



Universidade da Beira Interior

# ***Farmacogenética em Transplantação de Órgãos Sólidos***

João F. P. Mendes

Centro de Histocompatibilidade do Centro



# Aspectos gerais em transplantação

Compatibilidade do sistema HLA

Mecanismos de alo-reconhecimeto

Imunosupressão

# Apresentação antigénica

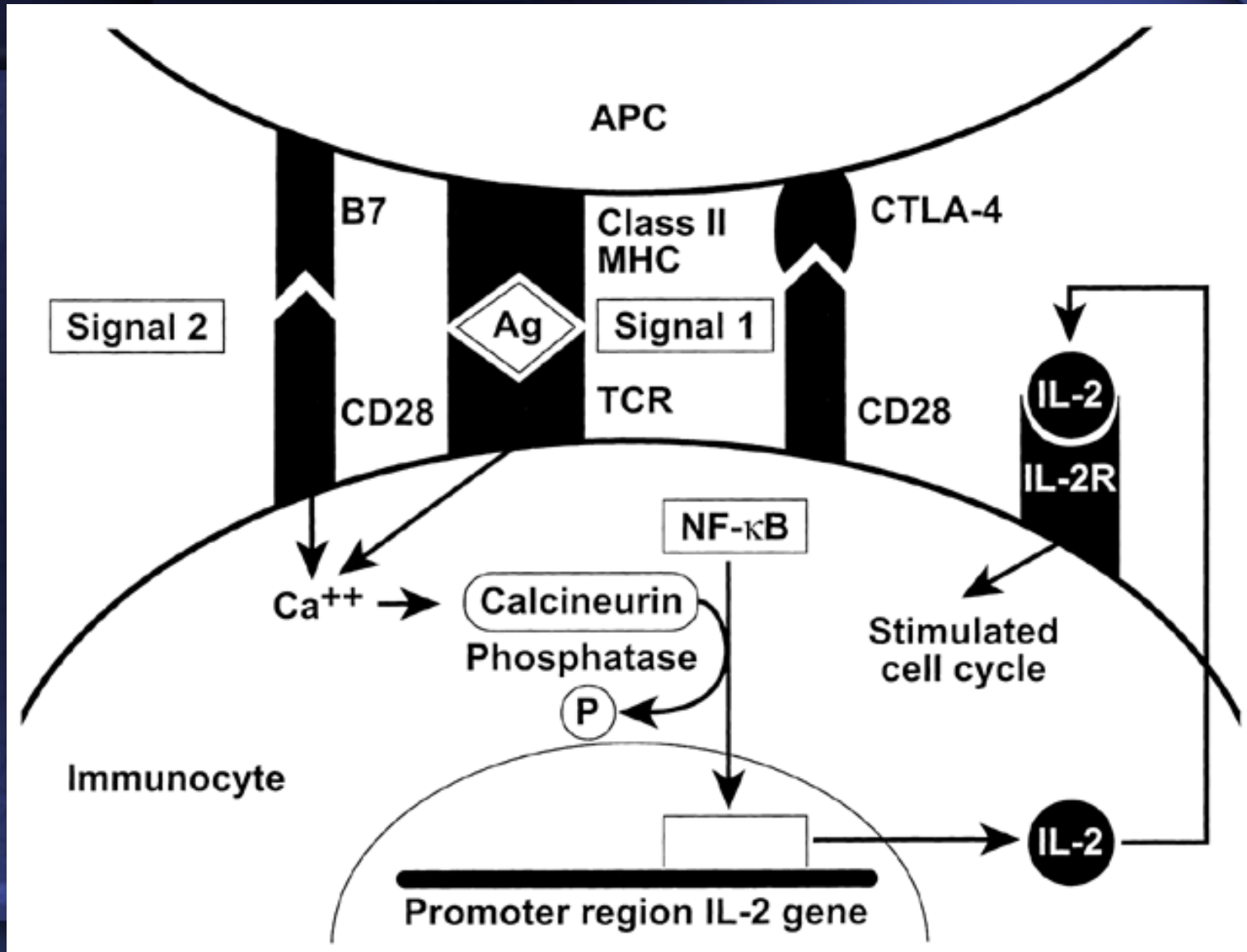
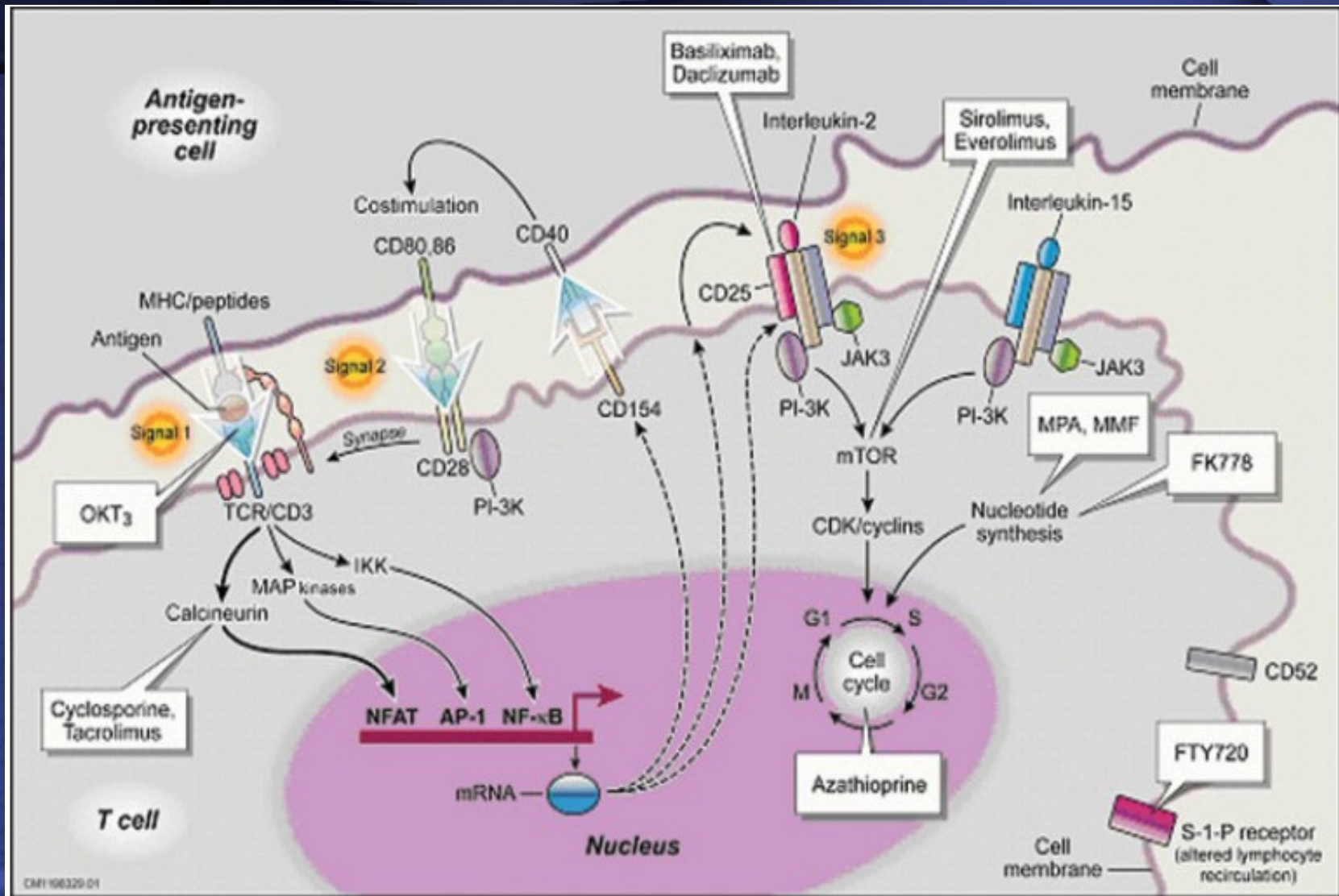


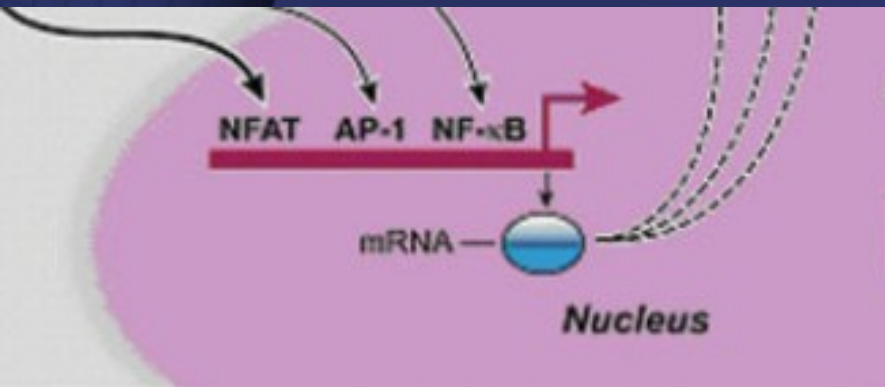
Fig. 1 – Apresentação antigénica (Adaptado de [www.medscape.com](http://www.medscape.com)).

