caracterizado na literatura para a apresentação de resultados de aumento ou diminuição de expressão gênica em transcriptoma, chamado de *Vulcano Plot*. Neste gráfico pode-se ver que os pontos são plotados em cinza, mas caso o gene apresente logFC acima ou abaixo de 1,25 e P Value abaixo de 0,05, será plotado de vermelho ou azul, representando os genes com alteração significativa no padrão de expressão, figura 8.

Figura 8 - *Vulcano Plot*. Esquema de representação gráfica dos dados de expressão gênica em RNAseq, onde observamos que genes considerados significativos, com P Value abaixo de 0,05 e logFC acima de 1,25 ou abaixo de -1,25, representando diferença de expressão mínima de 25%, recebem a coloração vermelha, para *downregulated*, e azul, para *upregulated*, caso contrário o gene recebe coloração cinza, não significativo.

Os dados gerados pelas tabelas de expressão diferencial foram filtrados pelos os genes que apresentam logFC igual ou acima de 1,25 e inferior ou abaixo de -1,25, representando aumento ou diminuição de expressão gênica mínimo de 25%, assim como o P Value abaixo de 0,05, para que os genes fossem considerados significativos. Estas novas tabelas foram carregadas no programa *Ingenuity® Pathway Analysis, IPA*, (Qiagen, Alemanha) para então avaliação de possíveis vias de sinalização.

Para a busca de um modelo preditivo de RAM ao BZN alguns dados foram alimentados no site <http://www.metaboanalyst.ca> para avaliação diferenciada de modelos de análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados epidemiológicos

Dos 102 pacientes acompanhados pelo projeto, 10 amostras apresentaram-se fora dos padrões pré-analíticos e foram excluídas, 92 chegaram até as etapas finais das análises genômicas. Sendo destes, 55 homens (59,8%) e 37 mulheres (40,2%) com idade média de 52,3 anos. Destes, 42 apresentavam a forma clínica indeterminada (45,6%), 20 a forma cardíaca (21,8%), 11 a forma digestiva (11,9%) e 19 a forma mista (20,7%).

Dos 92 pacientes, 29 pertencem ao grupo gNRAM (31,5%), sendo 20 homens (69%) e 9 mulheres (31%) com idade média de 53,1 anos. Sendo 10 pacientes com a forma clínica indeterminada (34,5%), 11 com a cardíaca (37,9%), 3 com a digestiva (10,3%) e 5 com a mista (17,3%). No grupo gRAM foram incluídos 63 pacientes (68,5%), com 35 homens (55,5%) e 28 mulheres (44,5%) com idade média de 51,9 anos; 32 destes indivíduos apresentavam a forma clínica indeterminada (50,8%), 9 a cardíaca (14,3%), 8 a digestiva (12,7%) e 14 a mista (22,2%).

Clinicamente, destes 92 pacientes, 6 deles (6,5%) apresentaram RAM severas e precisaram interromper o tratamento com BZN. Dos 86 pacientes que completaram o tratamento 57 apresentaram uma ou mais RAMs (65,5%). Destes 57 indivíduos 36 apresentam manifestações cutâneas (63,1%), 23 gastrointestinais (40,3%), 21 neurológicas (36,8%) e 4 hematológicas (4,3%). A maior parte das RAMs, 78,9% (45/57) ocorreram nos primeiros 15 dias de tratamento com BZN. Na visita clínica dos pacientes 30 dias após o iniciar a medicação com BZN 40,3% deles (23/57) manifestaram ao menos uma RAM, sendo destas 60,9% dermatológicas (14/23). No acompanhamento clínico de 60 dias após início do tratamento 47,3% dos pacientes relataram ao menos uma RAM (27/57), sendo que 48,1% foram do tipo neurológica (13/27). As manifestações clínicas que acometeram os pacientes gRAM desapareceram após a interrupção, nos casos severos, ou término do tratamento com BZN.

5.2 Resultados genômicos

Uma análise previa do genoma dos 92 pacientes demonstrou, por PCA, que havia um grau de parentesco entre 2 pacientes, desta maneira, estes foram removidos para não prejudicar as análises futuras. Dos 842007 SNPs estudados no experimento, removemos pelo PLINK os responsáveis pelas métricas de qualidade durante as leituras no equipamento GeneTitan, sem propósito para as próximas etapas de análise, resultando em 30316 variantes removidas e 811691 remanescentes para as análises.

5.2.1 Perfil de ancestralidade da população estudada

Para melhor entendimento das características de ancestralidade populacionais dos indivíduos estudados agrupou-se os dados filtrados destes 90 pacientes com os dados genômicos e públicos do projeto HapMap 2, com informações de 3 populações bem definidas de 90 indivíduos Europeus (CEU), 90 Africanos (YRI) e 90 Japoneses (JPT) (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/res.shtml>). Do total de 360 indivíduos foram mantidas somente as variantes que ambos apresentavam em comum (811691). Após a junção dos dados, estes foram filtrados no programa PLINK, por *Minor allele frequency* (MAF) de 0,01. Assim, 141200 SNPs foram removidos, resultando em 670491 disponíveis para as próximas análises.

Pela distribuição dos componentes principais plotados na figura 9, pode-se observar em vermelho a população CEU, em cinza JPT, em verde YRI, em preto os pacientes gRAM e em azul os gNRAM. Neste sentido, notou-se que a população deste estudo é predominantemente uma mistura entre raças africanas e europeias, com tendência maior para perfil genômico europeu. Somente 2 indivíduos compartilhavam uma mistura de raças europeias e japonesas.

Figura 9 - Análise do perfil de ancestralidade das amostras. Distribuição dos componentes principais das amostras deste projeto com as do projeto HapMap 2. Em vermelho a população CEU, em cinza JPT, em verde YRI, em preto os pacientes gRAM e em azul os gNRAM.

5.2.2 Imputação dos dados e análise de associação

Realizou-se a imputação dos dados pelo *Michigan Imputation Server* para uma análise genômica que abrangesse os dados de SNPs não avaliados nas análises do GeneTitan. Com estes resultados iniciou-se a avaliação de métricas de qualidade e confiança dos dados. O gráfico Quantil-Quantil (*QQ plot*), figura 10, é bem estabelecido na literatura como uma estratégia para avaliar se há estrutura de população nas amostras em estudo. Os valores de p observados para cada SNP foram plotados em ordem crescente, $-\log_{10}(p)$, contra os valores de p esperados, em uma amostragem de distribuição Qui-quadrada (100). Foi demonstrado na figura 10 que não existiu subestrutura da população para os indivíduos mensurados, uma vez que ficou evidente que as duas distribuições

apresentam alta concordância e que todas as covariantes estão sendo controladas, assim, não havendo inflação genômica dos dados.

Figura 10 - Gráfico de QQ-plot. Os valores de p observados para cada SNP foram plotados em ordem crescente, $-\log_{10}(p)$, contra os valores de p esperados, em uma amostragem de distribuição Qui-quadrada.

O estudo de associação genômica (GWAS), têm como alvo a identificação de regiões cromossômicas que expliquem as diferenças fenotípicas em indivíduos de uma população, neste caso comparando amostras do grupo de casos (gRAM) com controles (gNRAM). Via PLINK realizou-se a análise do modelo de associação alélica para o resultado de cada cromossomo, isoladamente. Estes resultados foram agregados em um grande arquivo único onde SNPs com valor faltante de P Value foram excluídos. A resultante das análises dos SNPs imputados e lidos no GeneTitan gerou uma tabela ordenada de forma decrescente pelo P Value de cada SNP. Os que apresentam P Value

inferior a 10^{-6} , foram classificados indicativos de significância (101). Na tabela 1, encontram-se os valores para os 50 SNPs com menor P Value.

Tabela 1- Demonstração dos 50 SNPs com menor P Value após imputação dos dados genômicos.

SNP	CHR	Position	A1	A2	P
rs1518601	16	80288258	A	G	5.652e-08
rs11861761	16	80288963	A	G	5.652e-08
rs34091595	16	80289643	T	C	5.652e-08
rs3968927	3	69183404	T	C	2.945e-07
rs6819334	4	165528432	C	T	3.443e-07
rs62255473	3	69182711	C	T	6.191e-07
rs1995665	3	69183140	C	A	6.191e-07
rs3097439	15	27871229	G	T	6.896e-07
rs3098545	15	27871414	A	C	6.896e-07
rs3097436	15	27872152	T	G	6.896e-07
rs3097435	15	27872235	T	C	6.896e-07
rs3098548	15	27873614	A	G	6.896e-07
rs3097434	15	27873755	T	A	6.896e-07
rs3098549	15	27874094	A	G	6.896e-07
rs6026692	20	57661598	A	C	6.896e-07
rs7563279	2	229499707	G	A	6.915e-07
rs7610262	3	69169466	C	A	8.807e-07
rs9844987	3	69170012	C	T	9.211e-07
rs7963499	12	11917397	T	C	9.211e-07
rs2619732	5	153877722	G	T	1.392e-06

rs2612528	4	42721251	T	C	1.441e-06
rs2569913	2	195964436	C	T	1.457e-06
rs7620430	3	69169602	A	G	1.871e-06
rs2872690	3	69171803	C	T	1.949e-06
rs6464597	7	144323969	C	T	2.367e-06
rs1496707	11	91882053	G	A	2.367e-06
rs9931591	16	80283100	G	A	2.948e-06
rs34880994	16	80281336	A	G	3.38e-06
rs11648009	16	80282101	C	G	3.38e-06
rs1435865	2	229480096	A	G	3.573e-06
rs283445	5	153882962	A	T	4.062e-06
rs283446	5	153883392	A	G	4.062e-06
rs60002508	17	53133171	A	G	4.062e-06
rs73323264	17	53141109	T	C	4.062e-06
rs7214765	17	53152348	G	T	4.062e-06
rs28557167	4	106836257	T	C	4.211e-06
rs11640730	16	80284113	A	G	4.341e-06
rs11150253	16	80284557	A	C	4.341e-06
rs11641937	16	80284593	A	G	4.341e-06
rs7208017	17	53181979	A	G	4.488e-06
rs77902570	3	69194090	T	A	4.512e-06
rs35762845	3	89041236	T	A	4.584e-06
rs12485476	3	89048472	C	G	4.584e-06
rs903894	3	89051475	T	C	4.584e-06
rs12491563	3	89060362	G	C	4.584e-06
rs6827505	4	165530069	C	T	4.625e-06
rs4605605	4	165531034	A	G	4.625e-06

rs2141427	4	165532391	T	C	4.625e-06
rs11641106	16	80290713	C	A	4.625e-06
rs2264013	2	195479161	T	C	5.091e-06

Após a comparação de associação entre os grupos gRAM x gNRAM, foi possível explorar as 7 regiões cromossômicas onde foram encontrados os SNPs com menor P Value. Estas regiões foram ampliadas para melhor visualização dos SNPs adjacentes que apresentaram desequilíbrio de ligação (categorizados pelo valor de r^2) e dos possíveis genes onde eles estavam alocados. Na figura 11, encontrou-se o SNP rs1518601 que apresentou menor P Value, $5,65 \times 10^{-8}$, dentre os demais. Ele está localizado entre as posições 79888258-80688258 pb do cromossomo 16, em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e estes localizados nos genes LOC102724084, DYNLRB2, CDYL2 e LINC01227.

