UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica de imunossuppressores e de microRNAs reguladores, com a resposta terapêutica em transplantados renais

VIVIAN BONEZI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de MESTRE

Orientador: Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica de imunossupressores e de microRNAs reguladores, com a resposta terapêutica em transplantados renais

VIVIAN BONEZI

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de MESTRE

Orientador: Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bonezi, Vivian
B712r   Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na
farmacodinâmica de imunossupressores e de microRNAs reguladores,
com a resposta terapêutica em transplantados renais / Vivian
Bonezi. -- São Paulo, 2015.
110p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Farmacogenética 2. Fármacos imunossupressores 3. Transplante
renal I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez Crespo, orientador.

615.766   CDD

Vivian Bonezi

Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica de imunossupressores e de microRNAs reguladores, com a resposta terapêutica em transplantados renais

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de 2015.

*À minha orientadora,
com quem tanto aprendi.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario H. Hirata por ter inicialmente aberto as portas do laboratório e permitido o meu ingresso no Programa de Aprimoramento, bem como por toda a contribuição no meu crescimento intelectual.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosario D. C. Hirata, por ter acreditado no meu potencial e confiado em mim para a realização deste trabalho. Pela imensurável paciência e dedicação. E por todas as horas desprendidas comigo me orientando e participando ativamente do meu crescimento profissional, pessoal e intelectual. Muito obrigada.

Aos meus colegas de laboratório, que além de me auxiliarem em todo o trabalho, tornaram os meus dias muito mais prazerosos. Sem a companhia e ajuda de vocês eu certamente não teria conseguido.

À Cristina M. Fajardo, nossa técnica, por todo auxílio e companhia.

Aos meus familiares, em especial ao meu irmão, que me aturou com imensa compreensão e apoio, nos altos e baixos, sempre me motivando, e aos meus pais pelo suporte dado durante essa jornada que é a pós-graduação. Amo vocês.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos pacientes que participaram deste estudo.

Aos pesquisadores e funcionários do setor de Pesquisa Clínica do Hospital do Rim e Hipertensão da Universidade Federal de São Paulo, pela valiosa colaboração nesse trabalho.

“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”
George Bernard Shaw

BONEZI, Vivian. **Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica de imunossupressores e de microRNAs reguladores, com a resposta terapêutica em transplantados renais**. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RESUMO

Introdução: Os imunossupressores das classes inibidores da calcineurina (tacrolimo) e da rapamicina (sirolimo) requerem controle terapêutico por apresentarem grande variabilidade farmacocinética que tem sido atribuída a fatores genéticos, entre outros. Poucos estudos avaliaram a expressão de genes alvo de imunossupressores e sua relação com a resposta terapêutica. **Objetivo:** Estudar a relação entre o perfil de expressão de genes alvos de tacrolimo e sirolimo e de microRNAs reguladores e a resposta à imunossupressores utilizados na profilaxia de rejeição ao transplante renal. **Métodos:** Participaram deste estudo 37 indivíduos submetidos ao transplante renal, no Hospital do Rim e Hipertensão da UNIFESP, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos e de qualquer etnia. Os pacientes foram tratados com esquema imunossupressor contendo tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona até o 3º mês quando foram randomizados para manter a terapia inicial (grupo TAC) ou para a conversão para sirolimo (grupo SRL). Os pacientes com disfunção renal ou suspeita de rejeição, no 3º mês, seguiram o tratamento inicial e foram avaliados em separado (grupo TACex). Os parâmetros de função renal e concentração sanguínea dos fármacos foram utilizados para monitoramento da terapia. A expressão de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em leucócitos do sangue periférico, foi analisada por PCR em tempo real; e a expressão de miR-99a, miR-100, miR-145, miR-30a, miR-10b e miR-103a foi avaliada por *PCR Array*. **Resultados:** No primeiro mês de tratamento, a expressão diferencial de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA* e *FKBP1B* diminuiu em relação ao pré-transplante (pre-Tx) ($p < 0,05$). Esse efeito se manteve, no 3º mês, para *MTOR* e *PPP3CA* ($p < 0,05$). A expressão diferencial de *PPP3CB*, *FKBP1A* e *FKBP5* não foi alterada pelos tratamentos ($p > 0,05$). No 6º mês, os grupos TAC, TACex e SRL apresentaram perfil de expressão diferencial de mRNA similar à do pre-Tx ($p > 0,05$). No 3º mês, foram encontradas correlações positivas entre a expressão relativa de *PPP3CB* e creatinina sérica ($r = 0,49$, $p = 0,04$), e entre a expressão de *FKBP1A* e ureia ($r = 0,49$, $p = 0,04$), HDL colesterol ($r = 0,53$; $p = 0,02$) e triglicérides ($r = 0,68$, $p = 0,003$) no soro. O perfil de expressão relativa de mRNA não se correlacionou com a concentração sanguínea de tacrolimo ($p > 0,05$). Houve redução na

expressão diferencial de miR-99a, no 3º mês, comparado com o pre-Tx ($p < 0,05$) e a dos outros miRNAs não foi alterada. Não foi observada correlação entre o perfil de expressão relativo de miRNAs e mRNAs alvo, no 3º mês ($p > 0,05$). **Conclusão:** A expressão diferencial de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA* e *FKBP1B* e de miR-99a que tem como alvo o mRNA de *MTOR*, em leucócitos do sangue periférico, é modulada pelo tratamento imunossupressor a base de tacrolimo. A expressão diferencial de genes da via da calcineurina e do mTOR é sugestiva de sua potencial aplicação no monitoramento da terapia a base de tacrolimo.

Palavras-chave: Transplante renal; Tacrolimo; Sirolimo; Farmacogenômica; Imunossupressores; Expressão gênica; microRNAs

BONEZI, Vivian. **Relationship between the expression profile of genes involved on immunosuppressants pharmacodynamics, and regulatory microRNAs with therapeutic response in renal transplant.** 2015. 99p. Dissertation (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT

Background: Immunosuppressive classes like calcineurin inhibitors (tacrolimus) and rapamycin (sirolimus) require therapeutic control because they have great pharmacokinetic variability that has been attributed to genetic factors, among others. Few studies have evaluated the expression of immunosuppressive target genes and their relation to therapeutic response. **Objective:** To study the relationship between the gene expression profile of tacrolimus and sirolimus targets and regulatory microRNAs with the response to immunosuppressive agents used in the prophylaxis of renal transplant rejection.

Methods: This study included 37 patients undergoing kidney transplantation at the Hospital do Rim e Hipertensao/UNIFESP, age over 18 year old, both gender and any ethnicity. Patients were treated with an immunosuppressive regimen containing tacrolimus, mycophenolate sodium and prednisone during 3 months, when they were randomized to maintain the initial therapy (TAC group) or to convert to sirolimus (SRL group). Patients with renal dysfunction or signals of rejection in the 3rd month followed the initial treatment and were evaluated separately (TACex group). Parameters of renal function and blood concentration of immunosuppressive drugs were used to monitor therapy. The mRNA expression of *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* and *FKBP5* in peripheral blood leukocytes was analyzed by real-time PCR; and the expression of miR-99a, miR-100, miR-145, miR-30a, miR-10b and miR-103a was evaluated by PCR array. **Results:** In the first month of treatment, the differential mRNA expression of *MTOR*, *PPP3CA* and *FKBP1B* decreased relative to pre-transplant (pre-Tx) ($p < 0.05$). This effect was maintained up to 3 month to *MTOR* and *PPP3CA* ($p < 0.05$). The differential expression of *PPP3CB*, *FKBP1A* and *FKBP5* was not affected by treatments ($p > 0.05$). On the 6th month, the TAC groups, TACex and SRL showed differential expression profile of mRNA similar to the pre-Tx ($p > 0.05$). On the 3rd month, positive correlations were found between the relative expression *PPP3CB* and serum creatinine ($r = 0.49$, $p = 0.04$) and between the expression of *FKBP1A* and urea ($r = 0.49$,

p=0.04), HDL cholesterol (r=0.53; p=0.02) and triglycerides (r = 0.68, p = 0.003) in serum. The relative mRNA expression profile was not correlated with tacrolimus blood concentrations (p> 0.05). There was a reduction in the differential expression of miR-99a, on the 3rd month, compared to the pre-Tx (p <0.05) and the other miRNAs has not changed. There was no correlation between the expression profile of miRNAs and mRNAs on target, on the 3rd month (p> 0.05). **Conclusions:** The differential expression of mRNA of *MTOR*, *PPP3CA* and *FKBP1B* and miR-99a which targets *MTOR* mRNA in peripheral blood leukocytes, is modulated by the immunosuppressant tacrolimus treatment base. The differential expression of genes of the calcineurin and mTOR is suggestive of their potential application in monitoring therapy tacrolimus base.

Keywords: Kidney transplantation; tacrolimus; sirolimus; pharmacogenetics; immunosuppressants; Gene expression; microRNAs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de mecanismos de ação de imunossupressores tacrolimo e sirolimo e dos miRNAs avaliados neste estudo (Samaniego, Becker e Djamali, 2006).	3
Figura 2. Fluxograma de esquemas terapêuticos dos pacientes submetidos ao transplante renal. TAC: tacrolimo; MPS:	13
Figura 3. Valores de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência, em leucócitos totais de pacientes transplantados renais, obtidos por qPCR.....	26
Figura 4. Curvas-padrão de qPCR para análise de expressão de mRNA de <i>MTOR</i> , <i>PPP3C</i> , <i>PPP3CB</i> , <i>FKBP1A</i> , <i>FKBP1B</i> e <i>FKBP5</i> , em leucócitos totais de pacientes transplantados renais.	27
Figura 5. Curvas-padrão de qPCR para análise de expressão de mRNA de <i>B2M</i> e <i>UBC</i> , em leucócitos totais de pacientes transplantados renais.	27
Figura 6. Expressão relativa de mRNA de <i>MTOR</i> , <i>PPP3CA</i> , <i>PPP3CB</i> , <i>FKBP1A</i> , <i>FKBP1B</i> e <i>FKBP5</i> , em leucócitos totais, antes do transplante renal.	29
Figura 7. Expressão diferencial de mRNA de <i>MTOR</i> , <i>PPP3CA</i> , <i>PPP3CB</i> , <i>FKBP1A</i> , <i>FKBP1B</i> e <i>FKBP5</i> , em leucócitos totais de pacientes submetidos a transplante renal, nos seis primeiros meses de terapia imunossupressora.	30
Figura 8. Expressão relativa de miR-99a, miR-100, miR145, miR-30a, miR-10b e miR-103a em leucócitos totais, antes do transplante renal.	32
Figura 9 . Expressão diferencial de miR-99a, miR-100, miR145, miR-30a, miR-10b e miR-130a, em leucócitos totais de pacientes submetidos a transplante renal, ao longo dos tratamentos.	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados dos ensaios de qPCR para análise de expressão de mRNA.....	16
Quadro 2. Dados dos ensaios de qPCR de genes de referência	17
Quadro 3. Dados de ensaios de PCR <i>Array</i> para análise de expressão de microRNAs	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos de receptores de transplante renal	23
Tabela 2. Doses diárias e concentrações sanguíneas nos 6 primeiros meses pós-transplante	24
Tabela 3. Perfil metabólico e de função renal dos receptores de transplante renal dos grupos TAC e SRL	25
Tabela 4. Dados da eficiência dos ensaios de expressão mRNA por qPCR.....	28
Tabela 5. Correlação entre a expressão relativa de mRNA e concentração de tacrolimo, parâmetros de função renal e perfil metabólico, no 3º mês de tratamento.....	31
Tabela 6. Correlação entre a expressão relativa de miRNAs e mRNAs alvo, no 3º mês de tratamento com tacrolimo	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIP	<i>Brazilian Initiative Program</i>
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
cDNA	DNA complementar
CNI	Inibidores da calcineurina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FKBPs	Proteínas de ligação intracelular ou imunofilinas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alto peso molecular
HLA	Antígeno leucocitário Humano
HMBS	Hidroximetilbilano sintase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HRH	Hospital do Rim e Hipertensão
IL-2	Interleucina-2
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
miRNA	microRNA
MPS	Micofenolato de Sódio
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NFAT	Fator nuclear de ativação da célula T
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PPP3C	Proteína fosfatase 3 catalizadora
PPP3R	Proteína fosfatase 3 reguladora
Pré-Tx	Pré-transplante
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
SDHA	Succinato desidrogenase subunidade A
snRNA	RNA nuclear pequeno
SRL	Sirolimo
TAC	Tacrolimo
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
UBC	Ubiquitina C
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	9
1.1 Objetivo geral	9
1.2 Objetivos específicos	9
CASUÍSTICA E MÉTODOS	11
1.3 Casuística	11
1.4 Protocolo de tratamento	11
1.5 Amostras biológicas	13
1.6 Aspectos éticos	14
1.7 Métodos	14
1.7.1 Parâmetros laboratoriais	14
1.7.2 Dosagem dos imunossuppressores	14
1.7.3 Extração e avaliação de RNA total	15
1.7.4 Análise da expressão gênica	15
1.7.4.1 Genes de estudo	15
1.7.4.2 Eficiência dos ensaios de qPC	16
1.7.4.3 Seleção do gene de referência	16
1.7.4.4 Controle de qualidade de qPCR	17
1.7.5 Análise da expressão de microRNAs	18
1.7.5.1 Seleção dos microRNAs	18
1.7.5.2 Análise de microRNAs por PCR em tempo real	18
1.8 Análise estatística	19
RESULTADOS	21
1.9 Características demográficas, clínicas e de monitoramento terapêutico	21
1.10 Resultados de otimização dos ensaios de qPCR	26
1.11 Perfil de expressão gênica em leucócitos	28
1.12 Perfil de expressão de miRNAs em leucócitos	32
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	55

INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma enfermidade caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função dos rins, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade pelo mundo (Felipe *et al.*, 2002; Kirchner *et al.*, 2011).

Em seus estágios avançados, são necessárias terapias de substituição da função renal, a fim de manter a homeostase corpórea, como é o caso da hemodiálise, da diálise peritoneal e do transplante (Goldfarb-Rumyantzev *et al.*, 2005). Este último apresenta-se em relação às demais, como uma alternativa de menor custo (Yost e Kaplan, 2013), melhor qualidade de vida e maior sobrevida aos pacientes (Favi *et al.*, 2011) sendo, por tanto, o tratamento de escolha em estágios avançados da DRC (Schaefer, 2012).

Além dos benefícios ao paciente, o transplante também possui um impacto positivo sobre o sistema de saúde, uma vez que em comparação com o custo de diálise, economiza mais de 300 mil dólares por paciente ao longo de 5 anos (Levy, 2010).

O Brasil é o segundo país em número absoluto de transplantes renais, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, ocorreram 5433 transplantes renais no ano de 2013, 57% a mais do que na década anterior. (Abto, 2013).