# Ação Imunosupressora



**Fig. 2** – Modo de ação dos diferentes imunossupressores através da inibição do sinal 1, sinal 2 e sinal 3. (Adaptado de, Post D.J. et al, “Immunossuppression in Liver Transplantation”, Liver Transplantation, Vol.11, no.11, (2005))

# Corticosteroides



- Inibem a produção de:

IL-1

IL-2

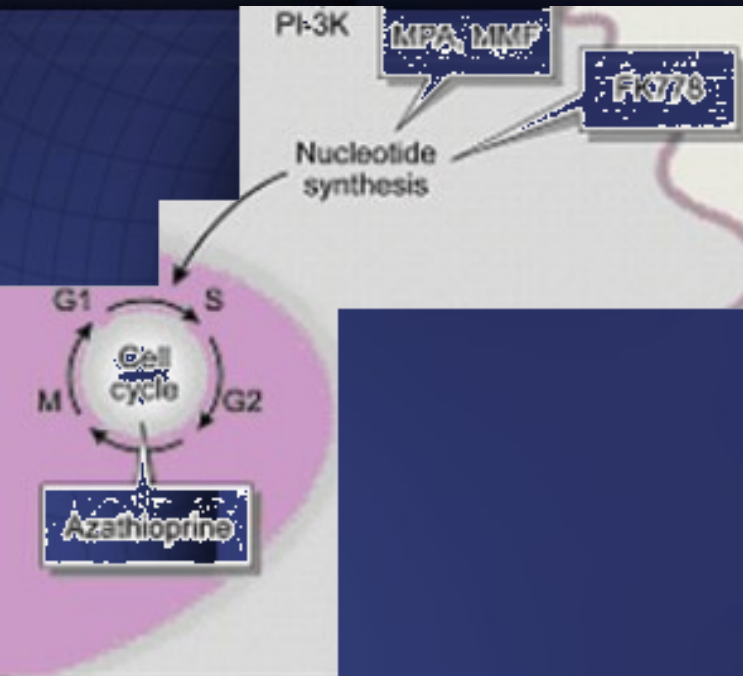
IL-3

IL-6

- Alteram a expressão de moléculas de adesão

- Provocam uma linfocitopenia genérica

# Antimetabolitos: Azotipurina e Micofenolato mofetil



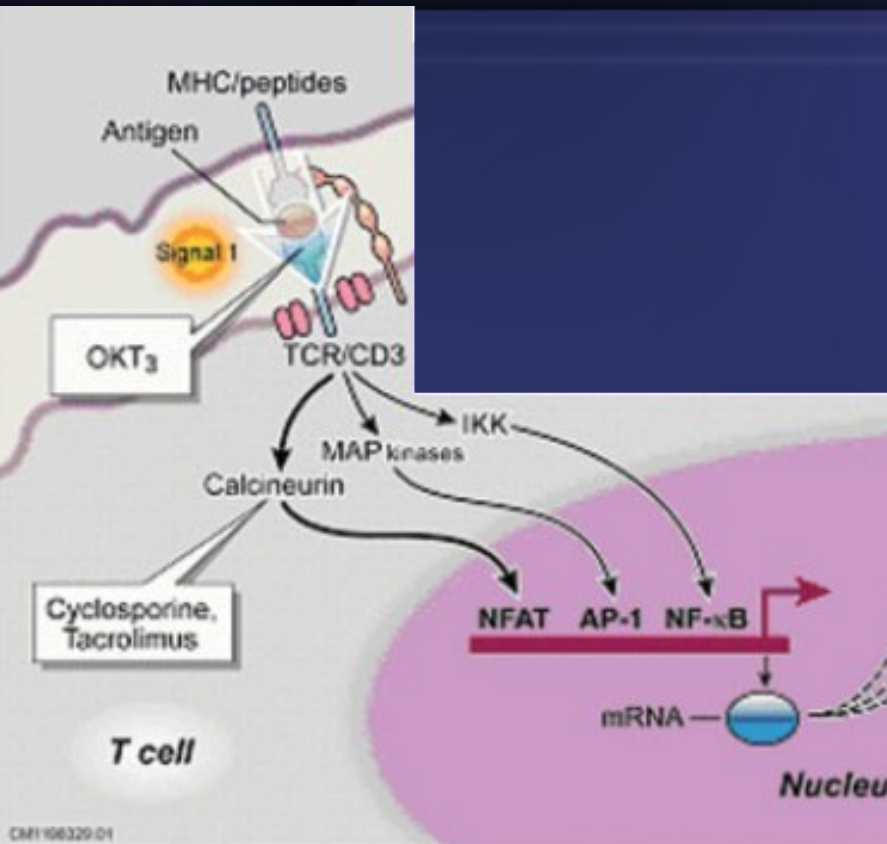
## ***Azotipurina:***

- A Azotipurina é um análogo purínico que impede a progressão do ciclo celular pela inibição da síntese de ácidos nucleicos.
- A Azotipurina inibe todas as linhagens hematopoiéticas.

## ***Micofenolato Mofetil:***

- O Micofenolato mofetil é um inibidor da enzima inosinato monofosfato desidrogenase (IMPDH), que catalisa a síntese “de novo” do DNA.
- A maior especificidade do MMF deve-se ao facto dos Linfócitos T e B dependerem da síntese “de novo” para a progressão do seu ciclo celular

# Inibidores da calcineurina: **Ciclosporina e Tacrolimus**



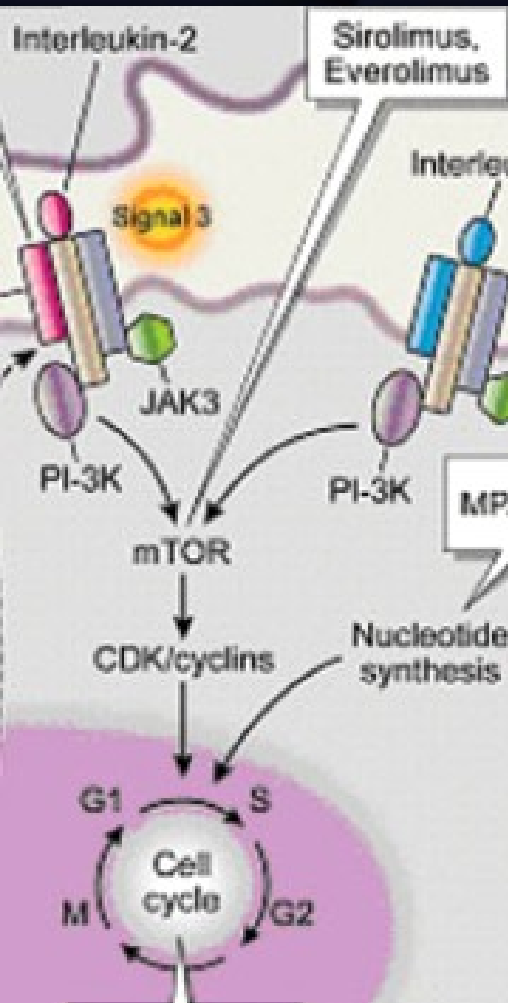
- A calcineurina é uma serina triionina fosfatase activada pela calmodulina presente nos linfócitos T.

- A ciclosporina e o tacrolimus, inibem a desfosforilação do factor nuclear NFAT pela calcineurina.

- A CsA e o FK506 inibem a produção de:  
IL- 2, IL-3, IL-4, IL5, INF- $\gamma$   
Ligando do CD40

- A CsA e o FK506 inibem a proliferação dos linfócitos T.