Figura 11 - Ampliação de região do cromossomo 16. O SNP rs1518601, com P Value de $5,65 \times 10^{-8}$, encontra-se entre as posições 79888258-80688258 pb

deste cromossomo, em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro e localizados nos genes LOC102724084, DYNLRB2, CDYL2 e LINC01227.

O SNP rs3968927, segundo, em outro cromossomo, que apresentou menor P Value, $2,95 \times 10^{-7}$, está compreendido entre as posições 68783404–69583404 bp do cromossomo 3, na figura 12. Este SNP apresenta-se em desequilíbrio de ligação com diversos outros SNPs adjacentes e estão dispersos em alguns genes como: LMOD3, ARL6IP5, FRMD4B, UBA3, TMF1, MIR3136, EOGT e FAM19A4.

Figura 12 – Ampliação de região do cromossomo 3. O SNP *rs3968927*, com P Value de $2,95 \times 10^{-7}$, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro. Estão dispersos entre as posições 68783404–69583404 pb deste cromossomo e localizados nos genes LMOD3, ARL6IP5, FRMD4B, UBA3, TMF1, MIR3136, EOGT e FAM19A4.

O SNP rs6819334 com P Value de $3,44 \times 10^{-7}$ é localizado entre as posições 165128432–165928432 pb do cromossomo 4, figura 13. Encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs, coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro e dispersos pelos genes MIR5684, MARCH1, LINC011207 e APELA, também em proximidade com TRIM61 e FAM218A.

Figura 13 - Ampliação de região do cromossomo 4. O SNP rs6819334, com P Value de $3,44 \times 10^{-7}$, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro. Estão dispersos entre as posições 165128432–165928432 pb deste cromossomo e localizados nos genes MIR5684, MARCH1, LINC011207 e APELA, também em proximidade com TRIM61 e FAM218A.

Para o cromossomo 2 entre as posições 229099707–229899707 pb encontrou-se o SNP rs7563279 com P Value de $6,91 \times 10^{-7}$, figura 14. Assim como

os demais encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes, coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro, mas somente com um gene próximo da localização dos SNPs, o PID1.

Figura 14 - Ampliação de região do cromossomo 2. O SNP rs7563279, com P Value de $6,91 \times 10^{-7}$, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro. Estão dispersos entre as posições 229099707–229899707 pb deste cromossomo e o gene mais próximo destes SNPs é o PID1.

O SNP rs7963499 com P Value de $9,21 \times 10^{-7}$ está localizado entre as posições 11517397–12317397 pb do cromossomo 12, figura 15. Da mesma forma como os demais encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes, coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro e dispersos pelos genes ETV6, RNU6-19P e com proximidade aos genes LINC01252 e BCL2L14.

Figura 15 - Ampliação de região do cromossomo 12. O SNP rs7963499, com P Value de $9,21 \times 10^{-7}$, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro. Estão dispersos entre as posições 11517397–12317397 pb deste cromossomo e dispersos pelos genes ETV6, RNU6-19P e com proximidade aos genes LINC01252 e BCL2L14.

O SNP rs6026692 com P Value de $6,9 \times 10^{-7}$ é localizado entre as posições 57261598–58061598 pb do cromossomo 20, figura 16. Este encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes, coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro e dispersos pelos genes NELFCD, CTSZ, TUBB1, ATP5E, SLMO2- ATP5E, SLMO2, ZNF831, EDN3, GNAS e em proximidade com os genes STX16-NPEPL1, NPEPL1, MIR296, MIR298 e GNAS-AS1.

Figura 16 - Ampliação de região do cromossomo 20. O SNP rs6026692, com P Value de $6,9 \times 10^{-7}$, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro. Estão dispersos entre as posições 57261598–58061598 pb deste cromossomo e dispersos pelos genes NELFCD, CTSZ, TUBB1, ATP5E, SLMO2-ATP5E, SLMO2, ZNF831, EDN3, GNAS e em proximidade com os genes STX16-NPEPL1, NPEPL1, MIR296, MIR298 e GNAS-AS1.

Para o cromossomo 15 que está localizado entre as posições 27472152–28272152 observou-se o SNP rs3097436 com P Value de $6,9 \times 10^{-7}$, figura 17. Ele encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes, coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro, mas em proximidade com os genes GABRG3 e OCA2.

Figura 17 - Ampliação de região do cromossomo 15. O SNP *rs3097436*, com P Value de $6,9 \times 10^{-7}$, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes e coloridos em vermelho, laranja, amarelo e azul claro. Estão dispersos entre as posições 27472152–28272152 pb deste cromossomo, mas *em proximidade com os genes GABRG3 e OCA2*.

5.3 Resultados Transcriptômicos

Para as análises de transcriptoma e busca de vias de sinalização envolvidas com as manifestações clínicas de RAM, foram utilizadas amostras de 13 pacientes do grupo gNRAM e 26 do grupo gRAM. Para esta etapa foram usados dados das comparações de cada grupo antes do uso do BZN (T0) e ao término deste tratamento (T60), ou seja, T0 gRAM x T60 gRAM e T0 gNRAM x T60 gNRAM.

Na comparação do grupo gNRAM os genes resultantes foram filtrados e, dos 22000 genes observados pelo painel, 27 foram considerados significativos. Destes, 9 representam aumento de expressão e 18 deles diminuição, demonstrados graficamente na figura 18 no modelo de Vulcano plot.

Figura 18 - *Vulcano plot* da comparação de T0 x T60 grupo gNRAM. 27 Genes indicativos de significância, P Value abaixo de 0,05, e com aumento de expressão gênica, logFC acima de 1,25, em azul na figura (9 genes) e diminuição de expressão gênica, logFC abaixo de -1,25, em vermelho na figura (18 genes)

Para a comparação do grupo gRAM, obtivemos 784 genes significativos selecionados. Destes, 2 com diminuição de expressão gênica e 782 com aumento, representados graficamente na figura 19.

Figura 19 - *Vulcano plot* da comparação de T0 x T60 grupo gRAM. 784 Genes indicativos de significância, P Value abaixo de 0,05, e com aumento de expressão gênica, logFC acima de 1,25, em azul na figura (782 genes) e diminuição de expressão gênica, logFC abaixo de -1,25, em vermelho na figura (2 genes)

Para a busca de possíveis vias de sinalização associadas às manifestações clínicas das RAMs, os dados de 784 genes do grupo gRAM e 27 dos gNRAM foram carregados no programa IPA. As vias de sinalização ativadas são independentes e diferentes. Do grupo gNRAM, 11 dos 27 genes, tabela 2, carregados no IPA foram associados com a ativação de 2 vias de sinalização.

Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos em pacientes do grupo gNRAM da comparação T0 x T60, filtrados pelo P Value e logFC e associados a vias de sinalização pelo IPA.

Gene	logFC	P Value
CHAD	-1,41622	0,001336
COL18A1	-1,61027	0,001807

HRK	-1,29777	0,04754
IFI44L	1,856523	0,002944
IFIT1	1,339136	0,017201
N4BP3	-1,43522	0,022686
OAS3	1,472554	0,001609
RSAD2	1,6265	0,018014
SERPING1	1,330768	0,005578
TNFRSF17	-1,37666	0,001339
ZNF365	-3,40626	0,042609

Score é o índice pelo qual o IPA associa a quantidade de genes presentes em uma via de sinalização com dados da literatura que corroboram a relação individual destes genes com doenças e funções bem estabelecidas, assim quanto mais genes associados especificamente a uma doença ou função maior o *score* desta via.

Na tabela 3, a via de *score* 24, constituída de 36 genes, apresenta 10 deles (30,5% da via) com aumento ou diminuição de expressão, quando comparando com T0, tabela 2, estes genes apresentam-se com preenchimento na figura 20 que representa a via.

Tabela 3 - Vias ativadas pelo carregamento dos dados da comparação dos pacientes gNRAM T0 x T60.

Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
AGER, BTK, CHAD , COL18A1 , DDIT4, DDX58, EPHB2, ERK1/2, F11, HRK , HTRA1, ID3, IFI44L , IFIH1, IFIT1 , IFN type 1, IFNG, Interferon alpha, IRF7, JUNB, LBP, NRP1, OAS3 , P38 MAPK, p70 S6k, RSAD2 , SELP, SERPING1 , STAT1, STAT2, TCR,	24	10	Resposta Antimicrobiana, Resposta Inflamatória, Sobrevivência do Organismo

TNF, TNFRSF17, TNFSF13B, ZNF365			
N4BP3, YWHAG	3	1	Morfologia Celular, Sinalização e Interação Célula-a-Célula, Montagem e Organização Celular

Figura 1 (T0xT60 NRAM) FC1,25

© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 20 - Representação da via de sinalização de score 24. Os 10 genes com preenchimento foram dosados e representam aumento de expressão gênica, em vermelho, e diminuição, verde, demonstrando atividade da via para resposta inflamatória, injúria ao organismo e resposta antimicrobiana dos pacientes gNRAM após uso de BZN.

Dos 784 genes, com diferença de expressão significativa do grupo gRAM, o IPA associou 173, deles todos com aumento de expressão, tabela 4, com vias

de sinalização conhecidas. Estes genes estão em negrito na coluna “**Molecules in Network**” da tabela 5 e estão associados com 25 vias de sinalização e relacionados na literatura com múltiplas doenças e funções, citadas na coluna “**Top Diseases and Functions**” da tabela 5. Vale ressaltar que estas vias são diferentes e independentes das descritas para o grupo gNRAM.

Tabela 4 - Pacientes gRAM da comparação T0 x T60, filtrados pelo P Value e logFC e associados a vias de sinalização pelo IPA.