Embora o desfecho a curto e médio prazo do transplante de órgãos tenha melhorado significativamente (Gaston, 2011), pouco progresso foi obtido no que se diz respeito à manutenção a longo prazo do órgão transplantado (Chandran e Vincenti, 2013). A sobrevida média de enxertos de renais provenientes de doadores vivos é de apenas 11,9 anos e daqueles provenientes de doadores falecidos é de apenas 8,8 anos (Lamb, Lodhi e Meier-Kriesche, 2011).

Rejeições mediadas por anticorpos, falta de adesão a terapia, infecções e nefrotoxicidade causada por imunossupressores são as principais causas de insucesso do transplante (Meier-Kriesche *et al.*, 2001; Sellarés *et al.*, 2012; Galindo Sacristán *et al.*, 2013).

Um importante fator que contribui na longevidade do órgão transplantado, reduzindo esses agravantes, é o manejo adequado do regime imunossupressor, que deve combinar diferentes fármacos, ministrados em doses que possibilitem a

prevenção da rejeição do enxerto, causando o mínimo possível de eventos adversos (Ponticelli, 2011).

Imunofarmacologia

A fim de bloquear as diferentes cascatas da resposta imune ao enxerto, os protocolos terapêuticos usuais baseiam-se na combinação de múltiplos imunossupressores; podendo incluir inibidores da calcineurina (CNI), agentes anti-proliferativos, corticosteróides, fármacos que atuam sobre o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e anticorpos mono e policlonais (Halloran, 2004; Singh, Nori e Pesavento, 2009).

A escolha entre esses diferentes agentes e suas dosagens baseia-se no risco/benefício oferecido para cada paciente e é um grande desafio na clínica médica (KDIGO, 2009).

O crescente uso do tacrolimo, um CNI, na década de 1990 e a sua subsequente combinação com o agente antiproliferativo, micofenolato de mofetil, reduziu as taxas de rejeição aguda no primeiro ano pós-transplante de 80% para cerca de 15% (Vincenti, 2004). No entanto, a exposição crônica aos CNI tem sido apontada como a principal causa de deterioração da função do enxerto, estando diretamente associada com a presença de nefrotoxicidade e outros eventos adversos (Salvadori e Bertoni, 2013).

Como uma tentativa de prevenir os efeitos nefrotóxicos dos CNI, fármacos inibidores da via mTOR, tais como o sirolimo e o everolimo, são por vezes utilizados em combinação aos CNI ou em substituição aos mesmos nos regimes imunossupressores (Heilman *et al.*, 2012; Kandula *et al.*, 2012).

Embora tenham diferentes mecanismos de ação, os CNI e inibidores de mTOR atuam sobre a mesma célula do sistema imune, os linfócitos T (**Figura 1**). Para exercerem seus efeitos, ambos os fármacos interagem com uma família de proteínas de ligação intracelular FK (FKBPs), denominadas imunofilinas. Essa interação, por sua vez, resulta na formação de um complexo imunossupressor responsável por modular a atividade de outros alvos intracelulares, específicos para cada fármaco (Samaniego, Becker e Djamali, 2006).

Dezesseis diferentes FKBP são expressas em humanos, e embora partilhem similaridades em sua sequência, distribuição em tecidos e afinidade ao tacrolimo,

somente algumas destas parecem estar envolvidas na resposta imunossupressora (Lam *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2002). Weiwad e colaboradores demonstraram através de um estudo *in vitro* utilizando células Jurkat, que os complexos formados entre o tacrolimo e as imunofilinas FKBP12, FKBP12.6 e FKBP51, codificadas pelos genes *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5* respectivamente, participam do processo de imunossupressão mediado por este fármaco (Weiwad *et al.*, 2006).

Figura 1. Esquema de mecanismos de ação de imunossupressores tacrolimo e sirolimo e dos miRNAs avaliados neste estudo (Samaniego, Becker e Djamali, 2006). mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; FKBP: proteínas de ligação intracelular FK ou imunofilinas; MPA: ácido micofenolato; LFL: leflunomida; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; TRC: receptores de células T.

Acredita-se que, por ser estruturalmente relacionado com o tacrolimo, o sirolimo se ligue às mesmas FKBP (Woltman *et al.*, 2001). Porém, vários estudos afirmaram que apenas o sirolimo é capaz de formar complexo com a FKBP12 e, desta forma, exercer seu efeito imunossupressor (Jayaraman e Marks, 1993; Vilella-Bach *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2002; Sehgal, 2003). Recentemente foi demonstrado que o sirolimo

também se liga a FKBP51, cujo complexo também tem efeito antiproliferativo (März *et al.*, 2013).

O complexo sirolimo-FKBP se liga ao mTOR, uma proteína, codificada pelo gene *MTOR*, essencial para a regulação negativa do crescimento e da proliferação celular. Dessa forma, a interação sirolimo-FKBP inibe o sinal de transdução das vias de proliferação e ativação de linfócitos T mediadas pelo mTOR, impedindo a passagem da fase G1 para S no ciclo celular (Sehgal, 2003).

Já o conjunto tacrolimo-FKBP forma um complexo ternário com a fosfatase calcineurina, que perde a capacidade de desfosforilar a subunidade citoplasmática do fator nuclear de ativação da célula T (NFAT). Sem essa desfosforilação, a translocação do NFAT para o núcleo é bloqueada, e a transcrição de vários genes é impedida, entre eles o gene que codifica a interleucina 2 (IL-2), uma citocina que participa ativamente da ativação do linfócito T (Xu *et al.*, 2002).

A calcineurina é um heterodímero composto por uma subunidade catalítica, a calcineurina A, e uma subunidade reguladora, a calcineurina B. A calcineurina A, também conhecida como proteína fosfatase 3 catalisadora (PPP3C), tem três isoformas codificadas por três diferentes genes (*PPP3CA*, *PPP3CB* – expressos em diversos tecidos e órgãos – e *PPP3CC* – expresso somente nos testículos). A calcineurina B é também denominada proteína fosfatase 3 reguladora (PPP3R), e tem duas isoformas codificadas por genes distintos (*PPPR1* e *PPPR2*) (Rusnak e Mertz, 2000; Poirier *et al.*, 2003).

Além de partilharem de mecanismos de ação complementares, o tacrolimo e o sirolimo apresentam baixa disponibilidade oral (Tacrolimo: 25%, sirolimo: 15%) (Mourad *et al.*, 2005; Yu, Wu e Zheng, 2006), baixo índice terapêutico e podem causar vários efeitos colaterais (Shihab *et al.*, 2014). Desta forma, os regimes imunossupressores contendo tacrolimo ou sirolimo requerem um manejo intensivo na tentativa de preservar a função do enxerto, evitar episódios de rejeição e prevenir as reações adversas (Shihab *et al.*, 2014).

Expressão gênica e Farmacogenômica

Assegurar a eficácia terapêutica com o mínimo possível de reações adversas é um desafio constante na prática clínica, especialmente devido às características próprias de cada paciente (Knops *et al.*, 2013).

Atualmente, o monitoramento terapêutico, no qual a dose é ajustada de acordo com as concentrações plasmáticas do fármaco, têm sido a ferramenta rotineiramente utilizada para a individualização da terapia imunossupressora (Zhao, Fakhoury e Jacqz-Aigrain, 2010). Entretanto, embora seja uma abordagem capaz de reduzir variabilidades farmacocinéticas interpessoais, o monitoramento terapêutico só pode ser aplicado após a administração do medicamento ao paciente, de forma que doses iniciais inadequadas, só serão ajustadas após se atingir um estado de equilíbrio plasmático, expondo o paciente à riscos de rejeição e toxicidade neste período (Kuypers, 2005).

Variabilidades na resposta imunossupressora têm sido atribuídas tanto a fatores genéticos quanto a não genéticos, sendo os primeiros, capazes de contribuir de 20 a 95% com alterações na biodisponibilidade e no efeito de fármacos (Zaza *et al.*, 2010).

Variações na sequência de DNA ou na expressão gênica de moléculas envolvidas na farmacocinética ou na farmacodinâmica de medicamentos podem alterar a sua resposta, diminuindo ou aumentando a atividade do fármaco (Krejsa, Rogge e Sadee, 2006). Nesse contexto, a farmacogenômica surge como uma estratégia promissora no auxílio da otimização e individualização da terapêutica (Macphee, 2010).

Como revisado por Felipe e colaboradores, polimorfismos no gene do citocromo P450 3A5 (*CYP3A5*) levam a alterações na farmacocinética do tacrolimo e sirolimo. Portadores do alelo não funcional *CYP3A5**3 apresentam maiores concentrações sanguíneas de tacrolimo e necessitam de doses mais baixas para alcançar a faixa terapêutica quando comparados com portadores do alelo funcional *CYP3A5**1. O alelo *CYP3A5**3 também está relacionado com maior concentração corrigida pela dose (concentração/dose) de sirolimo, e os portadores também requerem menores doses para atingir concentrações plasmáticas alvo (Rosso Felipe *et al.*, 2009).

Santoro e colaboradores ressaltaram, entretanto, que devido à miscigenação da população brasileira, outras variantes, como os alelos *CYP3A5**6 e *7 - mais frequentes na população africana - sejam avaliados conjuntamente com a variante *CYP3A5**3 -

mais comum na população européia e asiática (Santoro *et al.*, 2011). Os autores sugeriram que análises farmacogenômicas, específicas da nossa população, possam contribuir mais efetivamente na prática clínica de receptores de transplante renal.

Recentemente, nosso grupo avaliou a influência de polimorfismos nos genes de carreadores de solutos *SLCO1B1* e *SLCO2B1* na farmacocinética do tacrolimo em transplantados renais brasileiros, e verificou que portadores do alelo variante *SLCO1B1**1b apresentaram menor razão concentração/dose de tacrolimo e menor incidência de rejeição aguda quando comparados com os outros alelos (*1-A, 5* e *15) (Alves *et al.*, 2014).

Perfis de expressão gênica pré-tratamento podem ser usados para caracterizar previamente subtipos de pacientes e identificar fatores associados com a variabilidade da resposta terapêutica e da taxa de efeitos adversos. Além disso, o conhecimento da expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta farmacológica pode contribuir para a elucidação de mecanismos moleculares e levar à identificação de genes candidatos para futuros estudos de farmacoterapia (Krejsa, Rogge e Sadee, 2006).

Um estudo que avaliou a relação entre a expressão gênica em leucócitos, duas horas após a ingestão de ciclosporina, e a ocorrência de reações adversas em pacientes transplantados renais, encontrou uma correlação negativa entre a expressão de genes regulados pelo NFAT (*IL-2*, *IFN- γ* , *GM-CSF*) e a taxa de ocorrência de infecções e malignidades (Sommerer *et al.*, 2006). Estudos mais recentes, também encontraram resultados similares em pacientes submetidos ao transplante hepático fazendo uso de ciclosporina ou de tacrolimo (Zahn *et al.*, 2011; Billing *et al.*, 2012; Steinebrunner *et al.*, 2014).

Cerca de 20-40% dos pacientes com síndrome nefrótica não respondem ao tratamento com corticosteróides embora apresentem sinais clínicos e bioquímicos semelhantes aos demais pacientes. Recentemente, foi proposto que a expressão da glicoproteína-P (codificada pelo gene *ABCB1*), em biópsias renais, apresenta uma relação positiva com a presença de resistência a estes fármacos (Türkmen *et al.*, 2013). Da mesma forma, biópsias de transplantados renais resistentes ao tratamento com corticosteróides apresentaram maior expressão de metalotioneínas reguladoras de zinco em relação aos não resistentes (Rekers *et al.*, 2013).

Estes achados reforçam a aplicabilidade de estudos de expressão gênica no manejo terapêutico em transplantes, sugerindo a importância de se avaliar a expressão

dos genes que participam da farmacodinâmica dos inibidores de mTOR e de calcineurina.

microRNAs e Farmacogenômica

Como comentado anteriormente, a expressão gênica parece desempenhar um importante papel na resposta farmacológica. Fatores capazes de alterar o perfil de expressão podem, portanto, contribuir para a variabilidade observada na resposta à farmacoterapia.

Vários mecanismos estão envolvidos na regulação da expressão gênica, dentre eles os epigenômicos, que incluem a metilação de DNA, a desacetilação de histonas e modificações pós-transcricionais mediadas por microRNAs (miRNAs) (Pallet e Thervet, 2012). Recentemente, os miRNAs vêm ganhando importância em estudos de farmacogenômica, principalmente com a classe dos antineoplásicos, e também com antidepressivos (ex: carbonato de lítio), betabloqueadores (ex: propranolol) e outros (Shomron, 2010; Zhang e Dolan, 2010; Rukov e Shomron, 2011; Rukov, Vinther e Shomron, 2011; Dreussi *et al.*, 2012).

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de RNA, constituídas de cerca de 19-25 nucleotídeos não codificadores, transcritas no núcleo e que após o processamento e exportação para o citoplasma controlam a expressão gênica por ligação a mRNA alvos, degradando-os ou reduzindo a eficiência de sua tradução (Shyu, Wilkinson e Van Hoof, 2008). Um único miRNA pode regular a expressão de diversos genes e, de forma similar, um único gene pode ser modulado por diversos miRNAs (Baek *et al.*, 2008).

Vários processos biológicos, tais como o desenvolvimento, proliferação, diferenciação e apoptose celular, foram relatados serem regulados por miRNAs (Belver, Papavasiliou e Ramiro, 2011). Dados também sugerem um papel crítico dos miRNAs na regulação da diferenciação e atividade de células imunológicas e na modulação das respostas imune inata e adaptativa (Sonkoly, Ståhle e Pivarcsi, 2008).

O aumento da expressão de miRNAs pode regular negativamente a atividade de genes que participam da resposta farmacológica, como transportadores de fármacos, seus receptores e suas enzimas de biotransformação, diminuindo suas atividades. Da mesma forma, a diminuição na expressão de miRNAs pode levar a um aumento na expressão desses genes, e por conseguinte, aumento em sua função. Ambos os

processos influenciam na eficácia e toxicidade de um fármaco, tornando os miRNAs reguladores indiretos, mas importantes, na resposta terapêutica (Rukov e Shomron, 2011).

Por exemplo, o gene *ABCG2*, que codifica um transportador de efluxo de fármacos, transporta entre outros, a mitoxantrona, um fármaco antineoplásico, através da membrana plasmática (Fetsch *et al.*, 2006). Este gene demonstrou ser regulado pelo miR-328, de modo que em células da linhagem de câncer de mama MCF-7, foi verificado que o aumento nos níveis de expressão de miR-328 estão relacionados ao aumento na sensibilidade à mitoxantrona, enquanto a depleção do miR-328 confere resistência à mesma (Pan, Morris e Yu, 2009).

A ocorrência de miRNAs no plasma, urina e outros fluidos corpóreos, favorece a sua utilização na busca por potenciais biomarcadores (Gupta, Bang e Thum, 2010) e sugere que suas funções biológicas não se limitam apenas às células onde são processados (Lawrie, 2010).

Perfis de expressão de miRNAs circulantes demonstraram serem capazes de prever a função e rejeição de enxertos renais. Pacientes transplantados renais, caracterizados com rejeição aguda, apresentaram maior expressão dos miR-142-5p, miR-155, e miR-223 em células mononucleares do sangue periférico, em comparação aos com enxerto funcional (Anglicheau *et al.*, 2009).