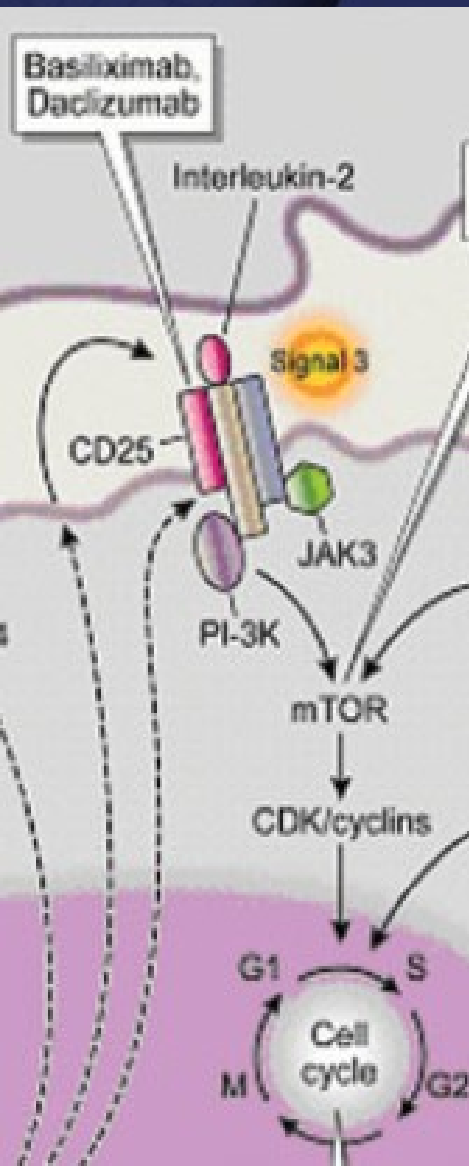
# Inibidores do alvo terapêutico da rampamicina: mTOR



O **Sirolimus** e **Everolimus**: Inibidores do sinal III

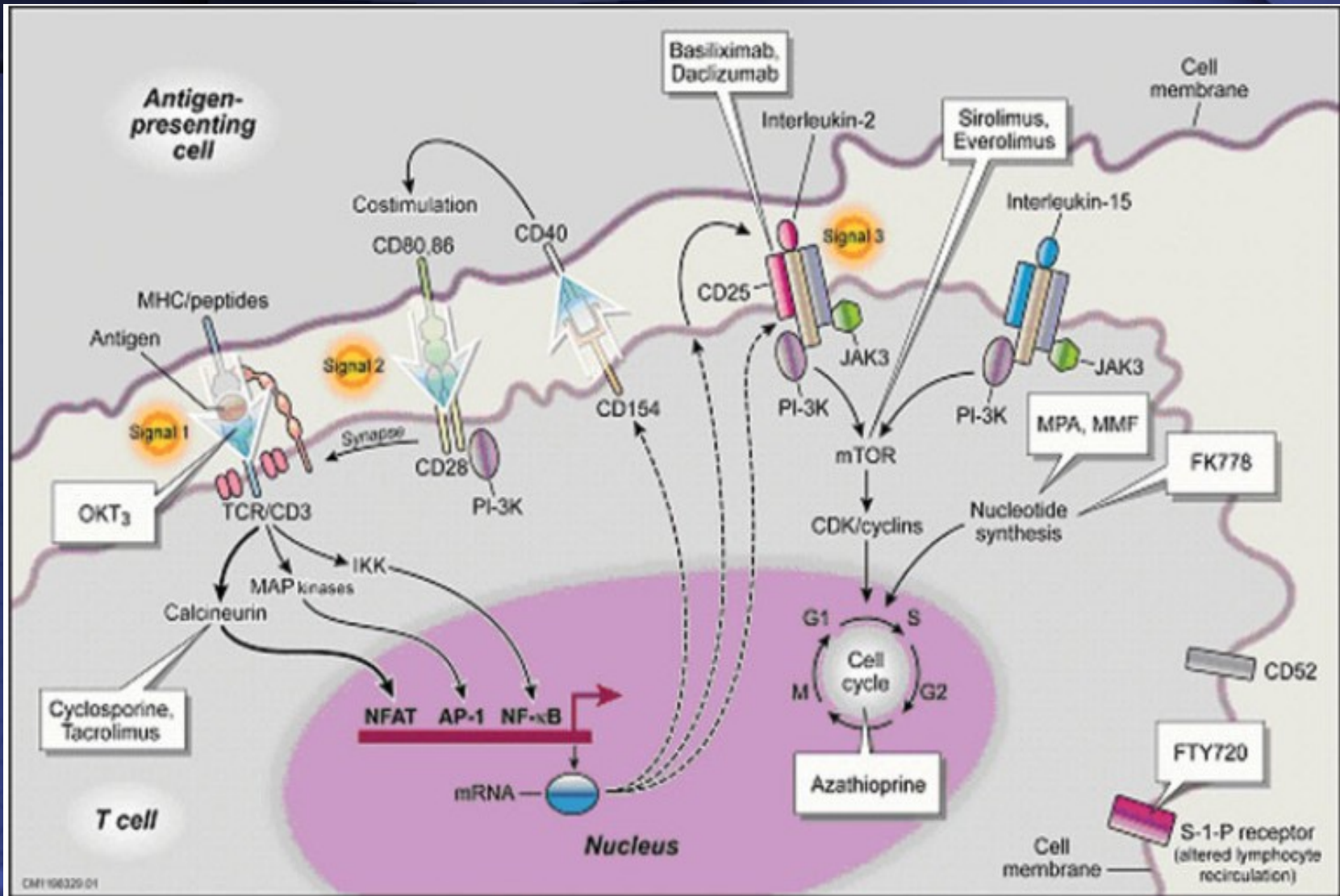
- mTOR (mammalian target of rapamycin) é uma proteína de 250KDa com actividade de quinase que ao associar-se com duas outras proteínas a FKBP-12 e a Rampamicina controlam a progressão do ciclo celular entre a fase G1 e S.
- O Sirolimus e Everolimus inibem a proliferação de Linfócitos T pela a inibição do complexo mTOR.

# Anticorpos monoclonais:



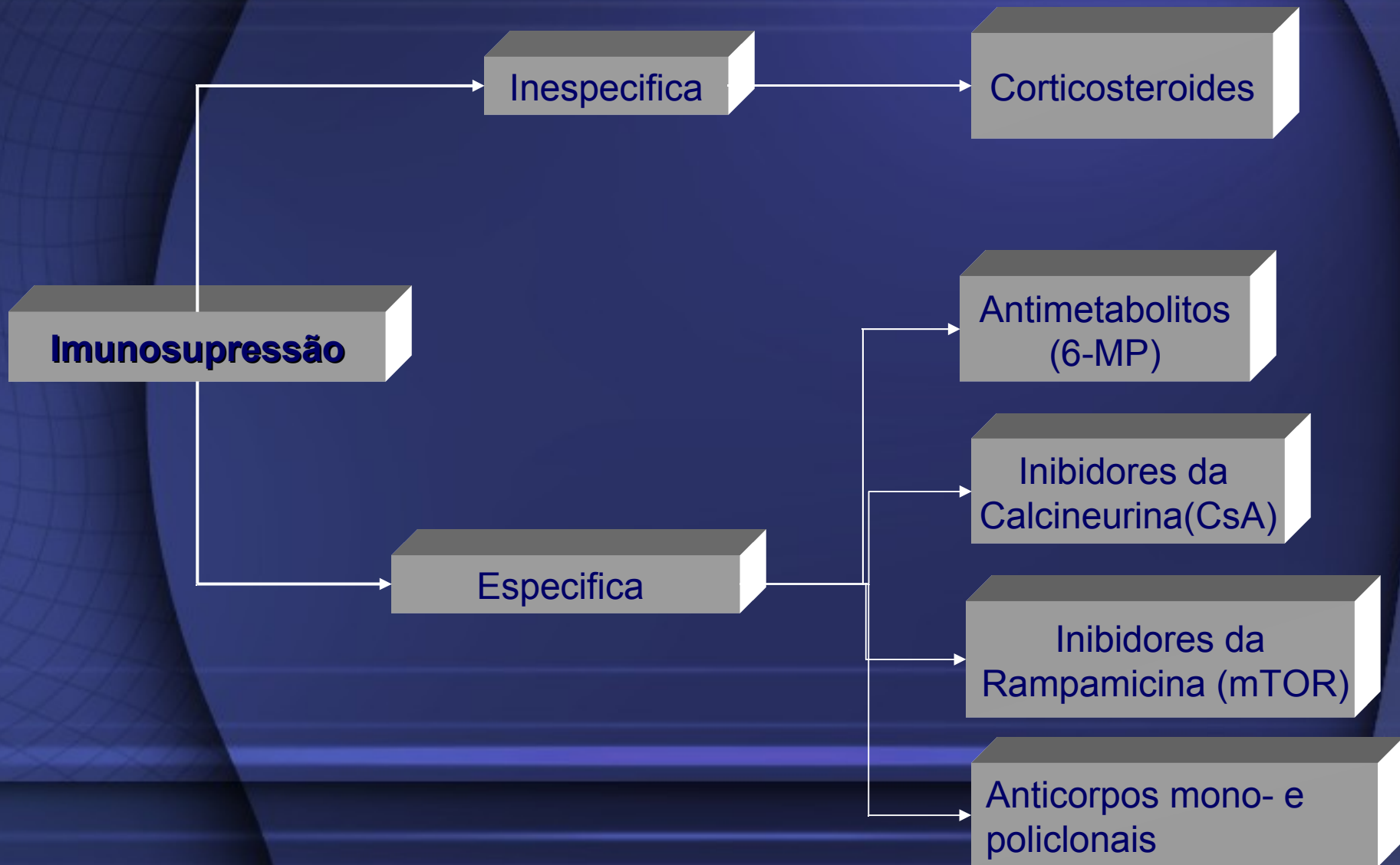
- O primeiro a ser desenvolvido foi o **OKT3**, dirigido para a molécula de CD3, inibindo assim o sinal I.
- O OKT3 inibe todas as linhagens linfocitárias e é conhecido o seu efeito de provocar uma libertação massiva de citocinas.
- De aplicação mais recente são o **Daclizumab** e o **Basiliximab**.
- Anticorpos dirigidos para a molécula acessória CD-25, do receptor da IL-2.
- Inibem apenas a proliferação de Linfócitos T, CD25+.