Gene	logFC	P Value
ACTC1	2,45055	0,021523
ADGRA3	1,837984	0,00172
ADRA2A	2,213965	0,005612
ALOX15B	1,63046	0,001612
APCS	2,623452	0,028767
APLP1	1,395323	0,039663
APOA4	2,583216	0,036837
APOB	2,401228	0,038535
ARC	1,818692	0,005489
ARHGEF17	1,364797	0,005939
ASPM	1,631608	0,000936
ASS1	1,359996	0,009166
BHLHA15	1,447433	0,013638
C10orf55	1,785034	0,034693
CACNA1D	2,131394	0,000182
CALML5	1,558004	0,03891
CAMSAP3	1,332978	0,029195
CATSPER1	1,854484	0,038522

Gene	logFC	P Value
KCNJ11	1,565567	0,028871
KIF20A	1,258003	0,008607
KLK3	1,741423	0,002557
KLK5	2,05524	0,034665
KRT10	1,840699	0,01756
KRT14	1,964658	0,016522
KRT16	1,995597	0,039191
KRT6B	2,519766	0,025605
LRRC34	2,448772	0,002658
MAB21L1	1,316935	0,028695
MAFA	1,536789	0,024843
MAP1LC3C	2,416966	0,031011
MARK1	2,319701	0,007639
MC3R	1,773516	0,020588
MCAM	1,832275	0,005964
MFAP4	1,461485	0,003478
MIOX	1,876908	0,005819
MIR31HG	2,608996	0,001883

CCL18	1,57277	0,032925
CCL19	1,740797	0,022269
CCL21	1,539176	0,03734
CCL26	1,886223	0,042051
CCL27	1,597928	0,0195
CCNE1	1,785039	0,000134
CD1B	1,830666	2,49E-05
CDH3	1,844506	0,002509
CH25H	1,412112	0,04542
CHEK1	1,624458	0,027361
CLDN16	1,760372	0,022516
CLDN3	1,494903	0,016497
CLEC4M	2,171416	0,031127
CLSTN2	2,139265	0,034356
CMA1	1,797232	0,026788
CNTFR	1,894085	0,046008
COL4A1	2,291074	0,005858
COMP	1,849264	0,03924
CREB3L1	1,945041	0,012901
CXCL6	1,381453	0,021078
CYP11B1	2,399168	0,005688
CYP24A1	2,597834	0,004537
CYP2B6	1,878145	0,047007
CYR61	2,139308	0,030631
DAB2IP	1,468407	0,0179
DACT3	1,601558	0,04153
DEFA5	1,964974	0,02423

MIR54811	1,440914	0,004891
MIR54812	1,507455	0,006838
MIR54813	1,59069	0,013955
MLC1	1,924571	0,001525
MMD2	2,266528	0,031468
MMRN2	1,650436	0,042361
MOS	1,600695	0,033216
MRC2	1,569296	0,003275
MRGPRX1	1,45416	0,048126
MST1R	1,658162	0,009645
MT3	1,571337	0,007037
MUC5B	1,750745	0,012175
MYH6	1,778377	0,031352
MYRF	1,606156	0,011183
NCR2	2,145459	0,027939
NOG	2,780361	0,00031
NOTCH3	1,563561	0,006884
NOTCH4	2,019469	0,03974
NPPA	1,582863	0,010828
NUPR1	1,783574	0,01851
NXF3	1,480634	0,025508
NYNRIN	1,587131	0,011739
P4HA3	1,670191	0,026239
PACSIN3	1,64087	0,04635
PAEP	1,742416	0,034446
PDGFRA	2,035476	0,044884
PKLR	2,38023	0,009216

DEPDC1	1,661597	0,008962
DHRS2	1,662547	0,045173
DIO3	1,777374	0,021156
DIRAS3	2,733008	0,004499
DLL3	1,37263	0,013708
DPPA3	1,495257	0,044376
DRD5	1,298153	0,046907
ELF3	1,93934	0,000998
EMP1	1,466612	0,000676
ERBB3	1,753003	0,008316
FBXL2	2,26805	0,0204
FGFR4	1,364339	0,013233
FZD8	1,292147	0,032343
GABRB1	3,017873	0,024332
GATA6	2,131049	0,007952
GLYATL1	2,039689	0,035696
GNB3	1,661934	0,003563
GOLGA6B	1,778258	0,010695
GOLGA6C	1,720963	0,032767
GPC5	2,590636	0,034321
GPHA2	1,732325	0,008103
GPR32	1,621702	0,018819
GSTA1	2,68789	0,002947
GSTA3	3,599436	0,002009
HIST1H2BJ	1,510803	0,003287
HPN	1,556879	0,018036
HPX	1,336865	0,029297

PKP3	1,807048	0,01851
PLA2G2A	2,734578	0,016239
PLK2	1,355021	0,004875
PLOD2	1,86641	0,000147
PMEL	1,823925	0,002291
PPP1R1B	1,273802	0,03015
PRKAG3	2,385151	0,024401
PRPH	1,784126	0,029832
RAC3	1,308664	0,008868
RAMP2	2,127556	0,011208
RGS4	1,932406	0,044453
RHBDF1	1,886511	0,004597
RHCG	2,391264	0,027449
RXFP3	1,478782	0,031246
RYR1	2,266577	0,003275
SERPINE1	1,497074	0,000972
SHBG	1,846593	0,035275
SLC52A1	1,439858	0,007942
SLC5A2	1,374723	0,016504
SLCO2A1	1,629517	0,024547
SLCO4A1	1,49533	0,009903
SNX7	1,326715	0,022127
SOX11	1,450997	0,040795
SOX2	1,704571	0,039581
STAP2	1,454356	0,002956
STRA6	2,880188	0,019315
TACSTD2	1,485803	0,026471

HSD11B2	1,475301	0,005652
HSPB6	1,504065	0,023123
IFNA6	1,50955	0,047139
IFNL1	2,044792	0,02705
IFNL2	2,139206	0,033005
IFNW1	1,407464	0,030428
IL11	1,531422	0,024418
IL19	2,517126	0,004685
IL20	2,415008	0,017823
IL22	1,647637	0,003771
IL24	1,840818	0,012408
IL26	3,43641	0,009454
IQGAP3	1,500754	0,004505
JUN	1,664272	0,017361

TAF7L	3,095862	0,004627
TBX6	1,318594	0,002841
TEAD3	1,483095	0,016398
TEAD4	2,330419	0,011743
TGFB2	1,480613	0,007428
TIE1	2,035245	0,004696
TKTL2	1,442721	0,038432
TPSD1	1,795225	0,03743
TRIL	1,558699	0,026059
TSPAN1	1,977775	0,013676
TYRO3	1,788688	0,027913
UGT1A10	1,755202	0,019476
XAGE2	2,257155	0,018549
ZNF668	1,574247	0,028353
ZNF750	2,040499	0,010593

Tabela 5 - Vias ativadas pelo carregamento dos dados da comparação dos pacientes gRAM T0 x T60.

Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
Ap1, CALML5, CCL21 , Cg, CLSTN2, CXCL6, CYR61, ELF3, EMP1, FZD8, IFNL1 , IgA, IgG, IL11, IL19, IL20, IL22, IL24, IL26 , IL12 (complex), JUN, KRT10, KRT16, MCAM, NCR2 , NFkB (complex), RGS4 , Secretase gamma, SHBG, SLC52A1, STAP2, TACSTD2, TIE1, TPSD1, TYRO3	42	28	Doenças e Condições Dermatológicas, Lesão Corporal e Anormalidades, Movimentação Celular
ADRA2A , Akt, CCL19, CCL26, CCL27, CCNE1, COL4A1, CYP24A1, DAB2IP, DEFA5, DLL3, ERBB3, ERK, ERK1/2, FGFR4, GATA6, GOLGA6A (includes others) , Histone h3, KLK3, KLK5, KRT14, KRT6B, MRGPRX1 , Notch, NOTCH3 , P38 MAPK, PDGFRA , PI3K (family), PLOD2, PPP1R1B, RXFP3, SERPINE1, SOX2, TCF, TGFB2	39	27	Câncer, Doença Gastrointestinal, Lesão ao Organismo e Anormalidades
ANGPTL3, APOA1, APOA4, APOB, APOC2, ARHGEF17 , CCR5, CDC42EP4, CETP, CH25H, CXCL8, CYP11A1, DAB2, FANCC, FSH, GPC5, GPLD1, HMOX1, HPX, HSPB6, IFNL2, KAT5, KRT18, LDLR, Lh, MT3, MYH6, MYRF, NLK, Rac, RGS4, SNX7, TKTL2, TLR4, TYRO3	16	15	Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Moléculas Pequenas, Metabolismo de Vitaminas e Minerais
ADGRA3, ALOX15B, AR, ASPM, ATF1, CCL18, COMP, CXCL5, CYP11B1, CYP17A1, DEPDC1, FOXO1, GSTA1, GSTA2, GSTA3, IGHE, IL13, IL17D, IL7R, JAG1, JAK1, MIOX, MMRN2, MUC5B, NPPB, NR5A1, PIAS1, SAA1, SREBF1, TEAD3, THBS1, TNF, UBE2I, WNT5A, ZNF750	15	14	Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Moléculas Pequenas, Metabolismo de Vitaminas e Minerais

AGO2, AREG, BIRC5, C10orf55 , CRYAB, DLG1, DNAJB6, ENG, FLOT2, FZD8 , HEY1, IQGAP3 , mir-548 , miR-16-5p(and other miRNAs w/seed AGCAGCA), miR-34a-5p(and other miRNAs w/seed GGCAGUG), MOS , MRC2 , NYNRIN , PLAUI, PLK2 , PRKAG3 , RB1CC1, S100A2, SERPINE1 , SLC5A2 , SMAD3, SNAI2, TCF7L2, TGFB2 , TP53, TP73, TSPAN1 , WT1, WWOX, ZNF668	15	14	Desenvolvimento e Função do Sistema Cardiovascular, Desenvolvimento do Organismo, Desenvolvimento Celular
ARC , CACNA1D , CAMSAP3 , CCND1, CEBPA, CLDN3 , CLDN16 , CXCL9, CXCL11, CYP2B6 , CYR61 , DNM1L, ETV5, GLI1, GLI2, GLYATL1 , GPER1, HES1, Mek, mir-515, MYB, NFE2L2, OLR1, PKP3 , PMEL , PRPH , RBP1, RELA, RXRA, STRA6 , TEAD4 , TP63, UGT1A7 (includes others) , VDR, VEGFC	15	14	Crescimento Celular e Proliferação, Desenvolvimento de Tecidos, Desenvolvimento Celular
ACTA2, APLP1 , APP, ASS1 , BMP7, CD44, CMA1 , CTGF, DIO3 , FBXL2 , FGF2, FN1, GATA4, GPR32 , HAND2, HMOX1, HSPA8, IL6, KAT5, MFAP4 , MIF, MYOC, MYOCD, NEUROG1, NOG , NOS2, NPPA , PLA2G2A , RAF1, RHBDF1 , SMPD2, SOX11 , TAF7L , TBX5, THBS1	13	13	Desenvolvimento Celular, Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento do Organismo
AGRP, BMP4, CD274, CEACAM1, CHEK1 , CREB3L1 , DIRAS3 , DRD5 , ERVW-1, GAB2, GNA13, HEY1, HSD11B2 , IL2, IL22 , IL6R, JAK1, LEP, MARK1 , MC3R , NOTCH4 , NUPR1 , NXF3 , PAEP , POMC, PPARD, Ppp2c, SMOOTH MUSCLE ACTIN, STAT3, VEGFA, WT1, XAGE2 , XPO1, YWHAG, YWHAH	13	13	Desenvolvimento de Tecidos, Desenvolvimento Celular, Crescimento Celular e Proliferação
BHLHA15 , CCL8, CCL18 , CD1B , CDH3 , CEBPB, CNTFR , CSF2, CSF1R, CXCL5, EP300, FNDC3A, HNF4A, IL1A, IL1B, ITGB8, JUN , JUND, MAP2K7, mir-146, MIR31HG , MLXIPL, MMP10, MST1R , NFKBIZ, NR4A2, PKLR , PTX3, RHCG ,	12	12	Função e Manutenção Celular, Movimento Celular, Resposta Inflamatória