Da mesma forma, outra análise utilizando urina de transplantados renais, identificou menor expressão de miR-10a, miR-10b e miR-210 em pacientes com rejeição aguda em relação aos com enxerto funcional. Além disso, a menor expressão do miR-210 na sexta semana pós-transplante também foi associada com pior prognóstico na função do enxerto (menores taxas de filtração glomerular estimadas – TFGe- após 1 ano (Lorenzen *et al.*, 2011).

O estudo de miRNAs capazes de regular os genes das moléculas alvo e vias de sinalização dos inibidores de mTOR e de calcineurina podem, portanto, auxiliar na elucidação de mecanismos e vias de sinalização envolvidos na resposta a imunossupressores e contribuir para o manejo da farmacoterapia de transplantados renais, tornando-a mais eficaz e segura.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Estudar a relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica do tacrolimo e do sirolimo e de microRNAs reguladores, com a resposta à imunossupressores utilizados na profilaxia de rejeição ao transplante renal.

1.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da terapia imunossupressora com tacrolimo ou convertida para sirolimo sobre a expressão de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em sangue periférico de pacientes submetidos ao transplante renal.
- Investigar os efeitos da terapia imunossupressora com tacrolimo ou convertida para sirolimo sobre a expressão de miR-99a, miR-100, miR-145, miR-30a, miR-10b e miR-103a, em sangue periférico de pacientes submetidos a transplante renal.
- Avaliar a correlação entre os perfis de expressão de mRNA e microRNAs.
- Avaliar a correlação dos perfis de expressão de mRNA de genes alvo e de microRNAs com a resposta aos imunossupressores, função renal, rejeição ao transplante e perfil metabólico.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1.3 Casuística

Este é um subprojeto do protocolo “Estudo randomizado, aberto, multicêntrico para avaliar a eficácia e a segurança de um regime imunossupressor com base em sirolimo introduzido aos três meses após o transplante renal, em comparação com um regime contínuo com base em tacrolimo, em pacientes com transplante renal de Novo (*Brazilian Initiative Program – BIP*)” desenvolvido no Hospital do Rim e Hipertensão (HRH) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Trata-se de um projeto prospectivo com duração de 24 meses, multicêntrico, randomizado, controlado e de grupos paralelos em receptores *de novo* de transplante renal, está registrado no ClinicalTrials.gov. (Id: NCT01802268) e foi realizado em conformidade com as Boas Práticas Clínicas e com a Declaração de Helsinki, tendo sido aprovado nos comitês de ética dos centros participantes.

Para este estudo foram selecionados 37 pacientes com mais de 18 anos, beneficiários do primeiro transplante de rim proveniente de doadores não-HLA idênticos, falecidos por morte cerebral ou relacionados com vida, com não mais de 65 anos. Os pacientes receberam um órgão ABO-compatível com prova cruzada citotoxicidade dependente de complemento (CDC) negativa e anticorpos reativos contra painel de antígenos inferior a 30%. Todas as pacientes concordaram em usar métodos contraceptivos durante o estudo e até 3 meses após a descontinuação do estudo.

Não foram incluídos pacientes com DRC devido a glomeruloesclerose focal e segmentar e glomerulonefrite membranoproliferativa, bem como pacientes com infecção ativa ou positivos para hepatite B ou C, ou vírus da imunodeficiência humana ou com história prévia de doença maligna. Também não foram incluídos pacientes com anormalidades hematológicas ou alterações metabólicas acentuadas.

1.4 Protocolo de tratamento

Em até 48 h após o transplante, os pacientes foram tratados com tacrolimo (0,1-0,2 mg/kg/dia), micofenolato de sódio com revestimento entérico (1440 mg/dia) e prednisona (dose inicial de 500 mg, 30 mg/dia na primeira semana, 20 mg/dia na

segunda semana, 15 mg/dia na terceira semana pós-transplante e, posteriormente, 10 mg/dia). As doses de tacrolimo foram ajustadas para manter concentrações sanguíneas entre 5 e 15 ng /mL. Alguns pacientes também receberam tratamento de indução com basiliximab e metilprednisolona antes da reperfusão do enxerto, de acordo com a prática local.

No terceiro mês pós-transplante, os pacientes foram randomizados em dois grupos, de acordo com o tipo de doador (falecido/vivo) usando sequências geradas por computador. Um grupo foi mantido na terapia com tacrolimo (grupo TAC) e um grupo sofreu conversão de tacrolimo para sirolimo (grupo SRL).

No grupo SRL, o tratamento com tacrolimo foi interrompido no dia da conversão e o sirolimo foi administrado na dose inicial de 5 mg/dia nos dois primeiros dias, seguido de manutenção de 3 mg/dia por 7 dias e, posteriormente, ajustada para atingir concentrações plasmáticas dentre 10 e 15 ng/mL.

Na fase de conversão, os pacientes que apresentaram alterações clínico-laboratoriais relevantes, tais como taxa de filtração glomerular estimada (TGFe) inferior a 40 mL/min/1,73m², razão proteína/creatinina superior a 0,5, rejeição aguda prévia Banff IIA ou superior, rejeição aguda nas últimas quatro semanas, qualquer evento de cicatrização de, ou que, a critério do investigador, não foram randomizados para o grupo SRL, e seguiram com o esquema a base de tacrolimo (grupo TACex) (**Figura2**).

Figura 2. Fluxograma de esquemas terapêuticos dos pacientes submetidos ao transplante renal. TAC: tacrolimo; MPS:

1.5 Amostras biológicas

Amostras de sangue e urina foram obtidas, no Ambulatório do HRH da UNIFESP, pela equipe de enfermagem, antes e após o transplante renal (7 dias, 1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º mês).

As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacutainer™ (Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido) e tubos PAXgene™ Blood RNA (Preanalytix GmbH, Hombrechtikon, CH) para testes laboratoriais (uréia, creatinina,

glicemia, perfil lipídico e hemograma), dosagens dos fármacos, e extração de RNA total. As amostras de urina foram obtidas para avaliar a TFG_e (Silva *et al.*, 2013).

1.6 Aspectos éticos

Este estudo e o projeto de pesquisa principal BIP foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UNIFESP (protocolo nº 054/08) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP (protocolo no. 517). Os pacientes foram convidados a participar deste estudo pelo pesquisador responsável ou por um dos colaboradores que explicou o projeto, e após a concordância do voluntário e antes de qualquer procedimento, foi assinado por este o termo de consentimento livre e esclarecido, que foi elaborado de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde para pesquisa em seres humanos.

1.7 Métodos

1.7.1 Parâmetros laboratoriais

Para a determinação de creatinina, ureia, glicose, colesterol total, HDL colesterol e triglicérides foram empregados ensaios químicos utilizando o equipamento Olympus AU400 (Olympus Optical Co., Brasil). Essas determinações foram realizadas no Laboratório Central do HRH/UNIFESP. A TGF_e foi estimada pela fórmula de *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD).

1.7.2 Dosagem dos imunossupressores

A concentração sanguínea de tacrolimo foi dosada por imunoensaio *Chemoluminescent Microparticle Immunoassay* empregando-se o equipamento Architect plus I4000SR (Abbott Laboratories, EUA). A concentração sanguínea de sirolimo foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

1.7.3 Extração e avaliação de RNA total

O RNA total foi extraído de leucócitos do sangue periférico, empregando-se o sistema de extração *PAXgene™ Blood RNA Kit* seguindo o protocolo do fornecedor (QIAGEN, GmbH, Alemanha).

A integridade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese fluídica empregando-se o sistema *Agilent RNA 6000 NanoChip Kit* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA) e o equipamento *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA). As amostras de RNA apresentaram com valor de integridade superior ou igual a 5,0.

A pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria a 260 nm pelo *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA) e a sua quantificação foi realizada por fluorimetria utilizando-se o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras de RNA foram armazenadas a -80 °C.

1.7.4 Análise da expressão gênica

1.7.4.1 Genes de estudo

A expressão de mRNA dos genes *MTOR*, *PPPC3A*, *PPPC3B*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5* foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR). O cDNA foi sintetizado utilizando-se RNA (1 µl), oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen, Gathersburg, EUA), enzima *SuperScript II reverse transcriptase* e tampão (Invitrogen, Gathersburg, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de cDNA produzido foram armazenadas a -20°C.

O cDNA foi amplificado por qPCR utilizando o sistema *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), cujas especificações estão descritas no **Quadro 1**. Nos ensaios, utilizou-se 1 µL de cDNA, iniciadores 900 nM, sonda TaqMan® 250 nM e *Fast Universal® PCR Master Mix No AmpErase® UNG* (2x) (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) em volume final de 10 µL.

Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando o equipamento ABI Prism 7500 Fast (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por

60 s. Os dados foram analisados utilizando-se o programa System 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação.

A expressão relativa de mRNA foi calculada pela diferença entre o *cycle threshold* (Ct) do gene alvo e o Ct do gene referencia: $\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência})$. A expressão diferencial (*fold change*) foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando como referência a média dos valores do pre-transplante.

Quadro 1. Dados dos ensaios de qPCR para análise de expressão de mRNA

Gene	Código do ensaio	Sequência da sonda/Fluoróforo	Amplicon (pb)
<i>MTOR</i>	Hs00234508_m1	5'-CCCTCATGAGAGAATTCTGGGTCAT-MBG-NFQ-3'/FAM	103
<i>PPP3CA</i>	Hs00174223_m1	5'-TGGATTTGATGGTGCAACAGCTGCA-MBG-NFQ-3'/FAM	88
<i>PPP3CB</i>	Hs00917458_m1	5'-AGTCTTCTCTGTTCTCAGGGAGGAG-MBG-NFQ-3'/FAM	74
<i>FKBP1A</i>	Hs00356621_g1	5'-TGCACTACACCGGGATGCTTGAAGA-MBG-NFQ-3'/FAM	94
<i>FKBP1B</i>	Hs00997682_m1	5'-GCACTACACAGGAATGCTCCAAAAT-MBG-NFQ-3'/FAM	111
<i>FKBP5</i>	Hs01561006_m1	5'-AGCAACAGTAGAAATCCACCTGGAA-MBG-NFQ-3'/FAM	75

Nota: MGB: *minor groove binder*, NFQ: *non-fluorescent quencher*, FAM: fluoróforo 6-carboxifluoresceína.

1.7.4.2 Eficiência dos ensaios de qPC

Amostras de cDNA foram diluídas em série, na proporção 1:2 (concentração inicial de 50 ng/μl de RNA total) e testadas para os genes de estudo e de referencia com a finalidade de gerar as curvas-padrão dos ensaios de qPCR (Raeymaekers, 2000).

1.7.4.3 Seleção do gene de referência

O gene de referencia foi selecionado de um painel de genes disponível no laboratório utilizando amostras representativas das condições experimentais do estudo. Foram testados seis genes de referencia: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*), hidroximetilbilano sintase (*HMBS*), succinato desidrogenase subunidade A, (*SDHA*), ubiquitina C (*UBC*), hipoxantinafosforibosiltransferase-1 (*HPRT1*), β-2-microglobulina (*B2M*). As sequências dos iniciadores senso e anti-senso e das sondas

utilizadas nos ensaios de PCR estão descritas, no **Quadro 2**. Os ensaios de qPCR dos genes de referência foram realizados nas mesmas condições dos genes de estudo utilizando-se iniciadores com concentração final de 300 nM. Os dados de Ct dos ensaios foram analisados pelo programa GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) que permite identificar o gene referência mais estável para o estudo.

Quadro 2. Dados dos ensaios de qPCR de genes de referência

Gene		Sequências dos iniciadores	Amplicon (pb)
GAPDH	<i>Senso</i>	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'	230
	<i>Anti-senso</i>	5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICTCAGCCTTGACGGTGC-MGB-NFQ-3'	
HMBS	<i>Senso</i>	5'-GGCAATGCGGCTGCAA-3'	64
	<i>Anti-senso</i>	5'-GGGTAACCCACGCGAATCAC-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICCGGAAGAAAACAGCC-MGB-NFQ-3'	
UBC	<i>Senso</i>	5'-ATTGGGTGCGGTTCTTG-3'	133
	<i>Anti-senso</i>	5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICTCGTCACTTGACAATGC-MGB-NFQ-3'	
B2M	<i>Senso</i>	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'	86
	<i>Anti-senso</i>	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCT-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICCTCCACAGGTAGCTCT-MGB-NFQ-3'	
HPRT1	<i>Senso</i>	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	94
	<i>Anti-senso</i>	5'-GGTCCTTTTCACCAGGCT-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICCCTTGGTGAGGCAGTAT-MGB-NFQ-3'	
SDHA	<i>Senso</i>	5'-TGGAACAAGAGGGCATCTG-3'	86
	<i>Anti-senso</i>	5'-CCACCACTGCATCAAATTCATG-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICTCCATTTCTGCTCAGTATC-MGB-NFQ-3'	

Nota: MGB: *minor groove binder*, NFQ: *non-fluorescent quencher*, VIC: *vaccine-type-specific*, fluoróforo.

1.7.4.4 Controle de qualidade de qPCR

Para controle dos ensaios qPCR, foram utilizados controles negativos (sem amostra de cDNA) para averiguação de amplificação inespecífica. Os ensaios dos genes de estudo foram realizados em paralelo com o do gene de referência (Raeymaekers, 2000; Kubista *et al.*, 2006).

1.7.5 Análise da expressão de microRNAs

1.7.5.1 Seleção dos microRNAs

Neste estudo, também avaliamos os miRNAs que poderiam modular a expressão de mRNA dos genes estudados, principalmente durante os tratamentos com os imunossupressores. Para esta finalidade foi feita uma análise de utilizando o programa de bioinformática *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA®, QIAGEN Redwood City, CA, USA, www.qiagen.com/ingenuity), aplicando-se filtros para a seleção de miRNAs que tem como alvo os mRNAs estudados, com resultados validados em experimentos com leucócitos humanos.

Os miRNAs selecionados pelo IPA foram confirmados utilizando-se ferramentas disponíveis nas bases de dados miRTarBase (National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan) e TargetScan (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, EUA). Foram selecionados os miRNAs 99a-5p, 100-5p, 145-5p, 30a-5p, 10b-5p e 103a-3p.

1.7.5.2 Análise de microRNAs por PCR em tempo real

A análise de miRNAs foi realizada por qPCR utilizando-se amostras de RNA total e o sistema *miScript miRNA PCR Arrays* (Qiagen, Redwood City, CA, EUA). Para essa finalidade, o RNA total foi transformado em cDNA por reação de transcrição reversa usando o reagente *miScript II RT* (Qiagen, Redwood City, CA). O cDNA gerado foi adicionado a uma solução contendo *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, *miScript Universal Primer* e *RNase-Free Water* (Qiagen, Redwood City, CA, EUA) que foi posteriormente distribuída em volume de 25 µL por poço, em placa de *PCR Array*.