# Ação Imunosupressora

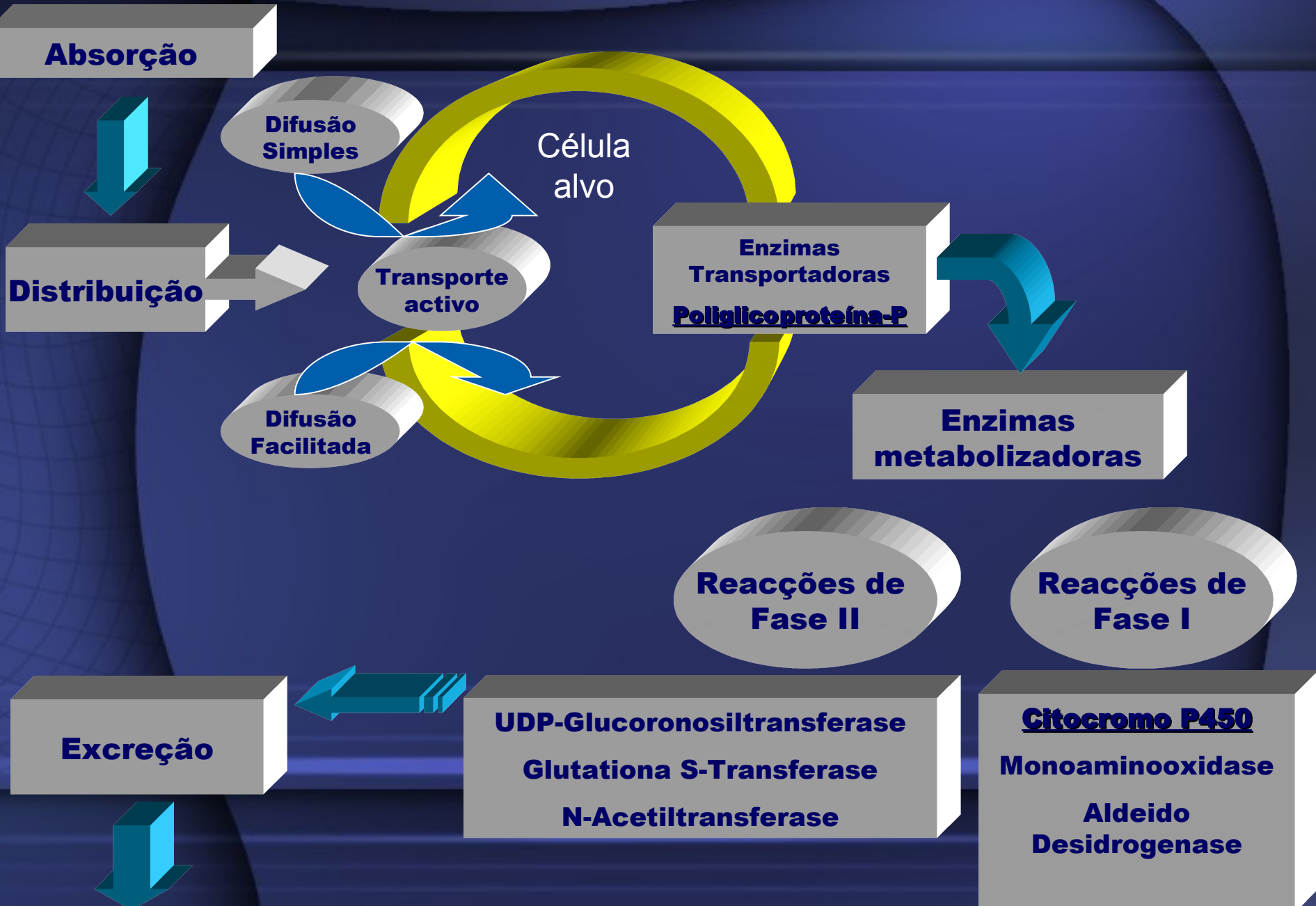


**Fig. 3** – Modo de ação dos diferentes imunossupressores através da inibição do sinal 1, sinal 2 e sinal 3. (Adaptado de, Post D.J. et al, “Immunossuppression in Liver Transplantation”, Liver Transplantation, Vol.11, no.11, (2005))

# Imunossupressão



# Farmacodinâmica e biodisponibilidade de Fármacos



# **Farmacogenética**

**Pretende caracterizar genes que envolvam pontos chave na metabolização de fármacos.**

# Farmacogenética: Citocromo P450

- Existem aproximadamente 55 genes diferentes que codificam enzimas citocromo P450.

- Estes genes classificam-se em diferentes famílias e sub-famílias consoante a sua homologia.

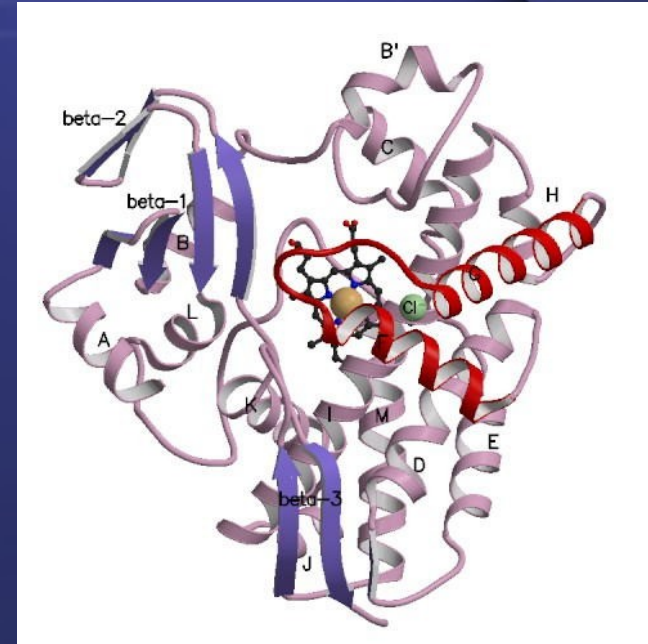
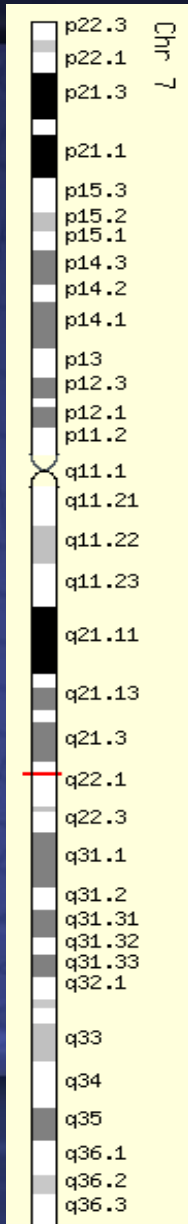


Fig. 4 – Estrutura molecular do citocromo P450 ([www.kms.ac.jp](http://www.kms.ac.jp))

- De entre esta grande diversidade, a família CYP3A é a mais relevante, em transplantação, dado os imunossupressores serem os seus principais substratos.