RYR1 , SAA1, SFTPD, SLCO4A1 , SOD2, TREM1			
APCS , BTK, CCL3, CCL4, CLEC4M , CRP, CXCL5, CXCL9, CXCL11, DRAP1, GCG, GNB3 , HIST1H2BJ , HNF1A, HNF4A, IFIT1, IFNA6 , IFNL1 , IFNW1 , IGF1, IL15, INS, Interferon alpha, IRF9, KCNJ11 , KIF20A , MX1, PI3K (complex), RAC3 , RARB, STAT2, TCF7L2, TLR3, TNFSF10, TRIL	10	11	Sinalização e Interação Célula-a-Célula, Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico , Tráfego de Células Imunes
ACTC1 , ADM, CALCRL, DHRS2 , DPPA3 , EOMES, NANOG, POU5F1, RAMP2 , Smad2/3, SOX2 , SOX17, TBX6	7	6	Função e Manutenção Celular, Sinalização e Interação Célula-a-Célula, Desenvolvimento Celular
DNMT3B, LRRC34	1	1	Replicação do DNA, Recombinação e Reparo, Transtorno do Desenvolvimento, Doença Gastrointestinal
MAFA , PDX1	1	1	Desenvolvimento Celular, Crescimento Celular e Proliferação, Desenvolvimento e Função do Sistema Digestivo
MMP14, SLCO2A1	1	1	Transtornos do Tecido Conjuntivo, Doenças Dermatológicas e Condições , Metabolismo de Drogas
HOXA13, MAB21L1	1	1	Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento de Órgãos, Morfologia de Órgãos
MLC1 , MYF6	1	1	Transtorno do Desenvolvimento, Transtorno Hereditário, Doença Neurológica
MAP1LC3C , PLEKHM1	1	1	Transtornos do Tecido Conjuntivo, Transtorno do

			Desenvolvimento, Transtorno Hereditário
CACNA1I, CATSPER1	1	1	Transtorno do Desenvolvimento, Transtornos do Sistema Endócrino, Transtorno Hereditário
KRAS, MMD2	1	1	Câncer, Doença Cardiovascular, Ciclo Celular
DACT3 , mir-31	1	1	Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento e Função de Cabelo e Pele , Desenvolvimento de Órgãos
P4HA3 , P4HB	1	1	Transtornos do Tecido Conjuntivo, Transtorno do Desenvolvimento, Transtorno Hereditário
GABRB1 , GABRG2	1	1	Doenças Infecciosas, Doenças Neurológicas , Lesões ao Organismo e Anormalidades
GPHA2 , GPHB5	1	1	Sinalização Celular, Metabolismo de Ácido Nucleico, Bioquímica de Moléculas Pequenas
HPN , SPINT1	1	1	Doença Imunológica, Lesão ao Organismo e Anormalidades, Câncer
ADAM12, PACSIN3	1	1	Câncer, Desenvolvimento e Função do Tecido Conjuntivo, Doença Hematológica

Ao levar-se em consideração as principais doenças e funções relacionadas com estas 25 vias de sinalização é possível observar que 10 apresentam vínculo direto com as principais manifestações clínicas de RAM pelo uso de BZN, sendo 3 delas associadas com condições dermatológicas, 3 gastrointestinais, 2 hematológicas e 2 neurológicas.

Foram observadas 2 vias que apresentaram valores de *score* elevados, 42 e 39, respectivamente, vinculadas a manifestações de doenças e funções dermatológicas e gastrointestinais. A via de *score* 42 é constituída de 34 genes, 28 deles (82,4%) com aumento de expressão significativo, tabela 5, representados na figura 21 pelos genes com preenchimento. Tal fenômeno, diferentemente dos apresentados para as vias do grupo gNRAM, demonstra que, não há uma ativação parcial da via, ou seja, alguns genes na mesma via com expressão aumentada e outros diminuídos, mas sim um evidente aumento na atividade desta via de sinalização nos pacientes gRAM. Muitos dos genes que constituem esta via são associados, pela literatura, com quadros de injúria ao organismo e manifestações dermatológicas, por isso o IPA classifica a via como estas sendo suas principais atividades modulatórias, tabela 5.

Path Designer Network 1

Figura 21 - Representação da via de sinalização de score 42. Os 28 genes com preenchimento foram dosados e representam em sua totalidade aumento de expressão gênica, demonstrando forte ativação da via proposta pela manifestação das RAMs dermatológicas desencadeadas pelo uso de BZN.

Na figura 22 tem-se a representação esquemática da via de score 39, constituída também por 34 genes, 27 deles (79,4% dos genes desta via) apresentaram aumento de expressão significativa. As principais atividades modulatórias desta via são sobre quadros de injúria ao organismo e doenças gastrointestinais. Indicando que esta via poderia estar associada com as manifestações gastrointestinais de RAM dos pacientes do grupo gRAM.

Path Designer Network 2

Figura 22 - Representação da via de sinalização de score 39. Os 27 genes com preenchimento foram dosados e representam em sua totalidade aumento de expressão gênica, demonstrando ativação da via proposta pela manifestação das RAMs gastrointestinais desencadeadas pelo uso de BZN.

A via de score 10, figura 23, poderia ser a melhor associada com as manifestações clínicas de RAMs hematológicas que acometem 4,3% da população estudada. Ela é constituída por 35 genes, 11 deles (28,6%) detectados com aumento de expressão significativo nos pacientes do grupo gRAM.

Path Designer Network 10

© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 23 - Representação da via de sinalização de score 10. Os 11 genes com preenchimento foram dosados e representam em sua totalidade aumento de expressão gênica, indicativo desta ser a via responsável pelas manifestações clínicas hematológicas das RAM desencadeadas pelo uso de BZN.

Manifestações de RAM neurológica são estão entre os três desfechos clínicos mais comuns de RAM na população estudada. Pelas buscas de vias de sinalização no IPA, relacionadas com este fenômeno, temos a via de *score* 1, figura 24. Embora esta via tenha *score* muito baixo, vale destacar que o gene GABRB1 (50% da via) foi um dos que apresentou maior aumento de expressão gênica dentre todos os genes os dosados pelo experimento, com logFC de 3,01, um aumento de 300% quando comparado ao T0 do tratamento com BZN.

Path Designer Network 22

Figura 24 - Representação da via de sinalização de *score* 1. O gene com preenchimento foi dosado e representa aumento de expressão gênica significativo com logFC de 3,01. Indicativo de relação com as manifestações clínicas neurológicas das RAM desencadeadas pelo uso de BZN.

© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

O IPA ainda apresentou 2 vias relacionadas a doenças e funções dermatológicas, 2 vias com relação a doenças e funções gastrointestinais, 1 via para doenças e funções hematológicas e 1 via para doenças e funções neurológicas, além das demais descritas. Todas essas vias apresentaram *score* 1 e são constituídas de 2 genes, sendo 1 deles (50%) com aumento de expressão significativa detectada.

5.4 Busca de marcadores preditivos para RAMs

Para busca de marcadores preditivos de RAMs, avaliou-se o perfil transcricional dos pacientes gRAM e gNRAM com base nas amostras normalizadas de cada paciente do tempo 0, antes do uso de BZN. Com a comparação de expressão diferencial T0 gRAM x T0 gNRAM obtiveram-se inicialmente 66 genes significativos. Para avaliar o poder de clusterização dos grupos gRAM e gNRAM perante estes genes foi realizado um *heatmap*. É possível observar que um paciente, 15 NRAM, não seguia os padrões de

Tabela 6 - Genes significativos encontrados na comparação T0 gRAM x gNRAM:

Gene	logFC	P Value
OR2T5	-4,50883	0,041768
LCE3C	-3,17506	0,043409
CYP26B1	-3,00358	0,039494
OR2J2	-2,88359	0,02014
AP3B2	-2,8065	0,022065
RSAD2	-2,46133	0,000343
CCL8	-2,44243	0,013203
FRMD8P1	-2,43497	0,03397
C2orf91	-2,37433	0,045405
FST	-2,16612	0,04261
SH2D6	-2,08672	0,049469
LOC146481	-2,03915	0,049046
RPP25	-2,03045	0,049326
C4BPA	-1,8965	0,011813
MPP3	-1,86363	0,035711
MIR181D	-1,83789	0,036786
IFI44L	-1,81	0,002584
CELF5	-1,78311	0,048251
LINC00477	-1,76555	0,01747
FFAR1	-1,75797	0,046438
IFIT1	-1,74574	0,001414
SIGLEC1	-1,73945	0,00966
MIR548I3	-1,73783	0,04641

CTAGE6P	-1,67406	0,022335
CCL2	-1,66169	0,004287
ZNF833P	-1,55335	0,027773
FTCD	-1,53654	0,046166
ISG15	-1,49917	0,002866
KIF7	-1,49594	0,027164
HEPH	-1,45993	0,048744
LAMP3	-1,44422	0,011007
GLTPD2	-1,41454	0,030254
HIST1H2BO	-1,41226	0,011343
OR7E5P	-1,41106	0,044419
HLA-H	-1,38139	0,006744
CTAGE15P	-1,37419	0,04912
ANKRD20A8P	-1,36299	0,032232
MX1	-1,3281	0,001392
IFI6	-1,31536	0,003528
INGX	-1,29561	0,033283
VWF	-1,28101	0,040848
OAS3	-1,27539	0,003397
SNORA53	-1,26339	0,010251
PRSS33	1,258175	0,011526
SLC29A1	1,293703	0,000336
SDHAP1	1,327724	0,016062
GPR82	1,464429	0,002633
CECR7	1,523952	0,01319
CSDC2	1,557154	0,025846
TFF3	1,55816	0,00249

STAC	1,616282	0,019643
ESPN	1,7116	0,000249
COL13A1	1,742599	0,000782
AIF1L	1,761727	0,016733
MYOM2	1,834048	0,011158
CCL23	2,013301	0,001254
FCGR2A	2,087789	0,000362
AMOTL1	2,271759	5,32E-05

Com as amostras normalizadas e selecionadas para estes genes, foi gerado um novo *heatmap*, figura 26, do T0 dos pacientes gRAM e gNRAM, onde é possível notarmos que visualmente há uma tendência de clusterização entre os grupos e os genes, ao compararmos os quadrantes dos pacientes gRAM e gNRAM, pelo tom de verde e preto, muito melhor definida e clara após a remoção da amostra 15 NRAM.