Cada placa possui 96 poços com iniciadores liofilizados e fixados para a amplificação dos 6 miRNAs selecionados (8 poços/placa para cada miRNA). Também contem iniciadores para amplificação de quatro snRNAs referencias: RNU6-2, SNORD61, SNOR68 e SNORD95 que são utilizados para a normalização da expressão (8 poços para cada snRNA). E 8 poços com o controle de reação de transcrição reversa (miRTC) e 8 com controle de eficiência da amplificação (PPC). No **Quadro 3**, são mostrados os miRNAs selecionados, bem como os demais componentes da placa de *PCR Array*.

Quadro 3. Dados de ensaios de PCR Array para análise de expressão de microRNAs

mRNA alvo	Identificação de microRNAs	Número de acesso em banco de dados*	Número de Catálogo
MTOR	hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	MS00032158
	hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	MS00031234
PPP3CA	hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	MS00003528
	hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	MS00007350
PPP3CB	hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	MS00031269
FKBP1A	hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	MS00031241
snRNAs de referencia	RNU6-2	37	MS00033740
	SNORD61	32	MS00033705
	SNORD68	33	MS00033712
	SNORD95	35	MS00033726
Controles	miRTC	SA_miRNA_005	MS00000001
	PPC	SA_00104	MS00000002

Nota: *<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

Para as análises do perfil de expressão dos miRNAs foi utilizado o programa de análise *miScript miRNA PCR Array Web-based software* (Qiagen, Redwood City, CA), disponível em: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna.n>. Para gerar os dados de expressão relativa de miRNA, o programa utiliza os valores de Ct médios de cada miRNA e os valores de Ct médios das referencias (snRNAs) para calculo do ΔCt . Também utiliza a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) considerando os dados de pré-transplante como referencia para o calculo de expressão diferencial (*fold change*).

1.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas *SPSS Statistics* para Windows, versão 17.0 (IBM, New York, EUA) e *GraphPad Prism* para Windows, versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As variáveis quantitativas paramétricas foram comparadas por teste *t* e por *One-way ANOVA* com

comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni e as variáveis quantitativas não paramétricas foram comparadas por Mann-Whitney e por Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste Dunns. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

1.9 Características demográficas, clínicas e de monitoramento terapêutico

As características demográficas e clínicas dos receptores de transplante renal que foram incluídos no estudo ($n=37$) estão descritas, na **Tabela 1**. A faixa etária média dos pacientes foi de $47,3 \pm 13,9$ anos e se observou maior prevalência de homens (67,6%) e de etnia branca (54,1%). Não foram observadas diferenças de idade, gênero, etnia e etiologia da DRC dos receptores de transplante renal entre os grupos TAC, SRL e TACex ($p>0,05$). As características dos doadores também não diferiram entre os três grupos ($p>0,05$). Nos seis primeiros meses de tratamento, foi observado 1 perda de enxerto e 1 óbito no grupo TAC, enquanto que nos grupos SRL e TACex estes desfechos não foram encontrados.

Na **Tabela 2**, são apresentados os dados de concentração sanguínea de tacrolimo e sirolimo e doses diárias de micofenolato de sódio e de prednisona. Nos primeiros três meses de tratamento pós-transplante, a concentração sanguínea de tacrolimo e a dose de prednisona diminuíram nos três grupos de tratamento ($p<0,05$). Nos três meses seguintes, os valores de concentração sanguínea e dose não se alteraram para nenhum dos fármacos entre os meses 4 e 6 ($p>0,05$). No 4º e 6º mês de tratamento, a concentração sanguínea de tacrolimo foi maior no grupo TACex do que o grupo TAC ($p<0,05$) (**Tabela 2**).

Na **Tabela 3**, estão descritos os dados de função renal (creatinina, ureia e TFG_e), perfil metabólico (glicemia e lipídeos), e hemograma (leucócitos totais e plaquetas) dos receptores de transplante renal dos grupos TAC, TACex e SRL, no pré-transplante, 3º e 6º mês de tratamento. As concentrações sérias de creatinina e ureia diminuíram a partir do 3º mês de tratamento em comparação com o pré-transplante, nos três grupos ($p<0,05$). Já os valores de TFG_e aumentaram neste mesmo período para todos os grupos ($p<0,001$). Nos grupos TAC e SRL, houve diminuição da glicemia ($p<0,05$) bem como um aumento da fração LDL colesterol ($p<0,05$). O colesterol total também apresentou aumento no grupo SRL em relação ao pré-transplante ($p<0,05$). Em relação ao hemograma, apenas o grupo TACex apresentou um aumento nos valores de hemoglobina ($p<0,05$).

Quando comparados os resultados de perfil metabólico, de função renal e hemograma entre os grupos TAC, TACex e SRL, no pré-transplante, 3º e 6º meses de

tratamento, é possível observar que os parâmetros estudados tiveram resultados similares entre os três grupos no pré-transplante e no 3º mês de tratamento com tacrolimo ($p > 0,05$), exceto pela uréia que se apresentou menor no grupo TACex no período pré-transplante em relação aos demais ($p = 0,006$). No 6º mês de tratamento, as concentrações séricas colesterol total e LDL colesterol foram maiores no grupo SRL comparado com o grupo TAC e com o grupo TACex ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos de receptores de transplante renal

Variável	TOTAL (37)	TAC (16)	TACex (10)	SRL (11)	P
Idade, anos	47,3 ± 13,9	52,0 ± 9,9	45,1 ± 17,5	42,3 ± 14,3	0,175
Gênero					
Mulheres	32,4 (12)	37,5 (6)	30,0 (3)	27,3 (3)	0,840
Homens	67,6 (25)	62,5 (10)	70,0 (7)	72,7 (8)	
Etnia					
Branco	54,1 (20)	62,5 (10)	60,0 (6)	36,4 (4)	0,682
Negro	10,8 (4)	6,3 (1)	10,0 (1)	18,2 (2)	
Pardo	32,4 (12)	25,0 (4)	30,0 (3)	45,5 (5)	
Asiático	2,7 (1)	6,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Doença renal crônica					
Hipertensão arterial	13,5 (5)	6,3 (1)	0,0 (0)	36,4 (4)	0,168
Diabetes	21,6 (8)	25,0 (4)	20,0 (2)	18,2 (2)	
Outras (*)	27,0 (10)	31,3 (5)	20,0 (2)	27,3 (3)	
Indeterminada	37,8 (14)	37,5 (6)	60,0 (6)	18,2 (2)	
Idade do doador	43,0 ± 9,7	47,0 ± 7,4	40,2 ± 12,5	39,7 ± 8,3	0,086
Gênero do doador					
Mulheres	43,2 (16)	56,3 (9)	40,0 (4)	27,3 (3)	0,318
Homens	56,8 (21)	43,8 (7)	60,0 (6)	72,7 (8)	
Etnia do doador					
Branco	71,4 (25)	73,3 (11)	66,7 (6)	72,7 (8)	0,844
Negro	11,4 (4)	6,7 (1)	11,1 (1)	18,2 (2)	
Pardo	17,1 (6)	20,0 (3)	22,2 (2)	9,1 (1)	
Asiático	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Parentesco do doador					
Relacionado	27,8 (10)	25,0 (4)	40,0 (4)	20,0 (2)	0,575
Não relacionado	72,2 (26)	75,0 (12)	60,0 (6)	80,0 (8)	
Tipo de doador					
Falecido	47,2 (17)	43,8 (7)	40,0 (4)	60,0 (6)	0,624
Vivo	52,8 (19)	56,3 (9)	60,0 (6)	40,0 (4)	
Perda do enxerto	2,7 (1)	6,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,509
Óbito	2,7 (1)	6,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,509

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas estão apresentadas como média ± desvio padrão e foram comparadas por *One-Way ANOVA*. Variáveis categóricas estão apresentadas como porcentagem e foram comparadas por teste qui-quadrado. (*) doença renal policística, mal formação do trato urinário, nefrite lúpica, síndrome nefrótica e doença hipertensiva específica da gravidez. Os valores de *p* representam a comparação entre os grupos TAC, TACex e SRL

Tabela 2. Doses diárias e concentrações sanguíneas nos 6 primeiros meses pós-transplante

	Grupo TAC (16)		Grupo TACex (10)		Grupo SRL (11)		p^2
	Tacrolimo (ng/mL)	Prednisona (mg/dia)	Tacrolimo (ng/mL)	Prednisona (mg/dia)	Tacrolimo (ng/mL)	Prednisona (mg/dia)	
7 dias	9,2 ± 4,5 ^a	30,0 ± 0,0 ^a	9,9 ± 4,6 ^a	13,0 ± 4,8 ^a	14,5 ± 8,2 ^a	29,0 ± 3,0 ^a	0,071
1º mês	7,3 ± 2,8 ^{a,b}	10,0 ± 2,6 ^b	8,9 ± 4,0 ^{a,b}	5,0 ± 0,0 ^b	6,2 ± 1,7 ^b	11,8 ± 3,3 ^b	0,127
2º mês	6,8 ± 1,8 ^{a,b}	5,0 ± 0,0 ^c	6,6 ± 3,0 ^{a,b}	8,0 ± 6,3 ^{a,b}	6,6 ± 2,9 ^b	5,0 ± 0,0 ^c	0,963
3º mês	5,6 ± 1,4 ^b	6,0 ± 3,8 ^c	5,9 ± 1,8 ^b	5,5 ± 1,5 ^b	6,4 ± 3,9 ^b	6,3 ± 4,5 ^c	0,684
p^1	0,014	<0,001	0,032	<0,001	<0,001	<0,001	
	Grupo TAC (16)		Grupo TACex (10)		Grupo SRL (11)		p^2
	Tacrolimo (ng/mL)	Prednisona (mg/dia)	Tacrolimo (ng/mL)	Prednisona (mg/dia)	Sirolimo (ng/mL)	Prednisona (mg/dia)	
4º mês	5,6 ± 1,4	5,0 ± 0,0	7,7 ± 3,0	5,5 ± 1,5	8,7 ± 3,0	5,0 ± 0,0	0,031
5º mês	6,2 ± 4,2	6,0 ± 3,8	6,8 ± 1,8	5,0 ± 0,0	8,1 ± 3,3	5,0 ± 0,0	0,700
6º mês	4,6 ± 2,1	6,0 ± 4,0	6,7 ± 2,4	5,0 ± 0,0	7,2 ± 2,1	5,0 ± 0,0	0,038
p^1	0,319	0,598	0,597	0,381	0,487	1,000	

Nota: Valores expressos em média ± desvio-padrão e comparados por *One-Way ANOVA* e comparações múltiplas por teste de Bonferroni. Letras diferentes na mesma coluna representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). p^1 : comparações entre os tempos para cada medicamento. P^2 : comparações das concentrações plasmáticas de tacrolimo entre os grupos.

Tabela 3 - Perfil metabólico e de função renal dos receptores de transplante renal dos grupos TAC e SRL

Variável	GRUPO TAC (16)				TACex (10)				SRL (11)				p2	p3	p4
	Pré-Tx	3º mês	6º mês	p1	Pré-Tx	3º mês	6º mês	p1	Pré-Tx	3º mês	6º mês	p1			
Creatinina ¹ (mg/dL)	8,4 (6,6-13,1) ^a	1,2 (1,0-1,5) ^b	1,2 (1,0-1,4) ^b	<0,001	8,4 (7,5-9,5) ^a	1,2 (1,0-1,6) ^b	1,2 (1,0-1,4) ^b	<0,001	8,1 (5,2-11,7) ^a	1,1 (0,9-1,3) ^b	1,2 (0,9-1,5) ^b	<0,001	0,764	0,483	0,931
Ureia ¹ (mg/dL)	137 (114-158) ^a	39 (35-48) ^b	43 (38-54) ^b	<0,001	93 (74-105) ^a	44 (33-57) ^b	42 (35-52) ^b	<0,001	89 (60-101) ^a	37 (34-47) ^b	38 (31-40) ^b	<0,001	0,006	0,696	0,149
TGFe ¹ (ml/min/1.73 m ²)	7 (2-8) ^a	70 (63-76) ^b	75 (67-80) ^b	<0,001	7 (3-8) ^a	63 (55-84) ^b	80 (59-95) ^b	<0,001	8 (5-9) ^a	71 (53-89) ^b	73 (49-96) ^b	<0,001	0,937	0,637	0,697
Glicose ¹ (mg/dL)	111 (89-127) ^a	96 (80-121) ^{a,b}	85 (78-96) ^b	0,035	94 (88-114)	86 (79-99)	86 (73-99)	0,215	98 (89-125) ^a	85 (75-88) ^{a,b}	80 (73-101) ^b	0,036	0,599	0,223	0,799
Colesterol Total ² (mg/dL)	171 (134-200)	181 (152-213)	183 (174-223) ^a	0,129	136 (124-172)	164 (129-268)	182 (169-203) ^a	0,189	150(36-233) ^a	161 (127-206) ^a	242 (219-255) ^b	<0,001	0,425	0,496	<0,001
HDL colesterol ²¹ (mg/dL)	41 (33-51)	38 (32-52)	44 (39-52)	0,425	37 (32-49)	37 (29-58)	47 (31-57)	0,681	36 (32-54)	46 (31-49)	40 (39-55)	0,666	0,981	0,871	0,934
LDL colesterol ² (mg/dL)	98 (65-111) ^a	111 (100-124) ^{a,b}	118 (100-134) ^b	0,022	81 (59-98)	88 (69-163)	95 (91-120)	0,273	82 (58-154) ^a	83 (44-123) ^a	149 (129-190) ^b	<0,001	0,692	0,146	<0,001
Triglicérides ² (mg/dL)	157 (113-189)	155 (102-221)	116 (93-204)	0,882	123 (87-143)	138 (98-244)	166 (87-251)	0,290	179 (118-231)	130 (93-170)	159 (139-277)	0,301	0,135	0,696	0,683
Hemoglobina ² (g/dL)	12,2 (11,7-13,93)	12,8 (11,2-14,1)	13,6 (12,0-16,1)	0,122	10,5 (9,8-12,8) ^a	13,4 (10,9-16,3) ^b	13,7 (12,0-18,1) ^b	0,025	12,8 (11,8-13,9)	11,8 (10,4-13,3)	12,7 (11,3-15,4)	0,649	0,122	0,456	0,323
Leucócitos ¹ (N/mm ³)	6750 (5350-8150)	5900 (4870-7600)	5600 (4500-7200)	0,331	6200 (3558-6800)	7260 (5488-8900)	6750 (5675-8108)	0,220	6300 (5700-8300)	4700 (4300-7600)	6700 (4900-7600)	0,455	0,233	0,710	0,797
Plaquetas ¹ (N/mm ³)	177 (157-217)	219 (186-287)	206 (159-266)	0,155	157 (150-223)	240 (189-300)	229 (176-286)	0,076	161 (135-281)	227 (175-258)	233 (207-270)	0,491	0,842	0,890	0,796

Nota: número de indivíduos entre parênteses. Pré-Tx: pré-transplante; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. TGFe: taxa de filtração glomerular estimada. Valores expressos em mediana (intervalo interquartilico). Variáveis comparadas por Kruskal-Wallis¹ ou por One-way ANOVA². p1: indica a comparação entre os tempos dentro dos grupos (letras diferentes indicam valores diferentes). p2: comparação do tempo pré-tx entre grupos. p3: comparação do terceiro mês pós-transplante entre grupos. p4: comparação do sexto mês pós-transplante entre grupos.