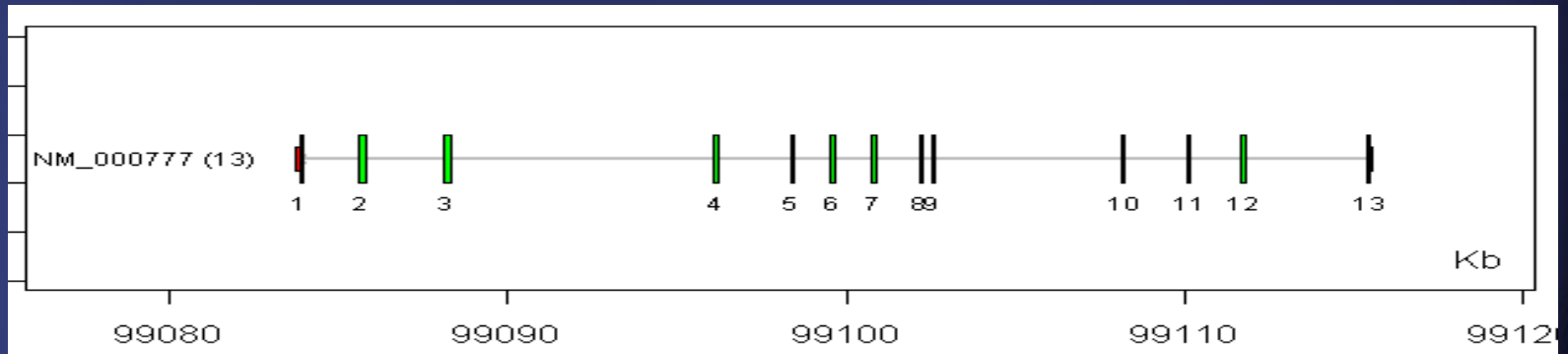
# Citocromo P450



- Os quatro genes CYP3A, localizam-se numa região de 218 Kb no cromossoma 7q22.1, pela seguinte ordem: CYP3A5, CYP3A7, CYP3A4 e CYP3A43.

# Citocromo P450

- Diversas variações pontuais, ou SNPs, foram identificadas para a família CYP3A. No entanto, a mais significativa é uma inserção de uma guanina ou adenosina na posição 22893, no exão 3 (referência GeneBank, AC005020) que resulta num codão stop prematuro, originando uma proteína CYP3A truncada.



**Fig. 5** - Organização do gene CYP3A5 ([www.atlasgeneticsoncology.org](http://www.atlasgeneticsoncology.org))

# Citocromo P450

- Diversos estudos efectuados (Zheng et. al., 2003) suportam a tese de que a dose óptima de FK506 a administrar, está relacionada com este polimorfismo presente no gene CYP3A5.

# Farmacogenética: Poliglicoproteína-P

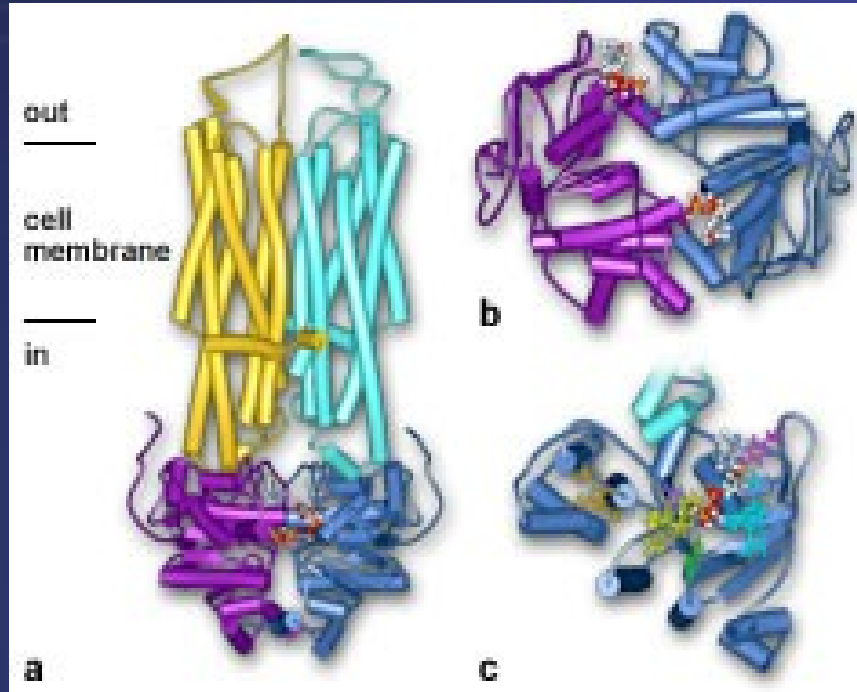
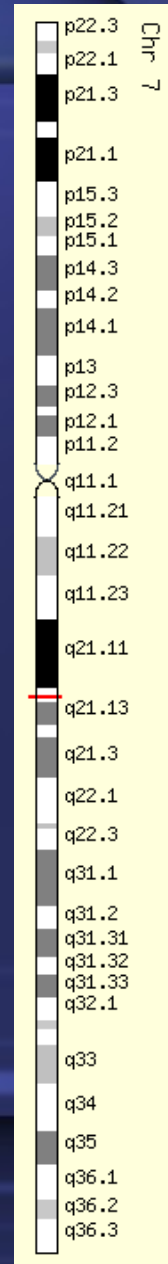


FIG. 5 - Estrutura molecular de Poliglicoproteína-P ([www.csc.mrc.ac.uk](http://www.csc.mrc.ac.uk))

- A poliglicoproteína-P é codificada pelo gene MDR-1 (sigla inglesa para “multidrug resistance-1”).

# Farmacogenética: Poliglicoproteína-P

- O gene MDR-1 localiza-se no cromossoma 7q21, contendo 28 exões.
- Cerca de 15 mutações e 28 SNPs já foram identificados para o gene MDR-1.



# Poliglicoproteína-P

- De entre os SNPs mais bem estudados, destacam-se dois de maior relevância:
  - No exão 21, uma substituição na posição G2677T.
  - No exão 12, uma substituição na posição C1236T.
- Houfroid et. al. (2004) demonstraram que a dose de FK506 era em 40% mais alta em indivíduos homozigóticos para o SNP G2677T do que em indivíduos Wild Type.
- Diversos autores sugerem um desequilíbrio de ligação entre os SNPs no exão 21 e no exão 12.

# Objetivos

- Sequênciação:
  - Sequenciar o exão 3B do gene CYP3A5
  - Sequenciar o exão 21 e 12 do gene MDR1
- Desenvolver uma estratégia de PCR-SSP para avaliar as diferentes mutações.
- Concretizar o estudo das frequências das diferentes mutações no gene MDR1 e CYP3A5.
- Relacionar estes dados com as doses de Tacrolimus e Ciclosporina administradas aos diferentes doentes

# Material e métodos: Doentes

**Tabela 1** – Grupo de doentes a estudar.

	<b>Terapêutica imunossupressora com Ciclosporina</b>	<b>Terapêutica imunossupressora com Tacrolimus</b>
<b>Tranplantados Renais</b>	30	30

As amostras de DNA foram obtidas através de 200  $\mu$ L sangue periférico recorrendo a ao kit:

MagAttract® DNA Blood MIDI M48 Kit (Quiagem®)

# Material e métodos: Primers

## -Primers liofilizados (Invitrogen ®)

- . Centrifugação spin curto (1min. a ~12300 rpm);
- . Diluição para 100pmol/ $\mu$ l (H<sub>2</sub>O estéril);
- . Homogeneização (vórtex);
- . Incubação (24h);
- . Frigorífico a ~ 5°C.

## -Teste aos primers

- . 5 $\mu$ l primer
- . 5 $\mu$ l tampão TAE (tina)
- . 1,5 $\mu$ l loading buffer
- . Electroforese gel agarose (2%) – 15'a 150 200 volts

# Material e métodos: Sequenciação

Tabela 2 – Primers de sequenciação.