Figura 26 - Heatmap das amostras gRAM e gNRAM T0 normalizadas e filtradas por amostra: Após remoção da amostra 15 NRAM, observamos no primeiro quadrante as amostras dos pacientes gRAM para os 58 genes significativos da comparação T0 gRAM x gNRAM apresentam tons de preto e verde mais escuro. No segundo quadrante, dos pacientes gNRAM, notamos tons de verde mais claro, visualmente notamos uma tendência de clusterização dos genes perante os grupos.

Após estas verificações, os dados normalizados das 38 amostras do T0 gRAM e gNRAM, pertinentes ao 58 genes significativos, foram alimentadas no site <http://www.metaboanalyst.ca> para avaliação diferenciada de modelos de análises estatísticas. Utilizou-se a técnica de análise estatística *spLSDa*, *sparse PLS discriminant analysis*, que faz uso de modelos matemáticos para segregar as amostras em grupos distintos e independentes, com base nos componentes principais dos genes propostos. Demonstrando, na figura 27, uma clara separação entre as amostras do grupo gRAM e gNRAM. Este modelo de análise utilizou-se dos dados dos componentes principais de 8 genes, figura 28, para esta separação. Embora estes genes não tenham apresentado P Value significativo nas análises genômicas e transcriptômicas ou relação biológica de manifestações de RAM, eles são os responsáveis por separam com maior eficiência, em grupos independentes e clusterizados, os pacientes em gRAM e gNRAM.

Figura 27 - Modelo de análise spLSDa das amostras gRAM e gNRAM. Demonstrando clara separação em grupos independentes entre as amostras dos pacientes gRAM e gNRAM, com base nos componentes principais 1 e 2.

Figura 28 - Genes responsáveis pela separação das amostras em grupos gRAM e gNRAM. Com base nos componentes principais 1 e 2 destes genes, foi possível a clara separação das amostras gRAM e gNRAM em grupos independentes

5.5 Associação de resultados genômicos e transcriptômicos para busca de vias de sinalização preditivas de RAMs

Foi realizada a associação dos resultados genômicos e transcriptômicos na busca de possíveis vias de sinalização candidatas a efeitos preditivos das RAMs, nos pacientes do grupo gRAM, antes do uso de BZN (T0). Para isso, foi feita a junção dos 58 genes significativos apresentados na tabela 6 com os 38 genes relacionados com os SNPs de menor P Value, provenientes das análises genômicas, e com a coletânea destes 96 genes, em negrito, na coluna “**Molecules in Network**” da tabela 7, foram feitas buscas no IPA. A estes genes foram associadas 7 vias de sinalização, tabela 7.

Tabela 7 - Vias de sinalização apresentadas pela junção dos dados genômicos e transcriptômicos.

Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
AGO2, AMOTL1 , ARL6IP5 , CCL23 , CD36, CDKN2A, CHST2, CTGF, CTNNB1, CTSZ , CYP26B1 , EDN3 , FFAR1 , IL13, IL7, ITGB3, Lh, MAPRE1, mir-181 , mir-296 , mir-298 , mir-324, mir-365, miR-365-3p (and other miRNAs w/seed AAUGCCC), mir-500, mir-548 , miR-92a-3p (and other miRNAs w/seed AUUGCAC), PID1 , RNASE2, STAC , STK17A, TNF, TP53, TUBB1 , VWF	27	15	Resposta Inflamatória, Lesão ao Organismo e Anormalidades, Câncer

ACKR1, AIM2, CCL2 , CCL8 , CD6, CD72, CLEC4C, DHX58, ERK1/2, FCGR2A , FST , GNAS , GRM1, Hla-abc, IFI44L , IFI6 , IFIH1, IFIT1 , IFN Beta, IgG, IL28, Immunoglobulin, Interferon alpha, ISG15 , LAMP3 , MX1 , NFE2L3, OAS3 , P38 MAPK, RPL23A, RSAD2 , TCR, TICAM1, UNC93B1, ZC3HAV1	22	13	Resposta Antimicrobiana, Resposta Inflamatória, Doenças Infecciosas
C4BPA , HNF1A	2	1	Metabolismo de Aminoácidos, Câncer, Metabolismo de Carboidratos
INSR, SLC29A1	2	1	Comportamento, câncer, doença gastrointestinal
F2, FRMD4B	2	1	Doença Cardiovascular, Doença Hematológica, Transtorno Hereditário
HEPH , SLC40A1	2	1	Transporte Molecular, Transtorno do Desenvolvimento, Doença Hematológica
IFIH1, SIGLEC1	2	1	Sinalização e interação célula-a- célula, montagem e organização celular, função e manutenção celular

As vias de *Score* 27, figura 29, relacionada com quadros de resposta inflamatória, injúrias e anormalidades ao organismo, juntamente com a de *Score* e 22, figura 30, vinculada com resposta inflamatória e doenças infecciosas, são as que aparentam ter maior relação com um possível efeito preditivo à RAMs por uso de BZN.

Figura 30 - Via de Score 22. Via de sinalização relacionada com a manifestação a resposta inflamatória e doenças infecciosas. Os 13 genes detectados nos experimentos e que foram carregados no IPA apresentam-se com preenchimento na figura.

6 DISCUSSÃO

Este estudo buscou entender as bases genéticas das RAMs por uso de BZN. Manifestações dermatológicas foram as mais comuns e encontradas em mais de metade dos pacientes o que está de acordo com outros estudos que avaliaram o uso do BZN e seus eventos adversos (102). Existe apenas um estudo que associou um marcador genético (HLA 3505) a presença de RAMs com uso de BZN em uma coorte de bolivianos (103). Este marcador é raro em nossa população e não pode ser encontrado em pacientes do grupo gRAM.

Apesar da casuística ser muito pequena para GWAS nós observamos no cromossomo 16, três SNPs associadas a RAMs com P Value de 5.65×10^{-8} . Além disso, estes SNPs, localizados sobre o gene LOC102724084, encontram-se em desequilíbrio de ligação com muitos outros SNPs adjacentes que apresentavam r^2 de 0,4 a 0,8 (figura 11). A função deste gene ainda não é conhecida o que dificulta a confirmação da plausibilidade biológica da associação.

Seguindo o mesmo raciocínio acima descrito, pode-se destacar 7 SNPs no cromossomo 15, rs3097439, rs3098545, rs3097436, rs3097435, rs3098548, rs3097434 e rs3098549, que apresentaram P Value de 6.89×10^{-7} . Embora esta região apresente menos SNPs adjacentes em desequilíbrio de ligação, como observado na figura 17, estes SNPs estão em proximidade ao gene GABRG3. Este gene foi vinculado a discinesia tardia resistente ao tratamento induzido por neurolépticos em um estudo de GWAS(104).

Os SNPs encontrados no cromossomo 20 são outros que merecem destaque, uma vez que um deles, o rs6026692 apresenta-se em forte desequilíbrio de ligação, r^2 de 0,8, com SNPs adjacentes, figura 16, mas sendo o único com P Value em $6,9 \times 10^{-7}$. Estes SNPs estão em proximidade com alguns genes, em destaque os genes EDN3 e GNAS. Variantes genômicas associadas ao gene GNAS, e alguns outros, foram relacionadas com a manifestação de RAMs em pacientes em uso de medicamentos antipsicóticos (105). Além disso, o gene EDN3 se mostrou vinculado a quadros de RAM em um estudo com pacientes recém-nascidos em uso de dexametazona (106).

O SNP rs7963499 apresenta-se em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes no cromossomo 12, figura 15, embora ele seja o único deles com P Value representativo de destaque, $9,21 \times 10^{-7}$. Outro ponto importante é que todos estes SNPs estão sobre o gene ETV6, que foi associado em um caso raro de desenvolvimento de RAM por um paciente em tratamento para leucemia mieloide aguda (107).

O SNP rs7563279 com P Value de $6,91 \times 10^{-7}$, apresenta-se em desequilíbrio de ligação com muitos SNPs adjacentes do cromossomo 2, figura 14, mas infelizmente não associados a genes. O SNP rs6819334 com P Value de $3,44 \times 10^{-7}$ presente no cromossomo 4, figura 13, também está em desequilíbrio de ligação com múltiplos SNPs adjacentes e dispersos sobre os genes MIR5684, LINC01207, APELA e MARCH1 e em proximidade com TRIM61 e FAM218A. Entretanto, não foi encontrada nenhuma relação biológica destes genes que pudessem ser relacionadas aos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes. O mesmo aconteceu no cromossomo 3, onde o SNP rs3968927 apresentou P Value de $2,95 \times 10^{-7}$, e está em desequilíbrio de ligação com outros SNPs adjacentes, dispersos sobre os genes LMOD3, ARL6IP5, FRMD4B, UBA3, TMF1, MIR3136, EOGT e FAM19A4 (figura 12). Não encontramos nenhuma função nestes genes que pudessem explicar esta associação.

Normalmente estudos de GWAS precisam de grandes casuísticas para encontrar SNPs com poder estatístico de confiança. Foi surpreendente encontrar neste estudo, com poucos indivíduos, polimorfismos com P Value inferior a 10^{-7} . O plano original deste estudo de farmacogenômica foi a busca de polimorfismos relacionados a características de metabolismo e/ou transporte de drogas como justificativa das RAMs pelo uso de BZN. Entretanto nenhum dos polimorfismos associados a genes com estas funções apareceram nestas análises.