1.10 Resultados de otimização dos ensaios de qPCR

Para escolha do gene de referência foram testados os genes *GAPDH*, *HMBS*, *SDHA*, *UBC*, *HPRT1* e *B2M*. Na **Figura 3**, são apresentados os valores médios de estabilidade de expressão (M) desses genes, nos ensaios de qPCR, gerados pelo programa GeNorm®. Os menores valores M indicam maior estabilidade de expressão do gene, no modelo celular (leucócitos totais) e nas condições experimentais estudadas. Os genes *UBC* e *B2M* tiveram menor valor M e, portanto foram selecionados como referência na análise de expressão gênica.

Figura 3. Valores de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência, em leucócitos totais de pacientes transplantados renais, obtidos por qPCR.

Para a análise de expressão de mRNA dos genes de interesse, as amostras de cDNA foram diluídas de forma seriada 1:2, a partir de 400ng/μl de RNA total e os valores de Ct obtidos nos ensaios de qPCR foram plotados em gráfico para obtenção de curvas-padrão, apresentadas nas **Figuras 4 e 5**. A partir desses dados foram calculados os valores de inclinação da curva (*slope*) e de eficiência dos ensaios de qPCR.

Figura 4. Curvas-padrão de qPCR para análise de expressão de mRNA de *MTOR*, *PPP3C*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em leucócitos totais de pacientes transplantados renais.

Figura 5. Curvas-padrão de qPCR para análise de expressão de mRNA de *B2M* e *UBC*, em leucócitos totais de pacientes transplantados renais.

Para eficiência de 100% no ensaio de qPCR, o *slope* é de -3,32 e o valor do índice de correlação R^2 é 1,0. Os ensaios com boa eficiência têm valores percentuais de 90% a 110% que correspondem a *slopes* entre -3,58 e -3,10. Na **Tabela 4**, são apresentados dados de *slope*, R^2 e eficiência dos ensaios de qPCR para os genes estudados e de referencia. Como pode ser observado, todos os genes apresentaram valores dentro dos critérios estabelecidos, tendo adequada eficiência.

Tabela 4 - Dados da eficiência dos ensaios de expressão mRNA por qPCR

Gene	<i>Slope</i>	R^2	Eficiência (%)
<i>MTOR</i>	-3,241	0,992	103,5
<i>PPP3CA</i>	-3,32	0,952	100,1
<i>PPP3CB</i>	-3,131	0,988	108,6
<i>FKBP1A</i>	-,3281	0,972	101,7
<i>FKBP1B</i>	-3,395	0,979	97,0
<i>FKBP5</i>	-3,405	0,996	96,6
<i>SCU</i>	-3,215	0,987	104,7
<i>B2M</i>	-3,182	0,974	106,2

1.11 Perfil de expressão gênica em leucócitos

Na **Figura 6**, são apresentados os dados de expressão relativa (delta Ct) de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em leucócitos totais, antes do transplante renal. É possível observar que o *FKBP1B* apresenta os menores valores de expressão de mRNA quando comparado com os demais genes ($p < 0,001$).

Figura 6. Expressão relativa de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em leucócitos totais, antes do transplante renal.

Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil ($2^{\Delta\Delta Ct}$) utilizando os genes *UBC* e *B2M* como referencia. Variáveis comparadas por Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's Multiple Comparison. Letras iguais representam valores semelhantes ($p > 0,05$).

Na **Figura 7**, são apresentados os dados de expressão diferencial (*fold change*) de mRNA de *MTOR* e *PPP3CA*, *PPP3CB* e *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em leucócitos totais de pacientes, durante 6 meses após o transplante renal. No primeiro mês de tratamento com tacrolimo, houve redução da expressão de mRNA de *MTOR* (*fold change*: 0,75; $p < 0,05$), *PPP3CA* (*fold change*: 0,76; $p < 0,05$), e *FKBP1B* (*fold change*: 0,69; $p < 0,05$). Esse efeito se manteve até o 3º mês para o *MTOR* (*fold change*: 0,71; $p < 0,05$) e para o *PPP3CA* (*fold change*: 0,60; $p < 0,05$). A expressão dos genes *PPP3CB*, *FKBP1A* e *FKBP5* não se alterou ao longo do tratamento ($p > 0,05$). A conversão de tacrolimo para sirolimo demonstrou não influenciar a expressão de mRNA dos genes estudados ($p > 0,05$) (**Figura 7**).

Figura 7. Expressão diferencial de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, em leucócitos totais de pacientes submetidos a transplante renal, nos seis primeiros meses de terapia imunossupressora.

Dados apresentados como valores médios de expressão diferencial (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta Ct}$), em relação ao pré-transplante (referencia: linha pontilhada). Os dados foram comparados utilizando teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. (*) $p < 0,05$. Grupo TAC: pacientes tratados com tacrolimo; Grupo TacEx: pacientes tratados com tacrolimo que apresentaram alterações clínico-laboratoriais relevantes; Grupo SRL: pacientes tratados com sirolimo após o 3º mes.

Tendo em vista que as concentrações sanguíneas de tacrolimo variam até o terceiro mês de tratamento (**Tabela 2**), avaliamos a correlação desses dados com a expressão relativa (delta Ct) de mRNA dos genes em estudo, no 3º mês de tratamento. Também avaliamos a correlação entre dados de expressão de mRNA com os parâmetros de função renal e perfil metabólico. Não foi observada correlação entre as concentrações de tacrolimo e a expressão relativa de mRNA dos genes estudados ($p>0,05$). A expressão de mRNA de *PPP3CB* apresentou correlação positiva com a creatinina sérica ($r=0,49$, $p=0,04$), enquanto que a expressão de *FKBP1A* se correlacionou positivamente com ureia ($r=0,49$, $p=0,04$), HDL colesterol ($r=0,53$; $p=0,02$) e triglicérides ($r=0,68$, $p=0,003$) séricos (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Correlação entre a expressão relativa de mRNA e concentração de tacrolimo, parâmetros de função renal e perfil metabólico, no 3º mês de tratamento

Variáveis	Expressão de mRNA em leucócitos					
	<i>MTOR</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>PPP3CB</i>	<i>FKBP1A</i>	<i>FKBP1B</i>	<i>FKBP5</i>
Concentração sanguínea de tacrolimo (ng/mL)	$r=0,50$ $p=0,84$	$r=-0,27$ $p=0,28$	$r=-0,02$ $p=0,91$	$r=-0,06$ $p=0,84$	$r=-0,01$ $p=0,97$	$r=-0,31$ $p=0,21$
Creatinina (mg/dL)	$r=-0,47$ $p=0,06$	$r=-0,44$ $p=0,07$	$r=-0,49$ $p=0,04$	$r=-0,02$ $p=0,44$	$r=-0,17$ $p=0,50$	$r=-0,21$ $p=0,40$
Ureia (mg/dL)	$r=0,25$ $p=0,32$	$r=0,28$ $p=0,26$	$r=-0,05$ $p=0,84$	$r=0,49$ $p=0,04$	$r=-0,36$ $p=0,14$	$r=0,16$ $p=0,52$
TFGe (ml/min/1.73 m ²)	$r=0,20$ $p=0,43$	$r=0,13$ $p=0,61$	$r=0,35$ $p=0,16$	$r=-0,08$ $p=0,75$	$r=0,41$ $p=0,09$	$r=0,12$ $p=0,63$
Glicose (mg/dL)	$r=-0,21$ $p=0,40$	$r=0,01$ $p=0,97$	$r=-0,30$ $p=0,23$	$r=0,11$ $p=0,64$	$r=-0,42$ $p=0,09$	$r=-0,01$ $p=0,97$
Colesterol Total (mg/dL)	$r=0,01$ $p=0,97$	$r=-0,13$ $p=0,60$	$r=-0,11$ $p=0,66$	$r=-0,15$ $p=0,55$	$r=-0,07$ $p=0,77$	$r=-0,25$ $p=0,33$
HDL colesterol (mg/dL)	$r=0,43$ $p=0,08$	$r=0,24$ $p=0,34$	$r=-0,001$ $p=0,99$	$r=0,53$ $p=0,02$	$r=-0,19$ $p=0,46$	$r=0,05$ $p=0,83$
LDL colesterol (mg/dL)	$r=0,20$ $p=0,44$	$r=0,16$ $p=0,54$	$r=0,15$ $p=0,55$	$r=0,15$ $p=0,57$	$r=0,15$ $p=0,56$	$r=-0,20$ $p=0,45$
Triglicérides (mg/dL)	$r=-0,37$ $p=0,14$	$r=-0,33$ $p=0,19$	$r=-0,12$ $p=0,64$	$r=-0,68$ $p=0,003$	$r=0,44$ $p=0,07$	$r=-0,23$ $p=0,35$

r: coeficiente de correlação de Pearson; TGFe: taxa de filtração glomerular; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. A expressão de mRNA foi calculada pela diferença entre o Ct do gene alvo e a média dos Cts dos genes referência (*UBC* e *B2M*)

1.12 Perfil de expressão de miRNAs em leucócitos

Neste estudo, também avaliamos a expressão de miR-99a, miR-100, miR145, miR-30a, miR-10b e miR-103a, em leucócitos de sangue periférico de receptores de transplante renal. Os resultados de expressão relativa, em relação aos snRNAs de referencia, antes do transplante são mostrados na **Figura 8**. É possível observar que o miR-10b é o menos expresso e o miR-30a o mais expresso, em comparação com os demais miRNAs ($p < 0,05$).

Figura 8. Expressão relativa de miR-99a, miR-100, miR145, miR-30a, miR-10b e miR-103a em leucócitos totais, antes do transplante renal.

Nota: Dados apresentados como mediana e intervalo interquartílico ($2^{\Delta\Delta Ct}$) utilizando os snRNAs RNU6-2, SNORD61, SNORD68 e SNORD95 como referência. Variáveis comparadas por Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's Multiple Comparison. Pré-Tx: pré-transplante. Letras iguais representam valores semelhantes ($p > 0,05$).

Na **Figura 9**, são apresentados os dados de expressão diferencial (*fold change*) de miRNAs, em leucócitos totais de pacientes submetidos a transplante renal, em relação ao período pré-transplante. A expressão diferencial de miR-99a foi reduzida no 3º mês de tratamento com tacrolimo comparado com o pré-transplante ($p < 0,05$) (**Figura 9**). O perfil de expressão diferencial dos outros miRNAs permaneceu inalterado, nos três primeiros meses de tratamento ($p > 0,05$).

Na **tabela 6** é apresentada a correlação entre dados de expressão relativa de miRNA e mRNAs alvo, no terceiro mês pós-transplante. Entretanto, não foram observadas correlações significativas ($p>0,05$).

Figura 9 . Expressão diferencial de miR-99a, miR-100, miR145, miR-30a, miR-10b e miR-130a, em leucócitos totais de pacientes submetidos a transplante renal, ao longo dos tratamentos.

Dados apresentados como valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando tempo pré-tx como referência (linha pontilhada). Variáveis comparadas por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Tabela 6 – Correlação entre a expressão relativa de miRNAs e mRNAs alvo, no 3º mês de tratamento com tacrolimo

mRNA alvo	miRNA	Correlação
<i>MTOR</i>	miR- 99a	r= 0,01
		p=0,95
	miR-100	r=0,26
		p=0,43
<i>PPP3CA</i>	miR-145	r=0,32
		p=0,32
	miR-30a	r=0,14
		p=0,67
<i>PPP3CB</i>	miR-10b	r=-0,17
		p=0,61
<i>FKBP1A</i>	miR-103a	r=-0,64
		p=0,85

r: coeficiente de correlação de Pearson. A expressão de mRNA foi calculada pela diferença entre o Ct do mmiRNA alvo e a média dos Cts dos snRNAs de referencia (RNU6-2, SNORD61, SNORD68 e SNORD95).

DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se maior prevalência do gênero masculino e etnia branca tanto nos receptores como nos doadores de aloenxerto renal. A etiologia da DRC foi associada principalmente com diabetes, hipertensão e doenças renais. Essas características são similares às observadas em um estudo de coorte realizado com 9994 pacientes que necessitaram de terapia de substituição renal entre os anos de 2007 e 2011 no estado de São Paulo, onde os principais diagnósticos presuntivos de DRC foram diabetes (23,1%) e hipertensão (15,5%) (Cordeiro *et al.*, 2013).

Os achados de perda de enxerto e óbito também foram semelhantes aos encontrados em um estudo que avaliou por 24 meses a eficácia e a segurança da conversão de CNI pelo SRL em 830 pacientes. Neste, não foram encontradas diferenças nas taxas de perda de enxerto e óbito entre os pacientes que mantiveram a terapia com CNI e aqueles que fizeram a substituição deste pelo SRL (Schena *et al.*, 2009).

A idade média, gênero, etnia, tipo de DRC, características dos doadores e taxa de perda de enxerto e de óbito foram similares entre os indivíduos dos grupos TAC, TACex e SRL. Esses resultados demonstram uma distribuição aleatória e homogênea dos pacientes entre os grupos. Dessa forma, a influência dessas variáveis sobre a expressão de mRNA e miRNAs em leucócitos do sangue periférico não foram avaliadas.

A redução da concentração sanguínea de tacrolimo e prednisona, nos três primeiros meses de tratamento, se deve aos ajustes de dose para os indivíduos transplantados de acordo com o protocolo de tratamento proposto no estudo. A variabilidade na concentração sanguínea desses fármacos foi similar entre os grupos TAC, TACex e SRL, o que sugere que o monitoramento terapêutico foi adequado, mantendo a concentração sanguínea dentro da faixa esperada e as doses devidamente ajustadas.

As concentrações sanguíneas de tacrolimo, sirolimo e prednisona deste trabalho foram similares as do estudo mais amplo (BIP), no qual 297 receptores de transplante renal foram acompanhados por 24 meses.

Embora o grupo TACex tenha apresentado concentrações sanguíneas mais elevadas de tacrolimo em relação ao grupo TAC, no 4º e 6º mês pós-transplante, estes valores ainda se encontram dentro da faixa preconizada pelo protocolo terapêutico.

Este achado pode indicar que características inerentes desse grupo, como TFG_e baixa, possam estar influenciando na farmacocinética do tacrolimo. Entretanto, diferenças no perfil de TFG_e entre os grupos TAC e TAC_{ex} não foram encontradas no 3º e 6º mês de tratamento.

Como revisado por Mohammadpour e colaboradores, o tacrolimo apresenta uma alta variabilidade inter-individual de concentração sanguínea, a qual pode ocorrer devido a fatores como função renal, função hepática, interações fármaco-nutrientes, presença de comorbidades, gênero, idade, interações medicamentosas, fatores genéticos e outras (Mohammadpour *et al.*, 2011).