	Exão	Sequência	Diluição optima
<b>CYP3A5(F)</b>	3B	3' - CTT AAC GAA TGC TCT ACT GTC – 5'	1:20
<b>CYP3A5(R)</b>	3B	'3' - ACA CCC AGG AAG CCA GAC – 5'	1:20
<b>pGP G2677T(F)</b>	21	3' -GCA GGC TAT AGG TTC CAG GCT -5'	1:10
<b>pGP G2677T(R)</b>	21	3' - AAC AGC CGG GTG GTG TCA – 5'	1:10
<b>pGP C1236T(F)</b>	12	3' - TCC TGT GTC TGT GAA TTG CCT TG – 5'	1:10
<b>pGP C1236T(R)</b>	12	3' - GCT GAT CAC CGC AGT CTA GCT CGC – 5'	1:10

# Material e métodos: PCR de Amplificação

-Condições reacionais para a PCR de amplificação:

10  $\mu\text{L}$  Tampão de PCR 5X (Promega®)

3  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25mM (Promega®)

2,5  $\mu\text{L}$  dNTPs (GE Healthcare)

5  $\mu\text{L}$  Primer (F)

5  $\mu\text{L}$  Primer (R)

0,35  $\mu\text{L}$  DNA Taq Polimerase (Promega®)

5  $\mu\text{L}$  DNA (amostra)

19,5  $\mu\text{L}$  de dd H<sub>2</sub>O

$V_t = 50 \mu\text{L}$

# Material e métodos: PCR de Amplificação

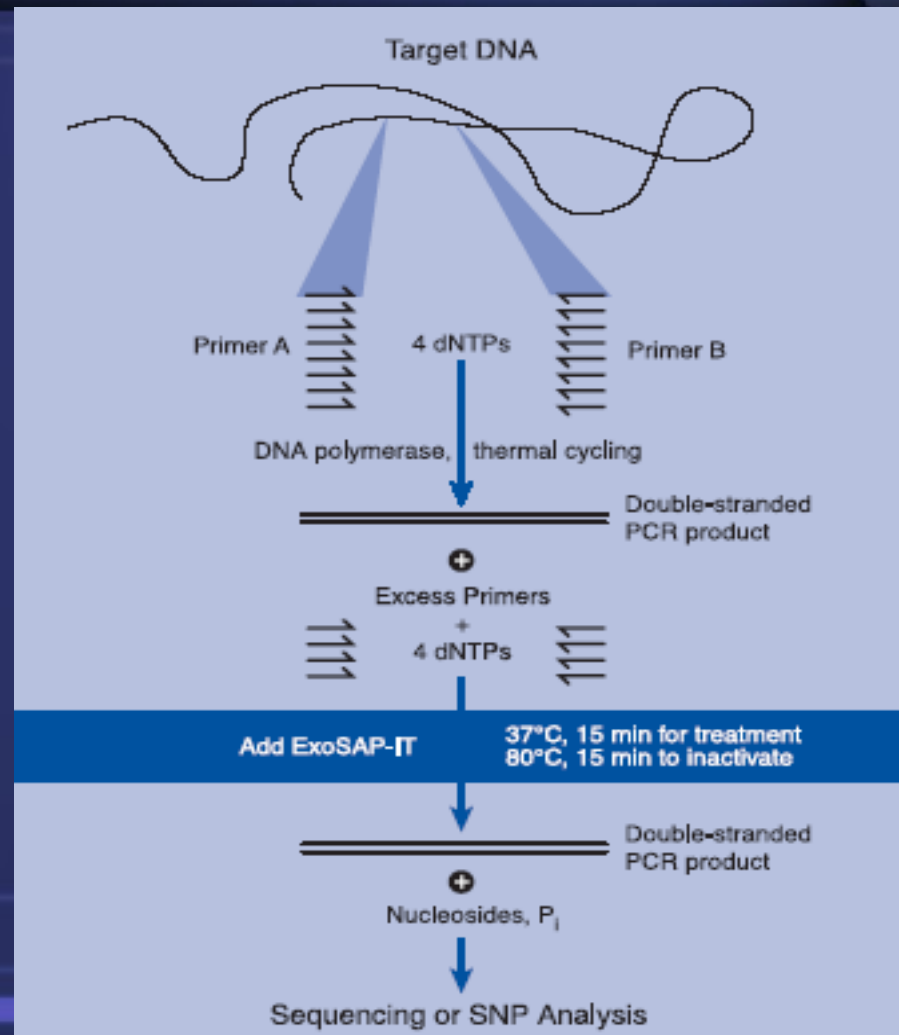
Programa de PCR:

Numero de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (seg)
1	96 °C	300
10	96°C	30
	65°C	60
10	96°C	30
	60°C	60
15	96°C	30
	55°C	60
	72°C	60
	72°C	420
	4°C	-

Para a reacção de amplificação optou-se por um programa de TouchDown PCR.

# Material e métodos: Purificação Pós-PCR

- Purificação dos produtos de PCR:
  - 3  $\mu\text{L}$  de ExoSAP
  - 20  $\mu\text{L}$  de produto de PCR



**Fig. 6** – Purificação dos produtos de PCR com ExoSAP-IT. (www.usbweb.com)

# Material e métodos: Sequencição

Condições reaccionais para a reacção de sequenciação:

- 3  $\mu\text{L}$  de produto de amplificação (DNA)
- 4  $\mu\text{L}$  de terminadores (BigDye® Terminator V1.1)
- 1  $\mu\text{L}$  de primer
- 12  $\mu\text{L}$  de dd H<sub>2</sub>O

# Material e métodos: Sequenciação

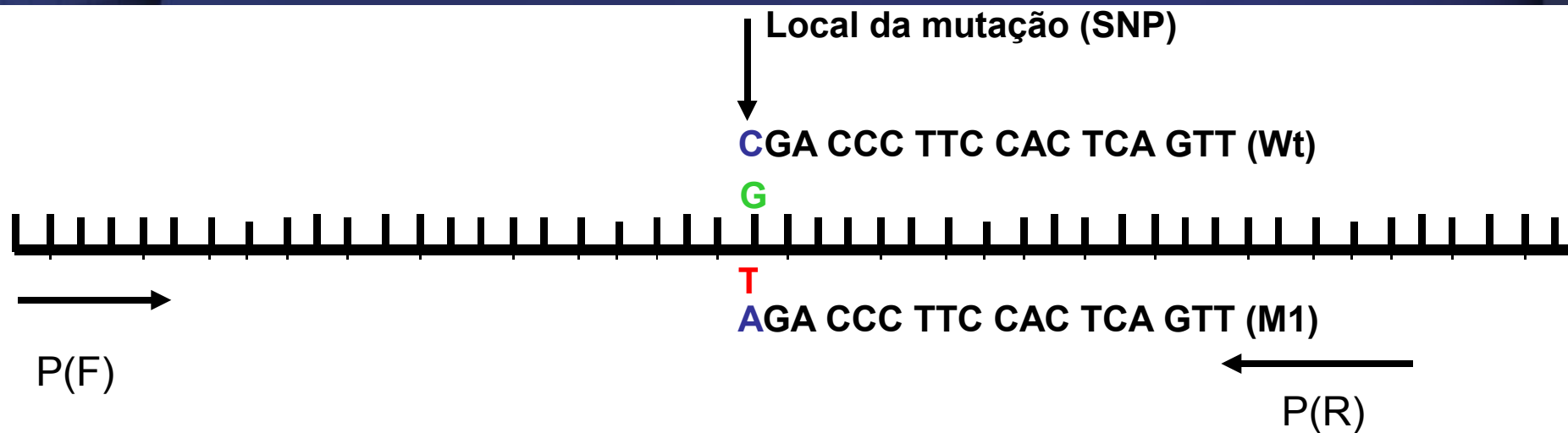
Programa de sequenciação:

Numero de ciclos	Temperatur (°C)	Tempo (seg)
25	94°C	10
	61°C	50
	72°C	30
	4°C	-

Após a reacção de sequenciação, os produtos foram purificados com resina Sephadex G-50 (GE Healthcare)