A etapa seguinte foi avaliar a associação das RAMs com a expressão diferencial de genes antes e após o uso de BZN. O perfil de expressão gênica dos pacientes dos grupos com e sem RAM foram bem diferentes. O grupo gRAM, apresentou mais de 780 genes diferentemente expressos no T60 em relação ao T0. Quando analisados no IPA, observou-se que muitos desses genes estavam relacionados a uma via comum de doenças dermatológicas com um score de 42. Nesta via foi observado que 82,4% dos genes que a constituem, apresentavam

aumento de expressão significativo. Os genes desta via já foram citados em diversas publicações que os relacionaram a dermatite (108-118), dermatite atópica (119), hiperplasia da epiderme (119,120), hiperqueratose epidermolítica (121), líquen plano (110,122,123), eritema nodoso (124) e ictiose com confete (121).

O aumento da expressão gênica e da proteína IL22 leva a quadros de inflamação na pele vinculado a dermatite, aumento da hiperplasia da epiderme e associação com a manifestação de eritema nodoso (108,109,120,124). O Aumento da expressão em humanos do CALML5 está associado a líquen plano (122). A expressão aumentada do gene CCL21 foi associada com dermatite atópica e líquen plano (110). Ainda foi visto que a elevação plasmática da proteína IL24 em camundongos apresenta relação direta com piora de quadros de dermatite (111). A concentração proteica aumentada de JUN em cultura celular de queratinócitos humanos foi associada a dermatite atópica e a elevação da mesma proteína em humanos está associada a líquen plano (113,123). A proteína KRT10, quando aumentada, apresenta relação com quadros de dermatite atópica, foi demonstrado ainda que este gene mutante em dominância autossômica tem vínculos com a manifestação clínica do efeito cíclico de coceira associado a hiperqueratose epidermolítica e ictiose com confete (112,121). A síntese proteica elevada da KRT16 está associada a estágios avançados e severos da dermatite atópica em humanos adultos e o aumento da expressão deste gene é relacionado com a hiperplasia epidérmica e líquen plano em humanos (119,122,125). O aumento da proteína MCAM está relacionado em humanos com quadros crônicos e agudos de dermatite de contato e a prurigo simplex (114). A elevação proteica de SLC52A1 é relacionado clinicamente com quadros de dermatite atópica em humanos (115).

Ainda sobre esta via, dos 17,6% dos genes que não tiveram aumento de expressão significativo detectado no grupo gRAM, observamos que alguns destes também se relacionam às RAMs dermatológicas. Acreditamos que um fenômeno global de expressão da via pode modular estes genes e exercer papéis importantes nas manifestações dermatológicas dos pacientes. Tais conjecturas ganham força ao observar citações do aumento sérico dos complexos de IgA apresentando vínculos com postulose palmoplantar em humanos (116). Além da diminuição sérica dos complexos de IgG em humanos

que apresentavam lúpus eritematoso estar associada a depleção de inflamação na pele. Ainda, em modelo animal com ratos, foi demonstrado que os complexos de IgG fazem a mediação de processos inflamatórios da derme (117,118).

A segunda via com *score* mais alto (39) foi a relacionada com doenças gastrointestinais, onde foram observados aumento de expressão de 79,4% dos genes dosados. Isoladamente ou ativados em conjunto, os genes desta via já foram citados em diversas publicações vinculados a efeitos morfológicos anormais do esôfago (126,127), síndrome de Budd-Chiari, (128), aumento de injúria hepática (129), efeito primário sobre a cirrose biliar (130) e ação sobre patologias orais (131,132).

Observamos uma via relacionada a funções e desenvolvimento do sistema hematológico, cujo *score* foi 10, mas muito plausível para explicar as manifestações de RAMs hematológicas que acometeram 4,3% dos indivíduos deste estudo. Os genes desta via apresentam relação clínica com efeitos sobre a quantidade de células sanguíneas (133), diminuição de leucócitos (134), a modulação da mielopoiese de leucócitos (135-139), ação sobre a leucopoiese, efeitos sobre a hematopoiese de leucócitos mononucleares, efeitos sobre a proliferação de linfócitos, ação sobre a proliferação de células dendríticas, efeitos sobre o desenvolvimento de células de linfócito T e a modulação da hematopoese de fagócitos (138).

As reações neurológicas estão associadas a terceira maior incidência de casos nos pacientes estudados (36,8%). Embora a via apresente *score* 1, o gene GABRG1 apresentou um aumento de expressão de 300% em comparação com T0 no grupo gRAM. Assim, é possível que seja a que melhor justifica tais fenômenos. Sobre a via dos genes GABRG1 e GABRG2, o levantamento bibliográfico os associa a patologias como efeitos sobre a dor neuropática (140), hiperalgesia (141), enxaquecas (142), dor de cabeça relacionada a tensão (143). A modulação da proteína do gene GABRB1, em humanos, por agonistas e antagonistas, isolados ou em combinação com outras drogas, pode tratar quadros de enxaqueca, dor neuropática e dor de cabeça relacionada a tensão (140,142,143). O gene GABRG2, também em tratamentos isolados ou combinados com outras drogas, apresentou modulação, via agonistas e

antagonistas seletivos, de quadros de hiperalgesia, enxaquecas e dor neuropática (140-142).

Na busca de um perfil de expressão diferencial ou de vias de sinalização preditivas para RAMs foram avaliados os resultados dos transcriptomas entre pacientes gRAM x gNRAM antes do tratamento (T0) com BZN. Dos 58 genes significativos encontrados observamos relação de alguns destes com quadros de RAM ou envolvimento direto ou indireto nestes fenótipos, como: Diferentes estudos que demonstraram que genes relacionados com a síntese de citocinas, como CCL2, CCL23A e CCL8, modulam direta ou indiretamente a resposta adversa a medicamentos (144-146). O tratamento com diferentes drogas apresentou desfecho clínico importante e diferente para os pacientes que possuem polimorfismos do gene FCGR2A (147-149). Foi demonstrado em um estudo clínico de fase 3 com o agonista seletivo para o receptor FFAR1, o surgimento de quadros de injúria hepática, relacionando o envolvimento deste gene e seus transcritos com manifestações deste tipo (150). Polimorfismos no gene SLC29A1 demonstraram-se preditores de casos de anemia severa desenvolvida em pacientes após o uso de telaprevir (151). O aumento de IFIT1 demonstrou-se eficaz na proteção hepática frente a insultos tóxicos (40,152).

Foi realizada a associação dos resultados genômicos e transcriptômicos na busca de possíveis vias de sinalização candidatas a efeitos preditivos das RAMs, nos pacientes do grupo gRAM antes do uso de BZN (T0). Observaram-se principalmente 2 vias com possibilidade de efeito preditivo. A via de *Score 27*, associada a resposta inflamatória, injúrias e anormalidades no organismo, pode ser uma das envolvidas com a modulação de RAMs após o uso de BZN, uma vez que, o aumento de proteína STAC em eosinófilos é associado a quadros de dermatite atópica em humanos (153). Assim como o aumento da proteína CCL23 no plasma e na pele, detectados por ensaios de ELISA e imuno-histoquímica, respectivamente, foi associado a quadros de dermatite atópica (154). A via de *Score 22*, associada a resposta inflamatória e doenças infecciosas parece ser a principal envolvida nos quadros preditivos de RAM. Uma vez que, resultados promissores em um estudo clínico de fase 3 para o tratamento de dermatomiosite e síndrome de Steven-Johnson em humanos com Imunoglobulina (IgG), antagonista da proteína FCGR2A, permitindo assim a proposição de uma

relação deste gene, transcrito e/ou proteína na modulação deste tipo de fenótipo (155,156). Estudos demonstraram a relação direta do aumento de RNAm do gene MX1 em tecidos lesados de humanos com quadros de dermatite atópica e Lichen Planus, além do seu papel na modulação da regeneração de hiperplasia epidérmica em humanos (122,125). Ainda, O aumento do RNAm para o gene CCL2 foi associado a quadros de Lichen Planus em peles com lesões de pacientes humanos (122). As manifestações dermatológicas são as principais RAMs apresentadas pelos pacientes após o uso de BZN, 63,1% dos casos, e todos os genes citados acima apresentaram nas análises de transcriptoma ou genoma, P Value significativo. Assim, pode-se propor que estes genes em associação com as vias descritas podem exercer efeitos preditivos de possíveis manifestações dermatológicas por usuários de BZN.

Desta forma, foi possível identificar, mesmo que de forma preliminar, devido ao baixo número de amostras, que há SNPs significantes expressos na população de pacientes que manifestam RAM, quando comparado com os que não as manifestam. Além disso, pudemos demonstrar a relação das vias de sinalização aqui citadas com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes gRAM pelo tratamento com BZN: dermatológicas, gastrointestinais, hematológicas e neurológicas. Pudemos ainda, identificar vias de sinalização com atividade de expressão gênica significativa entre os grupos gRAM x gNRAM antes do uso de BZN.

7 CONCLUSÃO

Os dados sugerem que os SNPs rs1518601, rs11861761 e rs34091595 e o gene LOC102724084, do cromossomo 16, estão relacionados com o desenvolvimento de RAMs durante o tratamento com BZN. Entretanto, cabe uma validação destes dados com um número amostral mais alto para sua confirmação

O uso de BZN alterou a expressão de genes específicos nos pacientes que apresentaram RAMs, que puderam ser associados a vias de sinalização relacionadas aos principais efeitos colaterais deste medicamento.

8 ANEXOS

Anexo I - Resultados da análise de integridade de RNA (RIN) das amostras obtidos pelo Bioanalyzer 2100.