A etnia também pode influenciar a concentração sanguínea do tacrolimo. Como demonstrado em um estudo do HRH com 22 pacientes transplantados renais, fazendo uso de terapia imunossupressora a base de tacrolimo por um período de até 6 meses, pacientes de etnia não caucasiana demonstraram maior concentração sanguínea e menor biodisponibilidade de tacrolimo em relação aos de etnia caucasiana (Felipe *et al.*, 2002).

Um estudo realizado com 83 receptores de transplante renal e em uso de terapia imunossupressora contendo micofenolato de sódio, corticosteroides e tacrolimo (doses ajustadas para manutenção da concentração sanguínea entre 5 e 10 ng/mL), avaliou as possíveis causas da variabilidade na farmacocinética e biodisponibilidade do tacrolimo. Para cada paciente, foram analisadas variáveis como: 1) peso, idade, gênero e duração da diálise antes do transplante (meses), 2) parâmetros cirúrgicos: origem do enxerto, tempo de isquemia fria, 3) tempo de transplante, 4) doses e combinações de imunossupressores: prednisona (mg), metilprednisona (mg) e dose acumulada de corticosteróide (mg), e micofenolato de sódio (mg), e 5) parâmetros clínicos e biológicos: aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, proteinemia e creatinina sérica. Concluiu-se que apenas o tempo de transplante e a dose de corticosteróides influenciaram a depuração de tacrolimo do sangue. Observou-se correlação positiva entre a dose de corticosteróides e a dose de tacrolimo necessária para alcançar a meta de concentração deste fármaco, e entre o tempo de transplante e a taxa de depuração de tacrolimo até atingir o *steady-state* (Antignac *et al.*, 2007).

A análise do perfil de função renal (creatinina, ureia e TFG_e) mostrou que independentemente do protocolo imunossupressor utilizado, a função renal do enxerto foi mantida, nos receptores de transplante renal, durante o período de estudo. Resultados similares foram observados em estudos que avaliaram por até 36 meses a

conversão de CNI para inibidor de mTOR, na terapia preventiva de pacientes transplantados renais (Chhabra *et al.*, 2010; Guba *et al.*, 2012), por 24 meses como foi observado, no estudo BIP, do qual este trabalho é um subprojeto (Silva *et al.*, 2013), e por vários períodos, conforme relatado por estudo de revisão que avaliou a terapia combinada de inibidores de mTOR com tacrolimo (Peddi *et al.*, 2013).

No período pré-transplante, a concentração de uréia no grupo TAC foi maior que nos grupos TACex e SRL. Esse resultado é sugestivo de que os pacientes do grupo TAC tinham disfunção renal mais grave, entretanto, as concentrações de creatinina sérica e os valores de TGFe, marcadores mais adequados para avaliar a função renal, foram similares entre os grupos. Foi relatado que a uréia é um marcador pouco específico da função renal, podendo ser alterado por dieta e exercícios, não podendo ser utilizado isoladamente, na avaliação clínica (Gowda *et al.*, 2010).

Neste estudo, a glicemia diminuiu do pré-transplante para o 3º e 6º mês de tratamento, nos três grupos estudados, mantendo-se dentro dos valores de referência. Esses resultados são sugestivos de que houve bom controle glicêmico dos pacientes transplantados. Diferentemente, no estudo Symphony da Bélgica, não foi observada alteração da glicemia com o uso de sirolimo ou tacrolimo por pacientes transplantados renais, no primeiro ano de tratamento (Claes *et al.*, 2012). Por outro lado, outros estudos relataram hiperglicemia e resistência à insulina, em pacientes transplantados, que fizeram uso de regimes imunossupressores contendo tacrolimo e sirolimo (Bloom e Crutchlow, 2008; Hecking *et al.*, 2013; Khalili *et al.*, 2013; Palepu e Prasad, 2015). É possível que as diferenças encontradas entre nosso resultado e o de outros estudos sejam provenientes do quadro metabólico dos pacientes no pré-transplante e de outros fatores que contribuam para a regulação da homeostase glicêmica.

Alterações lipídicas também são um achado comum no primeiro ano pós-transplante renal (Spinelli *et al.*, 2011; Ichimaru *et al.*, 2015). Em nosso estudo pudemos observar aumento de LDL colesterol no 6º mês pós-transplante nos grupos TAC e SRL, tendo o grupo SRL apresentado valores de colesterol total e LDL colesterol maiores em relação ao grupo TAC. Outros estudos também mostraram que a conversão de CNI para inibidores de mTOR resulta em piora no perfil lipídico após a conversão (Claes *et al.*, 2012; Guba *et al.*, 2012).

No trabalho BIP, também foram encontrados maiores valores de colesterol total, LDL e VLDL colesterol e triglicerídeos, no grupo SRL em relação ao grupo TAC após 24 meses pós-transplante (Silva *et al.*, 2013).

Diferentemente do grupo TAC, o grupo TACex não apresentou variabilidade na glicemia e no perfil lipídico até o 6º mês de tratamento. Considerando que ambos os grupos fizeram uso do mesmo esquema imunossupressor, as diferenças no perfil metabólico reforçam a hipótese de que o grupo TACex possa ter características únicas que influenciam na resposta à este imunossupressor.

Embora o grupo TACex tenha apresentado maiores concentrações de tacrolimo no 4º e 6º mês em relação ao grupo TAC, um estudo com 48 pacientes transplantados renais fazendo uso de tacrolimo, não encontrou associação entre as concentrações sanguíneas deste fármaco e a ocorrência de hipercolesterolemia, nos primeiros 12 meses pós-transplante (Ciftci *et al.*, 2013).

Não foram identificadas diferenças nos parâmetros de hemograma entre os grupos deste estudo, exceto pelo grupo TACex, que apresentou os menores valores de hemoglobina no período pré-transplante. Estes por sua vez, foram normalizados nos meses seguintes.

Anemia é um achado clínico comum em pré e pós-transplante renal. Valores de hematócrito e hemoglobina apresentaram uma correlação negativa com a depuração de tacrolimo, em um estudo utilizando 71 pacientes transplantados renais, acompanhados por até 6 meses após a cirurgia e fazendo uso de regime imunossupressor à base de tacrolimo (Praisuwan, Vadcharavivad e Avihingsanon, 2012). Entretanto, a normalização dos valores de hemoglobina no grupo TACex após o transplante sugere que essa variável não está influenciando a farmacocinética do tacrolimo.

No período pré-transplante, observou-se perfil de expressão diferencial de mRNA, em leucócitos totais, sendo $FKBP1B < MTOR = FKBP5 < PPP3CA < PPP3CB = FKBP1A$. Weiward e colaboradores, avaliaram os diferentes níveis proteicos de seis imunofilinas, em células Jurkat, incluindo a FKBP12, FKBP12.6 e FKBP51, codificadas pelos genes *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*, respectivamente, e observaram concentrações muito reduzidas de FKBP 12.6 em comparação com as demais (Weiward *et al.*, 2006). Os resultados de nosso estudo corroboram os achados de Weiward e colaboradores, embora o modelo experimental tenha sido diferente.

Neste estudo, o tacrolimo reduziu a expressão de mRNA de *PPP3CA*, no 1º e 3º mês de tratamento, e retornou ao valor de pré-transplante no 6º mês. É possível que intensa imunossupressão nos primeiros três meses pós-transplantes em relação

demais, seja a responsável pela redução seguida do restabelecimento da expressão deste gene.

Mortensen e colaboradores avaliaram a expressão de *PPP3CA* e *PPP3CB*, em culturas de linfócitos T coletados de pacientes transplantados renais fazendo uso de terapia imunossupressora a base de tacrolimo e de indivíduos saudáveis não medicados (Mortensen *et al.*, 2010). A expressão de *PPP3CA* e *PPP3CB* 6 meses pós-transplante foi similar a de 24 meses de transplante e de indivíduos saudáveis, sugerindo que há uma tendência do organismo em entrar em homeostase, mesmo fazendo uso da imunossupressão. O que pode estar acontecendo em nosso estudo com a expressão de mRNA de *PPP3CA* no 6º mês.

Nos três primeiros meses de tratamento com tacrolimo, observou-se redução da expressão de mRNA do *MTOR*, em relação ao pré-transplante. Esse resultado é sugestivo de o tacrolimo exerce um efeito inibitório sobre a expressão de *MTOR*, em leucócitos periféricos, principalmente porque nesse período as concentrações de tacrolimo eram maiores do que nos meses posteriores.

O mTOR é uma serina/treonina quinase, cuja ativação desencadeia uma série de processos intracelulares resultando no crescimento, proliferação e diferenciação celular (Murakami *et al.*, 2004). A redução na expressão de *MTOR* é sugestiva de intensa supressão da proliferação celular, decorrente do regime imunossupressor no período pós-transplante.

Embora o tacrolimo seja um CNI, neste estudo ele demonstrou ser capaz de influenciar a expressão do *MTOR*, reduzindo-a. Acreditamos que pode estar ocorrendo um mecanismo de supressão indireta deste gene gerada pela inibição causada pelo tacrolimo na produção de IL-2, principal citocina responsável pela ativação do mTOR.

A expressão de mRNA de *FKBP1B* nos leucócitos também foi inibida pelo tacrolimo no 1º mês de tratamento imunossupressor. Embora essa imunofilina tenha afinidade tanto com a calcineurina quanto com o mTOR, as alterações observadas neste trabalho foram somente durante o período de tratamento com o TAC.

Em nosso trabalho, a expressão dos genes estudados não foi alterada pelo tratamento com sirolimo (inibidor de mTOR) do 3º para o 6º mês de tratamento no grupo SRL. Diferentemente, Vickers e colaboradores avaliaram a expressão de genes candidatos por tecnologia de mirroarranjos de DNA e observaram redução da expressão em leucócitos totais, de *MTOR* e *FKBP1A*, em 2 de 4 pacientes transplantados renais fazendo uso de sirolimo por um período mínimo de 1 mês e

máximo de 10 anos (Vickers *et al.*, 2007). É importante considerar que no estudo de Vickers e colaboradores o sirolimo foi administrado desde o primeiro dia de transplante, diferentemente do nosso estudo, no qual o sirolimo foi introduzido após 3 meses de terapia com tacrolimo.

Um estudo relatou que a expressão de mRNA de *MTOR*, em células renais de ratos tratados com ciclosporina, um CNI, se manteve inalterada nas três primeiras 3 semanas e aumentou ao final de exposição prolongada (9 semanas). Os valores de expressão se mantiveram constantes mesmo após a conversão da ciclosporina para sirolimo na terceira semana (Serenio *et al.*, 2014). De forma similar, não observamos alteração da expressão de mRNA de *MTOR* quando da conversão de tacrolimo para sirolimo.

Como observamos variabilidade na concentração sanguínea de tacrolimo no 3º mês pós-transplante, verificamos se está relacionada com diferença na expressão de mRNA dos genes em estudo. Entretanto, nenhuma correlação significativa foi encontrada, sugerindo que a expressão dos genes estudados, no 3º mês de tratamento, não é influenciada pela concentração de tacrolimo.

Tendo em vista que as concentrações de sirolimo não variaram no grupo SRL do 4º ao 6º mês, não foi possível avaliar a relação entre a concentração deste fármaco a expressão dos genes estudados.

Alterações na expressão gênica demonstraram serem capazes de prever perdas na função renal (Neuwirt *et al.*, 2014; Borst *et al.*, 2015). Neuwirt e colaboradores identificaram e validaram um painel de três genes (*BMP7*, *THBS1* e *TRIB1*), cujas expressões em biópsias renais foram capazes de prever concentrações de creatinina sérica em um período de até 28 meses (Neuwirt *et al.*, 2014). Já Borst e colaboradores, verificaram que redução na expressão de mRNA do gene da interleucina-18, em células mononucleares do sangue periférico, são capazes de prever aumento na creatinina sérica e presença de função do enxerto retardada (do inglês *delayed graft function*), uma forma de falência renal aguda, em até 24h pós-transplante (Borst *et al.*, 2015).

Tendo em vista esses estudos prévios, nós avaliamos se o perfil de expressão gênica, em leucócitos totais de pacientes transplantados poderia estar relacionado com os parâmetros de função renal, e perfil metabólico no 3º mês de tratamento. Entretanto, nenhuma relação significativa foi encontrada.

A expressão de microRNAs, em leucócitos totais de pacientes submetidos a transplante renal, também foi avaliada neste estudo. No período pré-transplante, observou-se um perfil diferencial de expressão, com valores de $\text{miR-10b} = \text{miR-99a} = \text{miR-100} < \text{miR-145}$, $\text{miR-30a} = \text{miR-103a}$.

Dois estudos relataram a relação entre a propriedade do miR-99a em modular a expressão do *MTOR* com a capacidade deste em regular a proliferação celular (Hu, Zhu e Tang, 2014; Wang *et al.*, 2014). Hu e colaboradores, demonstraram em linhagens celulares de câncer de mama, que a atividade do mTOR foi intensamente inibida pela presença de miR-99a. Da mesma forma, aumento na expressão do miR-99a foi associado com a redução na expressão do *MTOR* e de genes de proteínas adjacentes à sua via (p-4E-BP1 and p-S6K1) (Hu, Zhu e Tang, 2014). Wang e colaboradores demonstraram por sua vez, através de ensaios de luciferase em amostras de tecido de câncer de colo de útero que o miR-99a é capaz de inibir o crescimento e a invasão celular por inibir a expressão do *MTOR* (Wang *et al.*, 2014)

A capacidade do miR-99a em modular a expressão do *MTOR* em células cancerígenas, sugere uma alta probabilidade do mesmo em modular este gene em células do sistema imune, impedindo sua proliferação

O miR-100 é outro miRNA regulador a expressão de mRNA do *MTOR*. Aumento em sua expressão também foi relacionado com a supressão de tumores em câncer de bexiga, sendo esta mediada pela capacidade deste miRNA em modular a expressão do *MTOR* (Xu *et al.*, 2013).

Embora o miR-99a e o miR-100 sejam capazes de modular a expressão do *MTOR*, a expressão destes miRNAs não acompanhou a redução de expressão de mRNA do de *MTOR*, até o 3º mês de tratamento com tacrolimo. Esse resultado é sugestivo de que, neste modelo experimental, estes miRNAs tenham uma contribuição menor na regulação do *MTOR*. Além disso, é possível que outros miRNAs ou outros fatores ainda não avaliados tenham influenciado a inibição da expressão deste gene.

O miR-30a foi selecionado por ser miRNA regulador do *PPP3CA*. Neste estudo, verificamos que durante o tratamento com tacrolimo, a expressão deste miRNA não apresentou alterações.

Redução na expressão do miR-30a foi associada com mau prognóstico da função do enxerto (Anglicheau *et al.*, 2009; Ben-Dov *et al.*, 2012). Biópsias de transplantados renais com indicativos de rejeição aguda segundo a classificação de Banff 97 realizadas em um período médio de $19,1 \pm 7,0$ meses após o transplante

demonstraram valores muito reduzidos na expressão do miR-30a em relação à biópsias de enxertos sadios (Anglicheau *et al.*, 2009). Da mesma forma biópsias de pacientes caracterizados com atrofia tubular e fibrose intersticial do enxerto, demonstraram menor expressão desse miRNA em relação à biópsias de enxertos sadios (Ben-Dov *et al.*, 2012).