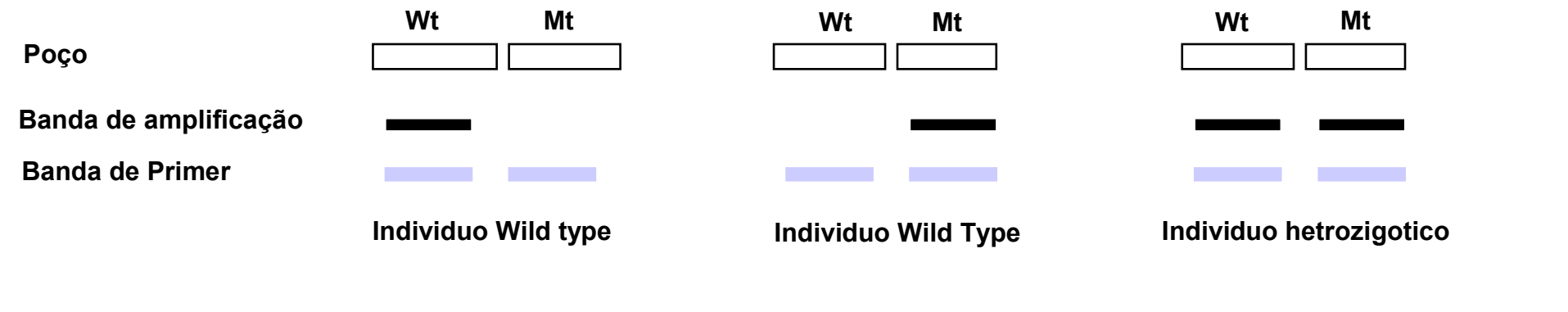
# Material e métodos: PCR-SSP

- Elaboração do Miss Match: PCR-SSP



# Material e métodos: PCR-SSP

- Interpretação da PCR-SSP



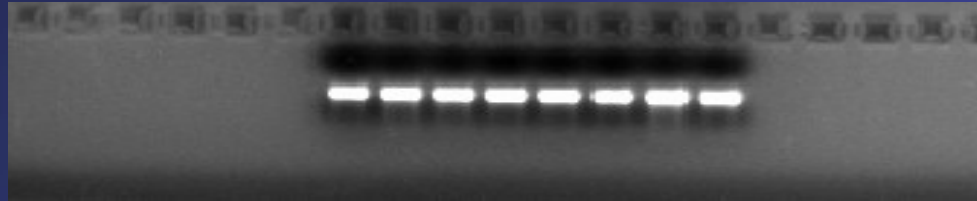
# Material e métodos: PCR-SSP

Tabela 3 – Primers para PCR-SSP

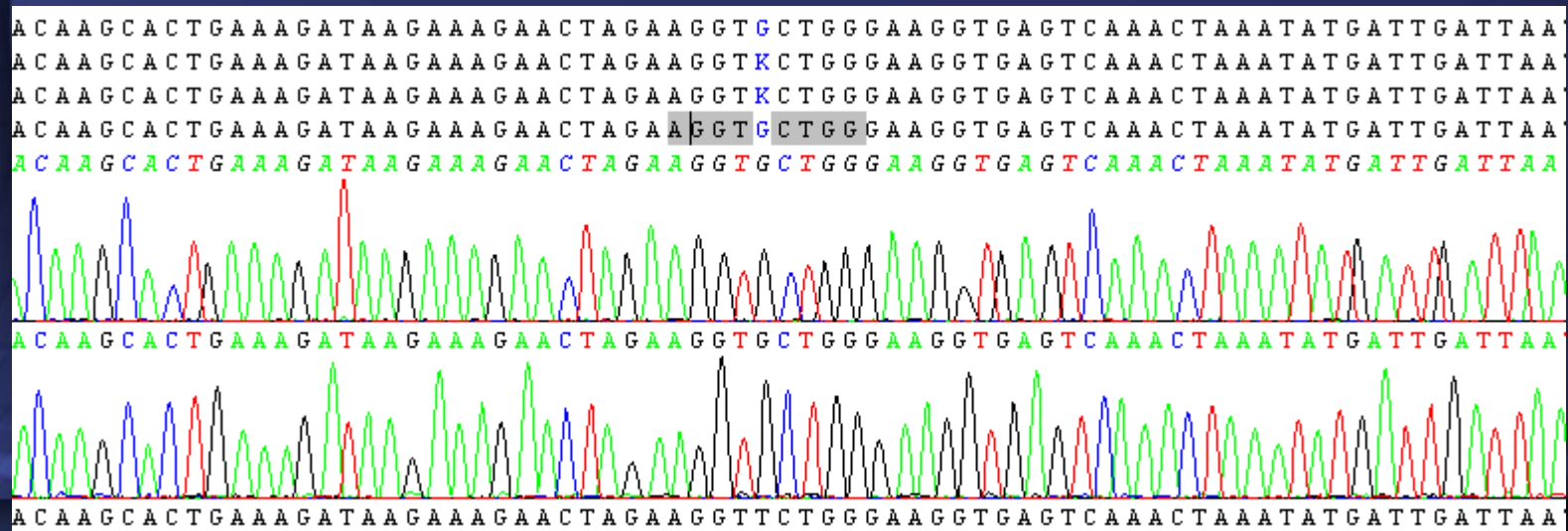
	Exão	Sequência	Diluição optima
P-gp G2677T(F)	21	3´-GCA GGC TAT AGG TTC CAG GCT -5´	1:20
P-gp G2677T(R)Wt	21	3´ - AGT TTG ACT CAC CTT CCC AGC – 5´	1:20
P-gp G2677T(R)Mt(T)	21	3´ - AGT TTG ACT CAC CTT CCC AGA – 5´ ,	1:20
P-gp G2677T(F)Mt(A)	21	3´ -AGT TTG ACT CAC CTT CCC AGT – 5´ .	1:20
P-gp C1236T(F)Wt	12	3´ - TCC TGG TAG ATC TTG AAG GGC – 5´	1:20
P-gp C1236T(F) Mt	12	3´ - TCC TGG TAG ATC TTG AAG GGT – 5´ .	1:20
P-gp C1236T(R)	12	3´ - GCT GAT CAC CGC AGT CTA GCT CGC – 5´	1:20

# Resultados

# Resultados: Sequenciação



**Fig. 6** – Produtos da PCR de amplificação. Estes produtos foram posteriormente diluídos a 1:10 e purificados para a reacção de sequênciãção.



**Fig 7** – Electroferograma da reacção da sequênciãção do exão 21 da poliglicoproteína-P, evidenciando a substituição G2677T,A (em que K= G ou T)