Pacientes selecionados para o transcriptoma, extração, quantificação e obtenção integridade RNA (RIN)							
ID estudo	Tempo 0			Tempo 60			
	Data Extração	Quantificação RNA (ng/uL)	RIN	Data Extração	Quantificação RNA (ng/uL)	RIN	RAM/ NRAM
113050001	6/23/2016	17,4	5.8	6/21/2016	61	7.3	NRAM
113050003	6/24/2016	25,5	4.3	6/21/2016	36	7.0	RAM
113050007	6/24/2016	62	5.3	6/21/2016	12,8	6.9	RAM
113050008	6/24/2016	73	5.1	6/21/2016	18,7	2.5	RAM
114030011	9/1/2015	52	5.8	6/21/2016	33	5.0	NRAM
114030013	9/1/2015	98	5.5	6/21/2016	67	7.4	NRAM
114030015	9/1/2015	86,8	6.6	6/21/2016	38,3	7.0	NRAM
114030016	9/1/2015	57	5.6	6/21/2016	31,8	4.7	RAM
114030017	9/1/2015	32,8	6.6	6/21/2016	47,4	6.5	RAM
114030019	9/1/2015	28	5.5	6/21/2016	15,7	8.0	RAM
114030021	9/1/2015	31.8	8.5	6/21/2016	40	8.2	NRAM
114030026	9/1/2015	48,1	8.4	6/21/2016	48,5	7.6	RAM
114030034	9/1/2015	88,9	5.9	6/21/2016	82,4	1.9	NRAM
114030036	6/23/2016	21,5	5.1	6/21/2016	59	8.1	NRAM
114030037	6/23/2016	40,1	7.2	6/21/2016	58	6.4	NRAM
114030039	6/23/2016	87	8.5	6/21/2016	61	6.5	RAM
114030043	6/24/2016	62	6.5	6/21/2016	60	4.1	RAM
114030045	6/24/2016	57	6.8	6/21/2016	53	7.0	RAM
114030046	6/23/2016	100	6.3	6/21/2016	85	7.2	RAM
114030047	6/24/2016	61	6.9	6/22/2016	58	7.2	RAM
114030048	6/24/2016	35,8	5.7	6/22/2016	24,1	7.5	RAM
114030050	6/24/2016	61	7.6	6/22/2016	18,5	5.2	RAM
114030054	6/24/2016	26,5	7.1	6/22/2016	73	8.1	RAM
114030055	6/24/2016	>100	8.2	6/22/2016	55	7.9	RAM
114030061	6/24/2016	27,7	5.8	6/22/2016	47,9	6.9	RAM
114030067	6/24/2016	>100	6.9	6/22/2016	65	5.9	RAM
114030080	6/27/2016	64	7.1	6/22/2016	78	7.3	RAM
114030082	9/24/2015	12,8	5.8	6/22/2016	50	8.3	RAM
114030084	9/24/2015	22,3	7.6	6/22/2016	53	7.7	NRAM
114030085	9/24/2015	43,9	6.9	6/22/2016	65	7.9	NRAM
114030092	9/24/2015	> 100,00	7.8	6/23/2016	67	8.1	NRAM
114030096	9/24/2015	38,7	6.7	6/23/2016	30,7	8.0	RAM
114030102	9/24/2015	73,4	7.3	6/23/2016	65	7.1	RAM
114030105	9/24/2015	27,1	4.2	6/23/2016	41,3	5.2	RAM
114030111	9/24/2015	36,4	6.6	6/23/2016	43	6.6	RAM
114030112	9/24/2015	11,5	6.8	6/23/2016	29,3	6.4	RAM

114030113	9/24/2015	46	6.1	6/23/2016	24,7	6.8	NRAM
114030114	9/25/2015	62	5.0	6/23/2016	29,9	6.1	NRAM
114030115	9/25/2015	70	5.6	6/23/2016	33,5	5.7	RAM

Anexo II – Artigos publicados

RHD and RHCE genotyping by next-generation sequencing is an effective strategy to identify molecular variants within sickle cell disease patients.

Dezan MR, Ribeiro IH, Oliveira VB, Vieira JB, Gomes FC, **Franco LAM**, Varuzza L, Ribeiro R, Chinoca KZ, Levi JE, Krieger JE, Pereira AC, Gualandro SFM, Rocha VG, Mendrone-Junior A, Sabino EC, Dinardo CL.

Blood Cells Mol Dis. 2017 Jun;65:8-15. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.03.014. Epub 2017 Mar 31.

PMID:28388467

Simultaneous colonization by Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae harboring mcr-1 in Brazil.

Perdigão Neto LV, Corscadden L, Martins RCR, Nagano DS, Cunha MPV, Neves PR, **Franco LAM**, Moura MLN, Rizek CF, Guimarães T, Boszczowski Í, Rossi F, Levin AS, Stabler RA, Costa SF.

Infection. 2019 Apr 25. doi: 10.1007/s15010-019-01309-2. [Epub ahead of print]

PMID:31025216

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization: WHO/HTM/NTD/2010 2010.
2. Organization WH. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>, 2010:Fact sheet N°340.
3. Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 2010;375:239-47.
4. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 2013;13:342-8.
5. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010;115:14-21.
6. Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003540.
7. Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2009;49:e52-4.
8. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018;391:82-94.
9. Zingales B, Miles MA, Campbell DA et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 2012;12:240-53.
10. Yamagata Y, Nakagawa J. Control of Chagas disease. *Adv Parasitol* 2006;61:129-65.
11. WHO. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert Committee. Geneva: World Health Organization, WHO technical report series, 905., 2002.
12. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2014;121:22-33.
13. Luquetti AO, Tavares SB, Siriano LaR et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110:369-76.
14. Murcia L, Carrilero B, Munoz-Davila MJ, Thomas MC, López MC, Segovia M. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. *Clin Infect Dis* 2013;56:496-502.
15. Bern C, Verastegui M, Gilman RH et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* 2009;49:1667-74.
16. Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106:623-8.
17. Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:476-82.
18. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Bula I, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion* 2015;55:1249-55.
19. Angheben A, Boix L, Buonfrate D et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 2015;13:540-50.

20. Riarte A, Luna C, Sabatiello R et al. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin Infect Dis* 1999;29:561-7.
21. Cicora F, Escurra V, Silguero S, González IM, Roberti JE. Use of kidneys from trypanosoma cruzi-infected donors in naive transplant recipients without prophylactic therapy: the experience in a high-risk area. *Transplantation* 2014;97:e3-4.
22. Huprikar S, Bosserman E, Patel G et al. Donor-derived Trypanosoma cruzi infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. *Am J Transplant* 2013;13:2418-25.
23. Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C et al. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. *Am J Transplant* 2011;11:672-80.
24. Kun H, Moore A, Mascola L et al. Transmission of Trypanosoma cruzi by heart transplantation. *Clin Infect Dis* 2009;48:1534-40.
25. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR et al. Oral Transmission of Trypanosoma cruzi, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2019;25:132-135.
26. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:659-88, table of contents.
27. Pérez-Molina JA. Management of Trypanosoma cruzi coinfection in HIV-positive individuals outside endemic areas. *Curr Opin Infect Dis* 2014;27:9-15.
28. Burgos LG, Ortiz BD, Canese A, Ojeda A, Melo M. Reactivation of Chagas disease by immunosuppressive therapy in a patient with systemic lupus erythematosus: report of an exceptional case. *Am J Dermatopathol* 2012;34:e84-9.
29. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375:1388-402.
30. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2015;373:1295-306.
31. Ott J. Analysis of human genetic linkage. Rev. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1991.
32. Viotti R, Vigliano C, Lococo B et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:157-63.
33. Viotti R, Vigliano C, Lococo B et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:724-34.
34. Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:487-91.
35. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM et al. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:441-9.
36. Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Suppl 1:331-5.
37. de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early Trypanosoma cruzi infection. *Lancet* 1996;348:1407-13.
38. Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:526-9.
39. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:1-10.

40. Yun O, Lima MA, Ellman T et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e488.
41. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 2007;298:2171-81.
42. Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol* 2011;97:1-48.
43. Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* 2010;115:55-68.
44. Franco-Paredes C, Bottazzi ME, Hotez PJ. The unfinished public health agenda of chagas disease in the era of globalization. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e470.
45. Brener Z, Costa CA, Chiari C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1976;18:450-5.
46. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:755-9.
47. Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998;93:203-14.
48. Murta SM, Nogueira FB, Dos Santos PF et al. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop* 2008;107:59-65.
49. Toledo MJ, Bahia MT, Veloso VM et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:1045-53.
50. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5022-7.
51. Tetaud E, Bringaud F, Chabas S, Barrett MP, Baltz T. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8278-82.
52. Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG et al. Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1951.
53. Catania VA, Sánchez Pozzi EJ, Luquita MG et al. Co-regulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol* 2004;3:11-7.
54. Köhle C, Bock KW. Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol* 2009;77:689-99.
55. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002;62:638-46.
56. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 2007;453:643-59.
57. Zhang Y, Zhao T, Li W, Vore M. The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation. *Mol Pharmacol* 2010;77:237-46.
58. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med* 2009;30:297-343.

59. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 2002;23:687-702.
60. Raaflaub J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 1980;30:2192-4.
61. Hariparsad N, Chu X, Yabut J et al. Identification of pregnane-X receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1160-73.
62. von Knethen A, Neb H, Morbitzer V et al. PPAR γ stabilizes HO-1 mRNA in monocytes/macrophages which affects IFN- β expression. *Free Radic Biol Med* 2011;51:396-405.
63. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 2000;356:1255-9.
64. Gandhi TK, Weingart SN, Borus J et al. Adverse drug events in ambulatory care. *N Engl J Med* 2003;348:1556-64.
65. Pirmohamed M, James S, Meakin S et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 2004;329:15-9.
66. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1108-13.
67. Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4896-9.
68. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A et al. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:6125-31.
69. Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:390-5.
70. Thomas DC, Haile RW, Duggan D. Recent developments in genomewide association scans: a workshop summary and review. *Am J Hum Genet* 2005;77:337-45.
71. Clayton D. Population association. *Handbook of Statistical Genetics*. 2nd Ed. ed. New York: Wiley, 2003:939-960.
72. Batista MJ. Análise de associação aplicada ao mapeamento genético de doenças. IME. São Paulo: USP, 2006.
73. Gianola DaS, D. Likelihood. *Bayesian and MCMC Methods in Quantitative Genetics*. New York: Springer., 2002.
74. Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997;53:1253-61.
75. Batista MJ. Evidence for SNP Effect through Supervised Association Analysis. In: Giolo SR, editor *Proceedings of the Genetic Analysis Workshop 16*. St. Louis, USA., 2008.
76. Giolo SR, Soler JMP, Batista MJ, Almeida MAAp, A.C. Evidence of SNP effect on the risk of rheumatoid arthritis: effects of covariate adjustment upon association results. *Revista Brasileira de Biometria* 2011;29:47-59.
77. Lazzeroni LC, Lange K. A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. *Hum Hered* 1998;48:67-81.
78. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;52:506-16.
79. Horvath S, Baur MP. Future directions of research in statistical genetics. *Stat Med* 2000;19:3337-43.
80. Conti DVaG, J. SNPs, haplotypes, and model selection in a candidate gene region: the SIMPL analysis for multilocus data. *Genetic Epidemiology*, 2004:429-441.
81. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008;322:881-8.