Como comentado anteriormente, o *PPP3CA* é o mRNA alvo do miR-30a e os resultados de expressão gênica mostraram que a expressão de *PPP3CA* diminuiu no 1º e 3º mês, entretanto não foram evidenciados aumentos na expressão deste miRNA neste grupo. É possível por tanto que este miRNA não seja o principal responsável por influenciar a expressão de *PPP3CA* neste modelo de estudo.

O miR-145 também é um miRNA regulador do *PPP3CA*. Além de apresentar características antineoplásicas (Lu *et al.*, 2014), também demonstrou estar associado com a ocorrência rejeição aguda em transplante renal (Oghumu *et al.*, 2014).

Biópsias de transplantados renais, acompanhados por um período de até 24 meses e caracterizados com rejeição aguda, apresentaram uma maior expressão do miR-145 em relação à biópsias de enxertos sadios (Oghumu *et al.*, 2014)

Em nosso estudo, houve uma tendência ao aumento de miR-145 no 1º mês de tratamento.

O miR-10b é considerado um miRNA potencialmente oncogênico. Alguns estudos demonstraram uma associação positiva entre expressão aumentada deste miRNA, em células de linhagens neoplásicas, e a ocorrência de diversos tipos de malignidades, como por exemplo câncer de mama, câncer oral e adenocarcinoma do ducto pancreático (Beltran *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2014).

O miR-10b foi selecionado para este estudo por ser miRNA regulador do *PPP3CB*. Redução no perfil de expressão do miR-10b, no período pós-transplante, foi associada com o acometimento de rejeição aguda do aloenxerto renal (Lorenzen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). A falta alteração deste miRNA durante o tratamento com tacrolimo é sugestiva de menor predisposição dos pacientes à rejeição. De fato, a taxa de rejeição foi baixa no grupo amostral deste estudo.

Nós também não observamos alterações na expressão de miR-103a. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a expressão de miR-103a conjuntamente com a expressão de *FKBP1A*, em receptores de transplante renal. Outros estudos indicaram que aumento na expressão deste miRNA está associado com a supressão da proliferação, migração e invasão celular em modelos oncológicos

(ex: câncer gástrico e mesotelioma maligno) (Weber *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015). É possível que, assim como ocorre em células neoplásicas, este miRNA possa estar modulando a capacidade das células do sistema imune em se proliferarem, indicando uma possível melhor resposta terapêutica.

É possível que a variabilidade de expressão de mRNA dos genes avaliados sejam modulados por outros miRNAs. Portanto, mais estudos que avaliem uma maior gama de miRNAs são necessários para determinar quais miRNAs estão modulando a expressão dos genes envolvidos nas vias da calcineurina e mTOR, em modelos de transplante renal. Da mesma forma, estudos que utilizem um número amostral maior e com condições de desfecho clínico diferenciadas, são necessários para confirmar a participação desses genes na resposta ao tratamento com tacrolimo e sirolimo.

Apesar das limitações, este estudo apresenta dados inovadores na farmacogenômica do tacrolimo e do sirolimo, contribuindo para o conhecimento de possíveis mecanismos capazes de influenciar a resposta terapêutica destes imunossupressores em transplantados renais.

CONCLUSÕES

A expressão diferencial de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA* e *FKBP1B* e de miR-99a que tem como alvo o mRNA de *MTOR*, em leucócitos do sangue periférico, é modulada pelo tratamento imunossupressor a base de tacrolimo, em receptores de transplante renal.

A concentração sanguínea de tacrolimo não influencia a expressão de mRNA de *PPP3CB*, *FKBP1A* e *FKBP5*, em leucócitos de pacientes transplantados, no 3º mês de tratamento.

A conversão de tacrolimo para sirolimo demonstrou não influenciar a expressão de mRNA de *MTOR*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *FKBP1A*, *FKBP1B* e *FKBP5*.

O perfil de expressão de mRNA, em leucócitos, não se correlaciona com os perfil de função renal (creatinina, ureia e TGFe) e o metabólico (glicemia e lipídeos), no 3º mês de tratamento.

O perfil de expressão de miRNAs reguladores (miR-99a, miR-100, miR-145, miR-30a, miR-10b e miR-103a) não está associado com a variabilidade de expressão de mRNAs alvo, em leucócitos de receptores de transplante renal, no 3º mês de tratamento.

O perfil de expressão diferencial de mRNA dos genes da via da calcineurina e mTOR é sugestivo de sua potencial aplicação no monitoramento da terapia a base de tacrolimo.

REFERÊNCIAS

ABTO, A. B. D. T. D. Ó. **Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: Janeiro/Dezembro 2013.** RBT – Registro Brasileiro de Transplantes. 9-12: 10 p. 2013.

ALVES, C. et al. **Influence of *SLCO1B1* and *SLCO2B1* Polymorphisms on Tacrolimus Pharmacokinetics and Clinical Response.** J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics. 5 2014.

ANGLICHEAU, D. et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5330-5, Mar 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289845> >.

ANTIGNAC, M. et al. Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 64, n. 6, p. 750-7, Dec 2007. ISSN 1365-2125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425625> >.

BAEK, D. et al. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 64-71, Sep 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668037> >.

BELTRAN, A. S. et al. Suppression of breast tumor growth and metastasis by an engineered transcription factor. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24595, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931769> >.

BELVER, L.; PAPAVALIOU, F. N.; RAMIRO, A. R. MicroRNA control of lymphocyte differentiation and function. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 3, p. 368-73, Jun 2011. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353514> >.

BEN-DOV, I. Z. et al. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. **Transplantation**, v. 94, n. 11, p. 1086-94, Dec 2012. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131772> >.

BILLING, H. et al. Pharmacodynamic monitoring by residual NFAT-regulated gene expression in stable pediatric liver transplant recipients. **Pediatr Transplant**, v. 16, n. 2, p. 187-94, Mar 2012. ISSN 1399-3046. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360403> >.

BLOOM, R. D.; CRUTCHLOW, M. F. Transplant-associated hyperglycemia. **Transplant Rev (Orlando)**, v. 22, n. 1, p. 39-51, Jan 2008. ISSN 1557-9816. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18631857> >.

BORST, C. et al. Interleukin-8 transcripts in mononuclear cells determine impaired graft function after kidney transplantation. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117315, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689147> >.

CHHABRA, D. et al. Late conversion of tacrolimus to sirolimus in a prednisone-free immunosuppression regimen in renal transplant patients. **Clin Transplant**, v. 24, n. 2, p. 199-206, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1399-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659511> >.

CIFTCI, H. S. et al. Lipid parameters, doses and blood levels of calcineurin inhibitors in renal transplant patients. **Indian J Clin Biochem**, v. 28, n. 2, p. 164-8, Apr 2013. ISSN 0970-1915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24426203> >.

CLAES, K. et al. Effect of different immunosuppressive regimens on the evolution of distinct metabolic parameters: evidence from the Symphony study. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 2, p. 850-7, Feb 2012. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617197> >.

CORDEIRO, A. C. et al. Study of the incidence of dialysis in São Paulo, the largest Brazilian city. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 6, p. 760-5, Jun 2013. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778473> >.

DREUSSI, E. et al. miRNA pharmacogenomics: the new frontier for personalized medicine in cancer? **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 14, p. 1635-50, Nov 2012. ISSN 1744-8042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23148639> >.

FAVI, E. et al. Significant improvement in patient survival after renal transplantation in the last decade. **Transplant Proc**, v. 43, n. 1, p. 285-7, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21335207> >.

FELIPE, C. R. et al. The impact of ethnic miscegenation on tacrolimus clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. **Clin Transplant**, v. 16, n. 4, p. 262-72, Aug 2002. ISSN 0902-0063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12099982> >.

FETSCH, P. A. et al. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. **Cancer Lett**, v. 235, n. 1, p. 84-92, Apr 2006. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990223> >.

GALINDO SACRISTÁN, P. et al. Predictive factors of infection in the first year after kidney transplantation. **Transplant Proc**, v. 45, n. 10, p. 3620-3, Dec 2013. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314976> >.

GOLDFARB-RUMYANTZEV, A. et al. Duration of end-stage renal disease and kidney transplant outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 20, n. 1, p. 167-75, Jan 2005. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546892> >.

GOWDA, S. et al. Markers of renal function tests. **N Am J Med Sci**, v. 2, n. 4, p. 170-3, Apr 2010. ISSN 2250-1541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624135> >.

GUBA, M. et al. Early conversion to a sirolimus-based, calcineurin-inhibitor-free immunosuppression in the SMART trial: observational results at 24 and 36 months after transplantation. **Transpl Int**, v. 25, n. 4, p. 416-23, Apr 2012. ISSN 1432-2277. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320241> >.

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

HECKING, M. et al. Glucose metabolism after renal transplantation. **Diabetes Care**, v. 36, n. 9, p. 2763-71, Sep 2013. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23656979> >.

HEILMAN, R. L. et al. Impact of early conversion from tacrolimus to sirolimus on chronic allograft changes in kidney recipients on rapid steroid withdrawal. **Transplantation**, v. 93, n. 1, p. 47-53, Jan 2012. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067270> >.

HU, Y.; ZHU, Q.; TANG, L. MiR-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92099, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637915> >.

ICHIMARU, N. et al. Risk factors and incidence for lipid abnormalities in kidney transplant patients. **Transplant Proc**, v. 47, n. 3, p. 672-4, Apr 2015. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891708> >.

JAYARAMAN, T.; MARKS, A. R. Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line. **J Biol Chem**, v. 268, n. 34, p. 25385-8, Dec 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503980> >.

KANDULA, P. et al. Impact of tacrolimus-sirolimus maintenance immunosuppression on proteinuria and kidney function in pancreas transplant alone recipients. **Transplantation**, v. 94, n. 9, p. 940-6, Nov 2012. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037007> >.

KHALILI, N. et al. Hyperglycemia after renal transplantation: frequency and risk factors. **Nephrourol Mon**, v. 5, n. 2, p. 753-7, 2013. ISSN 2251-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841039> >.

KIRCHNER, R. M. et al. **Análise do estilo de vida de renais crônicos em hemodiálise**. O MUNDO DA SAÚDE, São Paulo. 35: 415-421 p. 2011.

KNOPS, N. et al. From gut to kidney: transporting and metabolizing calcineurin-inhibitors in solid organ transplantation. **Int J Pharm**, v. 452, n. 1-2, p. 14-35, Aug 2013. ISSN 1873-3476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711732> >.

KREJSA, C.; ROGGE, M.; SADEE, W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 6, p. 507-21, Jun 2006. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763661> >.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006 Apr-Jun 2006. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460794> >.

KUYPERS, D. R. Immunosuppressive drug monitoring - what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome. **Transpl Int**, v. 18, n. 2, p. 140-50, Feb 2005. ISSN 0934-0874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691265> >.

LAM, E. et al. A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. **J Biol Chem**, v. 270, n. 44, p. 26511-22, Nov 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592869> >.

LEVY, G. A. Progress in transplantation. **Ther Drug Monit**, v. 32, n. 3, p. 246-9, Jun 2010. ISSN 1536-3694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418803> >.

LIANG, J. et al. MicroRNA-103a inhibits gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting c-Myb. **Cell Prolif**, v. 48, n. 1, p. 78-85, Feb 2015. ISSN 1365-2184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530421> >.

LIU, X. et al. MicroRNA-10b downregulation mediates acute rejection of renal allografts by derepressing BCL2L1. **Exp Cell Res**, v. 333, n. 1, p. 155-63, Apr 2015. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659925> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LORENZEN, J. M. et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. **Am J Transplant**, v. 11, n. 10, p. 2221-7, Oct 2011. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812927> >.

LU, R. et al. miR-145 functions as tumor suppressor and targets two oncogenes, ANGPT2 and NEDD9, in renal cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 140, n. 3, p. 387-97, Mar 2014. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384875> >.

LU, Y. C. et al. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 5, n. 4, p. 665-74, Apr 2012. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318752> >.

MACPHEE, I. A. Use of pharmacogenetics to optimize immunosuppressive therapy. **Ther Drug Monit**, v. 32, n. 3, p. 261-4, Jun 2010. ISSN 1536-3694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431509> >.

MEIER-KRIESCHE, H. U. et al. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 6, p. 1293-6, Jun 2001. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373354> >.

MOHAMMADPOUR, N. et al. A review on therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. **Iran J Basic Med Sci**, v. 14, n. 6, p. 485-98, Nov 2011. ISSN 2008-3866. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23493821> >.

MORTENSEN, D. M. et al. Gene expression analysis of calcineurin isoforms in T-lymphocytes--a method applied on kidney-transplant recipients. **Transpl Immunol**, v. 23, n. 1-2, p. 24-7, May 2010. ISSN 1878-5492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226242> >.

MOURAD, M. et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. **Transplantation**, v. 80, n. 7, p. 977-84, Oct 2005. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249748> >.

MURAKAMI, M. et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 15, p. 6710-8, Aug 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254238> >.

MÄRZ, A. M. et al. Large FK506-binding proteins shape the pharmacology of rapamycin. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 7, p. 1357-67, Apr 2013. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23358420> >.

NEUWIRT, H. et al. A 3-biomarker-panel predicts renal outcome in patients with proteinuric renal diseases. **BMC Med Genomics**, v. 7, p. 75, 2014. ISSN 1755-8794. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25540021> >.

OGHUMU, S. et al. Acute pyelonephritis in renal allografts: a new role for microRNAs? **Transplantation**, v. 97, n. 5, p. 559-68, Mar 2014. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24521778> >.

OUYANG, H. et al. microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- β actions. **Oncogene**, v. 33, n. 38, p. 4664-74, Sep 2014. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096486> >.

PALEPU, S.; PRASAD, G. V. New-onset diabetes mellitus after kidney transplantation: Current status and future directions. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 445-55, Apr 2015. ISSN 1948-9358. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897355> >.

PALLET, N.; THERVET, E. The genetics of kidney transplantation. **Hum Genet**, v. 131, n. 3, p. 317-23, Mar 2012. ISSN 1432-1203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922316> >.

PAN, Y. Z.; MORRIS, M. E.; YU, A. M. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 75, n. 6, p. 1374-9, Jun 2009. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270061> >.

PEDDI, V. R. et al. Review of combination therapy with mTOR inhibitors and tacrolimus minimization after transplantation. **Transplant Rev (Orlando)**, v. 27, n. 4, p. 97-107, Oct 2013. ISSN 1557-9816. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932018> >.

POIRIER, O. et al. Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy. **Eur J Hum Genet**, v. 11, n. 9, p. 659-64, Sep 2003. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939651> >.