# Resultados: Sequenciação

**Tabela 1** – Estudo das frequências das mutações estudadas para os indivíduos a recorrer a CsA.

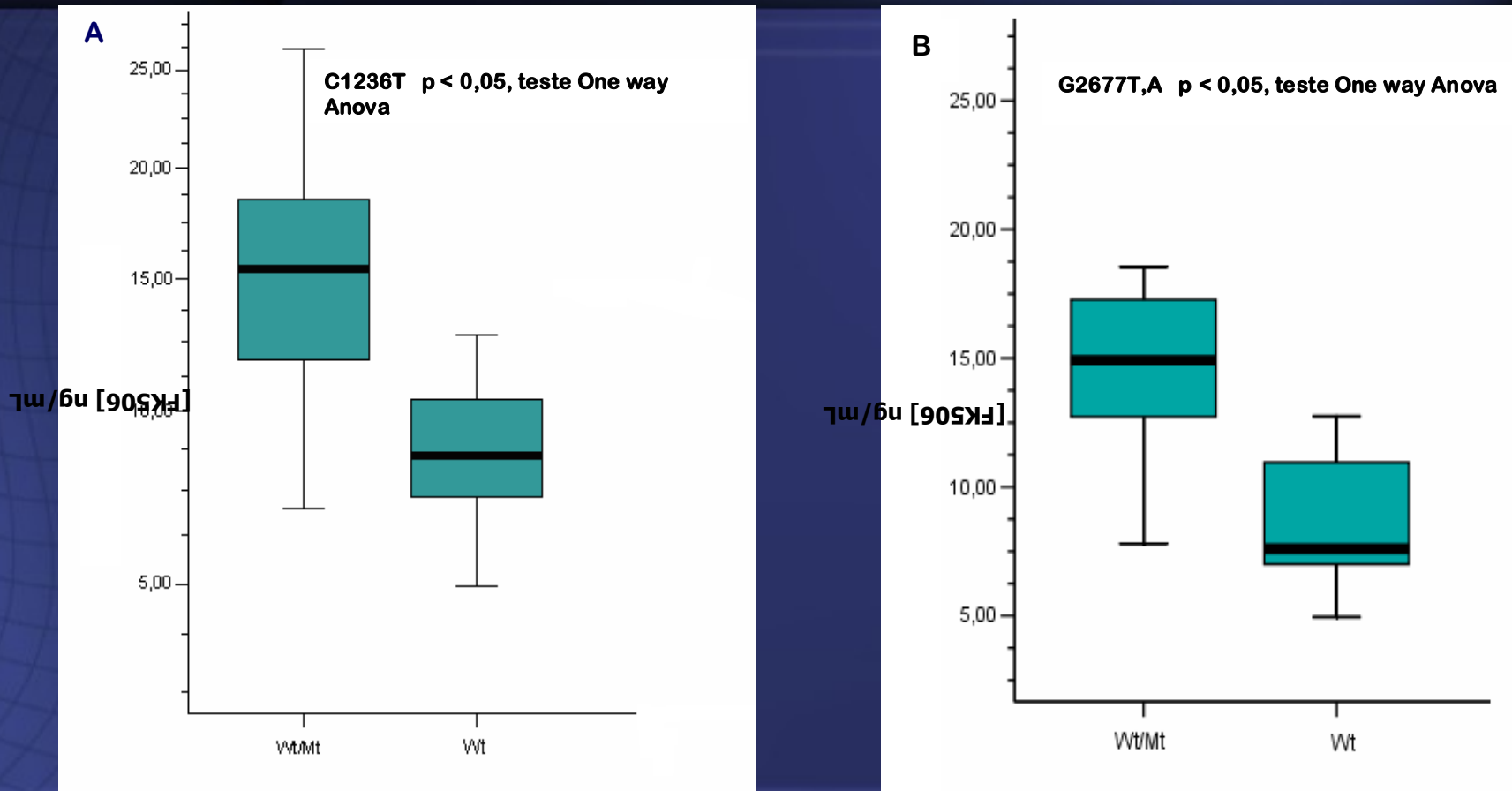
Mutação	Gene	Sequência de Nucleotidos		Genotipo		
		Wild Type(Wt)	Mutante(Mt)	Wt/Wt	Wt/Mt	Mt/Mt
C1236T	MDR1	agggCctga	agggTctga	55,56%(n=27)	40,74%(n=27)	3,7%(n=27)
G2677T,A	MDR1	aggtGctgg	aggtT/Actgg	59,1%(n=22)	31,82%(n=22)	9,1%(n=22)
CYP3A5*3	CYP3A	tcttcatatctc	tcttcaGtatctc	10% (n=20)	25%(n=20)	65%(n=20)

# Resultados: Sequenciação

**Tabela 2** – Estudo das frequências das mutações estudadas para os indivíduos a recorrer a FK506.

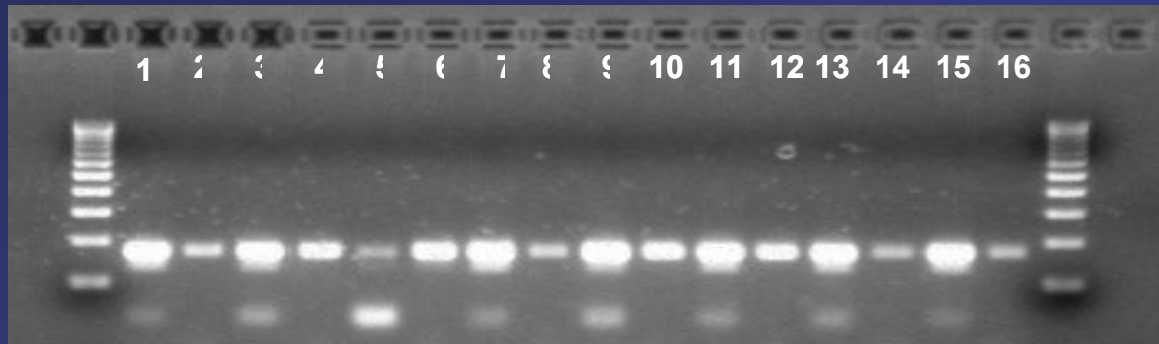
Mutação	Gene	Sequência de Nucleotidos		Genotipo		
		Wild Type(Wt)	Mutante(Mt)	Wt/Wt	Wt/Mt	Mt/Mt
C1236T	MDR1	agggCctga	agggTctga	56,52%(n=23)	34,78%(n=23)	8,7%(n=23)
G2677T,A	MDR1	aggtGctgg	aggtT/Actgg	55,6%(n=18)	38,89%(n=18)	5,56%(n=18)
CYP3A5*3	CYP3A	tctttcatatctc	tctttcaGtatctc	0%(n=23)	21,74%(n=23)	78,26%(n=23)

# Resultados: Sequenciação



**Fig. 4** – Correlação entre o SNP C1236T do exão 12 do gene MDR1 (A) e do SNP G2677T,A do exão 21 do gene MDR1 com os respectivos valores de concentração plasmática de FK506 medidos após a primeira toma do imunossupressor, após o transplante. Os gráficos indicam a distribuição dos valores plasmáticos de FK506, agrupados de acordo com a variação alélica. Wt, genótipo “wild type”; Mt, genótipo mutante.

# Resultados: PCR-SSP



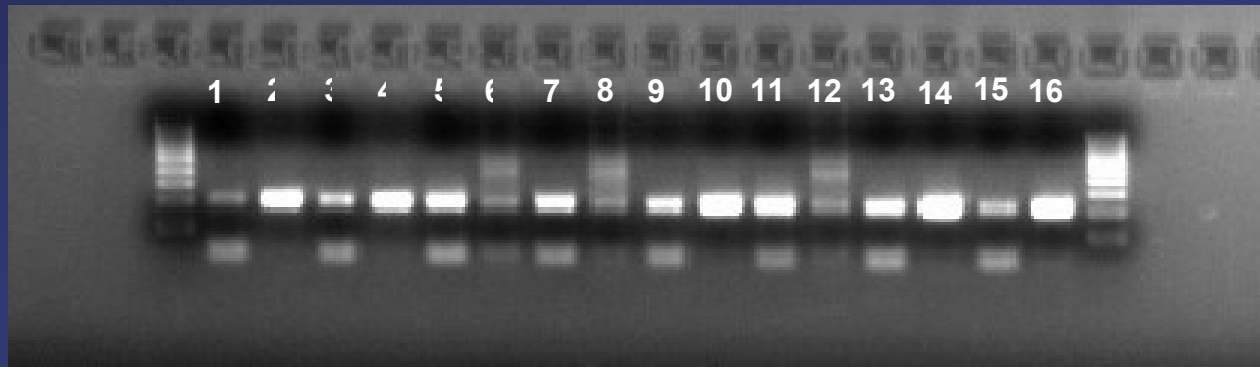
**Fig. 5-** PCR-SSP para pesquisa da mutação C1236T. As amostras encontram-se agrupadas duas a duas, sendo a primeira correspondente ao primer “wild type” e a segunda corresponde ao primer que reconhece a mutação.

**1 e 2 –** Amostra com um perfil “Wild Type”.

**3 e 4 –** Amostra com um perfil heterozigótico.

**5 e 6 –** Amostra com um perfil mutante.

# Resultados: PCR-SSP



**Fig. 6-** PCR-SSP para pesquisa da mutação G2677T. As amostras encontram-se agrupadas duas a duas, sendo a primeira correspondente ao primer “wild type” e a segunda corresponde ao primer que reconhece a mutação

1 e 2 – Amostra com um perfil mutante.

3 e 4 – Amostra com um perfil heterozigótico.

5 e 6 – Amostra com um perfil “Wild Type”.

# Conclusões

- Os indivíduos que possuem a mutação C1236T e G2677T/A, no gene MDR1, podem classificar-se de maus metabolizadores, no que diz respeito ao uso do FK506.
- Não existe relação entre mutação estudada para o gene CYP3A e a concentração plasmática de FK506.
- Não existe relação entre as mutações estudadas e as concentrações plasmáticas de CsA
- A PCR-SSP, representa uma técnica mais rápida e menos dispendiosa para a pesquisa de uma determinada mutação, no entanto, requer uma otimização cuidada e demorada.

# Perspectivas futuras

- Pesquisar novos SNPs nas regiões estudadas, bem como novas regiões de interesse, e sua relação com a terapêutica imusupressora realizada.
- Estudar novos genes que de alguma forma se relacionem com o metabolismo dos fármacos imunosupressores.
- Tentar reunir num teste, o estudo de um conjunto de genes que permita traçar um perfil genético da capacidade metabolizadora de um individuo

**Questões ?**