82. Amos CI, Wu X, Broderick P et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008;40:616-22.
83. Madan Babu M. Bacterial Gene Regulation and Transcriptional Networks. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK: Caister Academic Press, 2013.
84. Blais A, Dynlacht BD. Constructing transcriptional regulatory networks. *Genes Dev* 2005;19:1499-511.
85. BibhaRani, Sharma VK. Transcriptome profiling: methods and applications- A review. . *Agricultural Reviews*, 38(4) : 271-281, 2017.
86. Jelinsky SA, Samson LD. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1486-91.
87. Saúde Md. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2005;38 Suppl 3:7-29.
88. Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th edition ed. Washington, DC, 2014.
89. de REZENDE J, LAUAR KM, de OLIVEIRA A. [Clinical and radiological aspects of aperistalsis of the esophagus]. *Rev Bras Gastroenterol* 1960;12:247-62.
90. J. JLCUC. *Histologia Básica*. 10a ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
91. Scientific TF. Axiom™ 2.0 Assay Manual Workflow. In: Biosystems A, editor. Carlsbad, CA, 2017:1-130.
92. Terwilliger JDaO, J. Handbook of human genetic linkage. London: Johns Hopkins, 1994.
93. Weir BS. Genetic data analysis II: Sunderland: Sinauer Associates., 1996.
94. Purcell S, Sham P, Daly MJ. Parental phenotypes in family-based association analysis. *Am J Hum Genet* 2005;76:249-59.
95. Fisher RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society.* , 1922:87–94. .
96. Fisher RA. *Statistical Methods for Research Workers.* . 1954.
97. Marchini J, Howie B. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2010;11:499-511.
98. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;26:139-40.
99. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:4288-97.
100. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008;299:1335-44.
101. Dahlin A, Litonjua A, Lima JJ et al. Genome-Wide Association Study Identifies Novel Pharmacogenomic Loci For Therapeutic Response to Montelukast in Asthma. *PLoS One* 2015;10:e0129385.
102. Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PE, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1261-6.
103. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M et al. Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with Chagas disease. *Clin Infect Dis* 2015;61:1688-94.
104. Inada T, Koga M, Ishiguro H et al. Pathway-based association analysis of genome-wide screening data suggest that genes associated with the gamma-aminobutyric acid receptor signaling pathway are involved in neuroleptic-induced, treatment-resistant tardive dyskinesia. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:317-23.
105. Crisafulli C, Drago A, Sidoti A, Serretti A. A genetic dissection of antipsychotic induced movement disorders. *Curr Med Chem* 2013;20:312-30.
106. Sheen JM, Yu HR, Tiao MM et al. Prenatal dexamethasone-induced programmed hypertension and renal programming. *Life Sci* 2015;132:41-8.

107. Kim YJ, Yang JJ, Han Y et al. A Rare Case of ETV6/MECOM Rearrangement in Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia with t(3;12) and Monosomy 7. *Clin Lab* 2017;63:415-418.
108. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-42.
109. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241-54.
110. Christopherson KW, Hood AF, Travers JB, Ramsey H, Hromas RA. Endothelial induction of the T-cell chemokine CCL21 in T-cell autoimmune diseases. *Blood* 2003;101:801-6.
111. Kumari S, Bonnet MC, Ulvmar MH et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. *Immunity* 2013;39:899-911.
112. Komatsu N, Saijoh K, Kuk C et al. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* 2007;16:513-9.
113. Pastore S, Giustizieri ML, Mascia F, Giannetti A, Kaushansky K, Girolomoni G. Dysregulated activation of activator protein 1 in keratinocytes of atopic dermatitis patients with enhanced expression of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *J Invest Dermatol* 2000;115:1134-43.
114. Schön M, Kähne T, Gollnick H, Schön MP. Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM). *J Invest Dermatol* 2005;125:353-63.
115. Buddenkotte J, Stroh C, Engels IH et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol* 2005;124:38-45.
116. Eriksson MO, Hagforsen E, Lundin IP, Michaëlsson G. Palmoplantar pustulosis: a clinical and immunohistological study. *Br J Dermatol* 1998;138:390-8.
117. Deng GM, Liu L, Kytтары VC, Tsokos GC. Lupus serum IgG induces skin inflammation through the TNFR1 signaling pathway. *J Immunol* 2010;184:7154-61.
118. Baumann U, Chouchakova N, Gewecke B et al. Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. *J Immunol* 2001;167:1022-7.
119. Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A et al. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2004;122:1423-31.
120. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 2012;181:8-18.
121. OMIM. Mutant human KRT10 gene (unspecified DNA mutation) is associated with autosomal dominant cyclic ichthyosis with epidermolytic hyperkeratosis . Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <https://www.omim.org/entry/148080>: OMIM phenotype: 607602 / OMIM gene/allele: 148080, 2019.
122. Wenzel J, Peters B, Zahn S et al. Gene expression profiling of lichen planus reflects CXCL9+-mediated inflammation and distinguishes this disease from atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008;128:67-78.
123. Marceková Z, Flaig MJ, Kekus M, Ruzicka T, Rupec RA. The potential role of c-Jun activation in patients with cutaneous lichen planus. *Exp Dermatol* 2010;19:74-80.
124. Cai T, Wang Q, Zhou Q et al. Increased expression of IL-22 is associated with disease activity in Behcet's disease. *PLoS One* 2013;8:e59009.
125. Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T et al. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J* 2001;1:272-87.
126. Lloyd C, Yu QC, Cheng J et al. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. *J Cell Biol* 1995;129:1329-44.

127. Wong P, Colucci-Guyon E, Takahashi K, Gu C, Babinet C, Coulombe PA. Introducing a null mutation in the mouse K6alpha and K6beta genes reveals their essential structural role in the oral mucosa. *J Cell Biol* 2000;150:921-8.
128. Paradis V, Bièche I, Dargère D et al. Quantitative gene expression in Budd-Chiari syndrome: a molecular approach to the pathogenesis of the disease. *Gut* 2005;54:1776-81.
129. Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:592-600.
130. Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut* 2001;49:565-76.
131. Delaleu N, Immervoll H, Cornelius J, Jonsson R. Biomarker profiles in serum and saliva of experimental Sjögren's syndrome: associations with specific autoimmune manifestations. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R22.
132. Jang SI, Lee EJ, Hart PS, Ramaswami M, Pallos D, Hart TC. Germ line gain of function with SOS1 mutation in hereditary gingival fibromatosis. *J Biol Chem* 2007;282:20245-55.
133. Brand E, Wang JG, Herrmann SM, Staessen JA. An epidemiological study of blood pressure and metabolic phenotypes in relation to the Gbeta3 C825T polymorphism. *J Hypertens* 2003;21:729-37.
134. Dai J, Megjugorac NJ, Gallagher GE, Yu RY, Gallagher G. IFN-lambda1 (IL-29) inhibits GATA3 expression and suppresses Th2 responses in human naive and memory T cells. *Blood* 2009;113:5829-38.
135. Murray LA, Chen Q, Kramer MS et al. TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:154-62.
136. Crawford JR, Pilling D, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for spleen-derived murine fibrocytes. *J Immunol Methods* 2010;363:9-20.
137. Pilling D, Buckley CD, Salmon M, Gomer RH. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* 2003;171:5537-46.
138. Coccia EM. IFN regulation and functions in myeloid dendritic cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:21-32.
139. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002;14:432-6.
140. FDA. An antagonist of **human GABRG2 protein**, has been approved as a part of the combination drug **Symbyax[fluoxetine/olanzapine](management)** as a drug for neuropathic pain associated with diabetic peripheral neuropathy **in human**: U.S. Food and Drug Administration. Fluoxetine/olanzapine, 2009.
141. shim yh. Effect of Propofol on Remifentanyl-induced Postoperative Hyperalgesia in Patients Undergoing Thyroid Surgery.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01189721>: ClinicalTrials.gov, 2010.
142. Spierings ELH. Treatment of Insomnia in Migraineurs With Eszopiclone (Lunesta™) and Its Effect on Sleep Time, Headache Frequency, and Daytime Functioning: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Pilot Study. *ClinicalTrials.gov*, 2008.
143. Gilman's Ga. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed ed, 1996.
144. Hanafusa H, Morikawa Y, Uehara T et al. Comparative gene and protein expression analyses of a panel of cytokines in acute and chronic drug-induced liver injury in rats. *Toxicology* 2014;324:43-54.

145. Yu LR, Cao Z, Makhoul I et al. Immune response proteins as predictive biomarkers of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Exp Biol Med (Maywood)* 2018;243:248-255.
146. Zhu M, Yancy HF, Deaver C, Jones YL, Myers MJ. Loperamide-induced expression of immune and inflammatory genes in Collies associated with ivermectin sensitivity. *J Vet Pharmacol Ther* 2016;39:131-7.
147. Kim JW, Kim JH, Im SA et al. ABCB1, FCGR2A, and FCGR3A polymorphisms in patients with HER2-positive metastatic breast cancer who were treated with first-line taxane plus trastuzumab chemotherapy. *Oncology* 2012;83:218-27.
148. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3712-8.
149. Ajeganova S, Tesfa D, Hägglund H et al. Effect of FCGR polymorphism on the occurrence of late-onset neutropenia and flare-free survival in rheumatic patients treated with rituximab. *Arthritis Res Ther* 2017;19:44.
150. Wolenski FS, Zhu AZX, Johnson M et al. Fasiglifam (TAK-875) Alters Bile Acid Homeostasis in Rats and Dogs: A Potential Cause of Drug Induced Liver Injury. *Toxicol Sci* 2017;157:50-61.
151. Milazzo L, Peri AM, Mazzali C et al. SLC29A1 polymorphism and prediction of anaemia severity in patients with chronic hepatitis C receiving triple therapy with telaprevir. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1155-60.
152. Chang A, Chen Y, Shen W et al. Ifit1 Protects Against Lipopolysaccharide and D-galactosamine-Induced Fatal Hepatitis by Inhibiting Activation of the JNK Pathway. *J Infect Dis* 2015;212:1509-20.
153. Yoon SW, Kim TY, Sung MH, Kim CJ, Poo H. Comparative proteomic analysis of peripheral blood eosinophils from healthy donors and atopic dermatitis patients with eosinophilia. *Proteomics* 2005;5:1987-95.
154. Novak H, Müller A, Harrer N, Günther C, Carballido JM, Woisetschläger M. CCL23 expression is induced by IL-4 in a STAT6-dependent fashion. *J Immunol* 2007;178:4335-41.
155. Frenzel W. Study Evaluating Efficacy and Safety of Octagam 10% in Patients With Dermatomyositis (Idiopathic Inflammatory Myopathy) (IIM). *ClinicalTrialsgov*, 2019.
156. Pharmaceutical N. Phase III Clinical Trial of NPB-01 in Patients With Stevens-Johnson Syndrome/ Toxic Epidermal Necrolysis Unresponsive to Corticosteroids. *ClinicalTrialsgov*, 2014.