PRAISUWAN, S.; VADCHARAVIVAD, S.; AVIHINGSANON, Y. **Hemoglobin Levels Influence Pharmacokinetics of Tacrolimus in Kidney Transplant Patients.** *Thai Pharm Health Sci J.* 7 2012.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Mol Biotechnol**, v. 15, n. 2, p. 115-22, Jun 2000. ISSN 1073-6085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949824> >.

REKERS, N. V. et al. Increased metallothionein expression reflects steroid resistance in renal allograft recipients. **Am J Transplant**, v. 13, n. 8, p. 2106-18, Aug 2013. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23763497> >.

ROSSO FELIPE, C. et al. Clinical Impact of Polymorphisms of Transport Proteins and Enzymes Involved in the Metabolism of Immunosuppressive Drugs. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 5, 2009. ISSN 5. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134509004114> >.

RUKOV, J. L.; SHOMRON, N. MicroRNA pharmacogenomics: post-transcriptional regulation of drug response. **Trends Mol Med**, v. 17, n. 8, p. 412-23, Aug 2011. ISSN 1471-499X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21652264> >.

RUKOV, J. L.; VINTHER, J.; SHOMRON, N. Pharmacogenomics genes show varying perceptibility to microRNA regulation. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 5, p. 251-62, May 2011. ISSN 1744-6880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499217> >.

RUSNAK, F.; MERTZ, P. Calcineurin: form and function. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1483-521, Oct 2000. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015619> >.

SALVADORI, M.; BERTONI, E. Is it time to give up with calcineurin inhibitors in kidney transplantation? **World J Transplant**, v. 3, n. 2, p. 7-25, Jun 2013. ISSN 2220-3230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175203> >.

SAMANIEGO, M.; BECKER, B. N.; DJAMALI, A. Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 2, n. 12, p. 688-99, Dec 2006. ISSN 1745-8331. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124526> >.

SANTORO, A. et al. **Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in Brazilian renal transplant patients** *Pharmacogenomics*. 12 2011.

SCHAEFER, H. M. Long-term management of the kidney transplant recipient. **Blood Purif**, v. 33, n. 1-3, p. 205-11, 2012. ISSN 1421-9735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269883> >.

SCHENA, F. P. et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. **Transplantation**, v. 87, n. 2, p. 233-42, Jan 2009. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155978> >.

SEHGAL, S. N. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. **Transplant Proc**, v. 35, n. 3 Suppl, p. 7S-14S, May 2003. ISSN 0041-1345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742462> >.

SELLARÉS, J. et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. **Am J Transplant**, v. 12, n. 2, p. 388-99, Feb 2012. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081892> >.

SERENO, J. et al. Conversion to sirolimus ameliorates cyclosporine-induced nephropathy in the rat: focus on serum, urine, gene, and protein renal expression biomarkers. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 576929, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24971338> >.

SHIHAB, F. et al. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes. **Transpl Immunol**, v. 31, n. 1, p. 22-32, Jun 2014. ISSN 1878-5492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24861504> >.

SHOMRON, N. MicroRNAs and pharmacogenomics. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 5, p. 629-32, May 2010. ISSN 1744-8042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20415550> >.

SHYU, A. B.; WILKINSON, M. F.; VAN HOOFF, A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. **EMBO J**, v. 27, n. 3, p. 471-81, Feb 2008. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256698> >.

SILVA, H. T. et al. Planned randomized conversion from tacrolimus to sirolimus-based immunosuppressive regimen in de novo kidney transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 13, n. 12, p. 3155-63, Dec 2013. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24266969> >.

SINGH, N.; NORI, U.; PESAVENTO, T. Kidney transplantation in the elderly. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 14, n. 4, p. 380-5, Aug 2009. ISSN 1531-7013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19610171> >.

SOMMERER, C. et al. Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies. **Transplantation**, v. 82, n. 10, p. 1280-5, Nov 2006. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130775> >.

SONKOLY, E.; STÄHLE, M.; PIVARCSI, A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 2, p. 131-40, Apr 2008. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291670> >.

SPINELLI, G. A. et al. Lipid profile changes during the first year after kidney transplantation: risk factors and influence of the immunosuppressive drug regimen. **Transplant Proc**, v. 43, n. 10, p. 3730-7, Dec 2011. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22172836> >.

STEINEBRUNNER, N. et al. Reduced residual gene expression of nuclear factor of activated T cells-regulated genes correlates with the risk of cytomegalovirus infection after liver transplantation. **Transpl Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 379-86, Jun 2014. ISSN 1399-3062. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666466> >.

TÜRKMEN, M. et al. The relationship between renal P-glycoprotein expression and response to steroid therapy in childhood nephrotic syndrome. **Turk J Pediatr**, v. 55, n. 3, p. 260-5, 2013 May-Jun 2013. ISSN 0041-4301. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217071> >.

VICKERS, K. et al. Effect of sirolimus treatment on gene expression in renal transplant patients. **World J Surg**, v. 31, n. 4, p. 644-53, Apr 2007. ISSN 0364-2313. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334862> >.

VILELLA-BACH, M. et al. The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. **J Biol Chem**, v. 274, n. 7, p. 4266-72, Feb 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933627> >.

VINCENTI, F. A decade of progress in kidney transplantation. **Transplantation**, v. 77, n. 9 Suppl, p. S52-61, May 2004. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201687> >.

WANG, L. et al. miR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway. **Med Oncol**, v. 31, n. 5, p. 934, May 2014. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668416> >.

WEBER, D. G. et al. Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114483, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25469901> >.

WEIWAD, M. et al. Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15776-84, Dec 2006. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17176100> >.

WOLTMAN, A. M. et al. Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 174-80, Jul 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418477> >.

XU, C. et al. miRNA-100 inhibits human bladder urothelial carcinogenesis by directly targeting mTOR. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 2, p. 207-19, Feb 2013. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270926> >.

XU, X. et al. FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506. **Transplantation**, v. 73, n. 11, p. 1835-8, Jun 2002. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085010> >.

YOST, S. E.; KAPLAN, B. Comparing kidney transplant outcomes; caveats and lessons. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 1, p. 9-11, Jan 2013. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987141> >.

YU, S. F.; WU, L. H.; ZHENG, S. S. Genetic factors for individual administration of immunosuppressants in organ transplantation. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 5, n. 3, p. 337-44, Aug 2006. ISSN 1499-3872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16911928> >.

ZAHN, A. et al. Immunomonitoring of nuclear factor of activated T cells-regulated gene expression: the first clinical trial in liver allograft recipients. **Liver Transpl**, v. 17, n. 4, p. 466-73, Apr 2011. ISSN 1527-6473. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445930> >.

ZAZA, G. et al. Pharmacogenomics: a new paradigm to personalize treatments in nephrology patients. **Clin Exp Immunol**, v. 159, n. 3, p. 268-80, Mar 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19968662> >.

ZHANG, W.; DOLAN, M. E. The emerging role of microRNAs in drug responses. **Curr Opin Mol Ther**, v. 12, n. 6, p. 695-702, Dec 2010. ISSN 2040-3445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21154161> >.

ZHAO, W.; FAKHOURY, M.; JACQZ-AIGRAIN, E. Developmental pharmacogenetics of immunosuppressants in pediatric organ transplantation. **Ther Drug Monit**, v. 32, n. 6, p. 688-99, Dec 2010. ISSN 1536-3694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068645> >.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo

	Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina	Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo
São Paulo, 22 de janeiro de 2010. CEP 0054/08 CONEP		
Ilmo(a). Sr(a). Pesquisador(a) HÉLIO TEDESCO SILVA JÚNIOR Disciplina/Departamento: Nefrologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo		
Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Estudo randomizado aberto, multicêntrico para avaliar a eficácia e a segurança de um regime imunossupressivo com base em sirolimo introduzido aos 3 meses após transplante renal, em comparação com um regime contínuo com base em tacrolimo em paciente com transplante renal de novo ("Brazilian Initiative Program")".		
Prezado(a) Pesquisador(a),		
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU Emenda 5 (versão de 09/Dez/2009) do projeto de pesquisa acima referenciado.		
Atenciosamente,		
Profa. Dra. Maria Del Carmen Janeiro Perez Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo		
CEP 0054/08		
Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162		

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

Ofício CEP/FCF/93/2009

São Paulo, 4 de agosto de 2009.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata
FBC

Senhora Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada farmacogenômicos e biomarcadores de rejeição aguda" referente ao projeto "Estudo randomizado aberto, multicêntrico para avaliar a eficácia e a segurança de um regime imunossupressivo com base em sirolimo introduzido aos 3 meses após transplante renal, em comparação com um regime contínuo com base em tacrolimo, em paciente com transplante renal de novo" de responsabilidade do Dr. Helio Tedesco Silva Junior.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo C – Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 8154427/2 - Vivian Bonezi

Email:	vivianbonezi@usp.br
Data de Nascimento:	27/07/1987
Cédula de Identidade:	RG - 44.292.441-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Centro Universitário São Camilo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	01/02/2013
Início da Contagem de Prazo:	01/02/2013
Data Limite para o Depósito:	03/08/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Rosario Dominguez Crespo Hirata - 01/02/2013 até o presente. Email: rosariohirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 20/03/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 01/02/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2015

Impresso em: 29/04/2015 15:52:19

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8154427/2 - Vivian Bonezi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5761-6/1	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	04/02/2013	03/03/2013	60	4	100	A	N	Concluída
BMI5881-4/1	Regulação da Resposta Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/02/2013	21/04/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5793-11/1	Tópicos em Análises Clínicas I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	90	A	N	Concluída
MCM5746-7/2	Pesquisa Avançada em Lesão Renal Aguda (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/05/2013	02/06/2013	60	4	100	A	N	Concluída
BMH5770-1/2	MicroRNA e Câncer (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/06/2013	01/07/2013	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
MCM5880-2/4	Bioestatística Aplicada a Clínica Médica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/08/2013	19/08/2013	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	100	A	N	Concluída
EDM5102-3/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	30/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5708-5/2	Farmacogenômica Cardiovascular	30/09/2013	10/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5733-3/2	Ciências Farmacêuticas na Educação em Saúde	07/10/2013	20/10/2013	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	94	A	N	Concluída
VPT5771-2/3	Preparação Pedagógica: A Comunicação no Processo de Ensino-Aprendizagem (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	18/05/2014	60	4	90	A	N	Concluída
FBC5771-7/2	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	02/06/2014	15/06/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	34
Estágios:			
Total:	0	25	34

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:	
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.	
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.	

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2015

Impresso em: 29/04/2015 15:52:19

Anexo D – Currículo Lattes do aluno

29/04/2015

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Vivian Bonezi)

Vivian Bonezi

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6217088119598311>
Última atualização do currículo em 18/07/2014

Mestranda em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Vivian Bonezi
Nome em citações bibliográficas BONEZI, V.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Rosario Domingues Crespo Hirata. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica.
2006 - 2010	Graduação em Farmácia. Centro Universitário São Camilo, CUSC, Brasil. Título: DPOC e Asma: Protocolo de Atenção Farmacêutica. Orientador: Válder Luiz da Costa Júnior.

Formação Complementar

2014 - 2014	Prescrição Farmacêutica. (Carga horária: 6h). Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo.
2013 - 2013	Análise de dados utilizando o SPSS. (Carga horária: 12h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2012 - 2013	Programa de Atualização Profissional. (Carga horária: 400h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2012 - 2012	Advanced Genetics. (Carga horária: 12h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2009 - 2009	Advanced English Course. (Carga horária: 200h). International Language Schools of Canada.

Atuação Profissional

Centro Universitário São Camilo, CUSC, Brasil.

29/04/2015

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Vivian Bonezi)

Vínculo institucional**2009 - 2009**

Vínculo: Monitoria Acadêmica, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 8

Outras informações

Monitora da disciplina de Cosmetologia, incluindo prática laboratorial.

CordCell - Centro de Terapia Celular, CORDCELL, Brasil.**Vínculo institucional****2010 - 2012**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Gestão Laboratorial, Carga horária: 50, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Experiência em atividades de criopreservação de células tronco hematopoiéticas, sejam elas provenientes do sangue de cordão umbilical e placentário, de coletas de stem cell periférico ou de coletas de medula óssea em centros cirúrgicos. Desenvolvimento nas áreas de gestão de processos e pessoas, sistema da qualidade, certificações e creditações.

Centro de Hemoterapia São Lucas, CHSL, Brasil.**Vínculo institucional****2010 - 2010**

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Outras informações

Estágio desenvolvido no Laboratório de Sorologia com atividades de realização de testes sorológicos de para detecção de Hepatite B, Hepatite C, HIV-1 e HIV-2, doença de Chagas, Sífilis, HTLV-I e HTLV-II e CMV através dos métodos de imunofluorescência e ELISA.

Hospital São Camilo - Pompéia, HSC/Pompéia, Brasil.**Vínculo institucional****2010 - 2010**

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Outras informações

Estágio realizado em Farmácia Hospitalar, através de atividades de recebimento de materiais e medicamentos, estoque e rastreabilidade, unitarização, dispensação, rotina e abastecimento de farmácias satélites (Centro Cirúrgico, Pronto Socorro e UTI), análise técnica de prescrições médicas, farmacovigilância, reconciliação medicamentosa, participação em comissões, e padronização da administração de medicamentos via sonda.

AE/CEO Ceci Dr. Alexandre Kalil Yasbeck, AE CECI, Brasil.**Vínculo institucional****2009 - 2009**

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Outras informações

Estágio realizado na área de Saúde Pública, através de atividades de dispensação de medicamentos padronizados pelo SUS, controlados, e anti-retrovirais. Atenção e Assistência farmacêutica. Controle de entrada e saída de medicamentos.

Áreas de atuação**1.**

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

Idiomas**Inglês**

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Italiano

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ BASTOS, G. M. ; LEITE, G. G. S. ; SILVA, J. L. ; SANTOS, J. G. ; **BONEZI, V.** ; FAJARDO, C. M. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . HspX protein of Mycobacterium tuberculosis enhances the IL-1b mRNA expression and cytokine secretion in macrophage-like THP-1 cultures. In: 23rd European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2013, Berlin. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2013.
2. ★ BASTOS, G. M. ; LEITE, G. G. S. ; SILVA, J. L. ; FAJARDO, C. M. ; SANTOS, J. G. ; **BONEZI, V.** ; FREITAS, K. V. ; MYATA, M. ; SOUZA, W. A. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . PROTEÍNA HSPX DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A SÍNTESE DE COMPONENTES DA PAREDE CELULAR. In: XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos - SP. XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XVII Congresso Paulista de Farmacêuticos - CRF-SP. 2013. (Congresso).
2. XII Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em Pesquisa. 2013. (Simpósio).
3. XI Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em Pesquisa. 2012. (Simpósio).
4. VI Semana de Farmácia do Centro Universitário São Camilo. 2008. (Seminário).
5. V Semana de Farmácia. 2007. (Seminário).
6. Ciclo de Estudos em Farmacoterapia do Centro Universitário São Camilo. 2007. (Encontro).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **BONEZI, V.** . VII Semana de Assistência Farmacêutica. 2009. (Outro).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 29/04/2015 às 16:23:43

[Imprimir currículo](#)