

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
MESTRADO PROFISSIONAL

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO c.98T>C DO GENE *UGT1A9* E  
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDO MICOFENÓLICO EM PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAI**

Lizania Rodrigues Ruschel

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Porto Alegre

2015

LIZANIA RODRIGUES RUSCHEL

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO c.98T>C DO GENE *UGT1A9* E  
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDO MICOFENÓLICO EM PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa.. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Co-orientadora: Profa. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt

Porto Alegre  
2015

**LIZANIA RODRIGUES RUSCHEL**

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO c.98T>C DO GENE *UGT1A9* E  
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDO MICOFENÓLICO EM PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA:**

**Profa. Dra. Ana Paula Duarte - PUCRS**

**Profa. Dra. Clarice Alho - PUCRS**

**Profa. Dra. Mirna Bainy Leal - UFRGS**

Porto Alegre

2015

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus nosso Pai, pelo dom da vida pela fé e pela esperança, para sempre conseguirmos seguir em frente.

À minha família, pelo apoio, segurança e confiança em mim depositada. Em especial aos meus pais: Solange e João Miguel, minha irmã Lizandra companheiros de todas as horas e minha sobrinha Maria Eugênia que fez com que meus dias ficassem mais radiantes.

Ao meu querido esposo George Hamilton, pela disposição de sempre, paciência, resiliência, companheirismo, apoio e inúmeras horas a mim dedicadas em nossas inesquecíveis viagens para Porto Alegre.

Às minhas filhas caninas Bebel e Negrinha, que mesmo sem falar nada, estavam sempre presentes com olhares apoiadores.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Thiesen pela oportunidade de ser orientada por ela, acreditando em mim, mesmo sabendo que eu não teria tempo para dedicação exclusiva que eu gostaria de ter tido por causa do meu trabalho, sempre calma, firme e forte enfrentando adversidades.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virgínia Schmitt que me aceitou como co-orientadora, me incentivou e me ajudou muito para a realização desse mestrado.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Duarte, pelo acolhimento e ajuda para melhor desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas das aulas de mestrado, pelas incontáveis tardes e noites que passamos juntos adquirindo e trocando experiências maravilhosas.

Agradeço a querida IC pela valiosa ajuda: Aline Bueno, e pelo incentivo e apoio do CNPq para obtenção dos materiais do estudo.

## Lista de abreviações

AcMPAG: acilglucoronídeo

AZA: azatioprina

CNI: inibidor da calcineurina

CsA: ciclosporina

EC-MPS: micofenolato de sódio com revestimento entérico

EHC: circulação enterohepática

FD: dose fixa

GSTs: glutationa-S transferases

HPLC/UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta

IMPDH: inosina monofosfato desidrogenase

KTRS: receptores de transplante renal

MMF: micofenolato mofetil

MPA: ácido micofenólico

MPAG: 7-O glucoronídeo do MPA

NATs: N-acetiltransferases

NFAT: fator de reatividade nuclear de células T

PCR: reação em cadeia de polimerase

SLCO: *solute carrier organic anion transporter*

SNP: polimorfismo de um único nucleotídeo

SOT: transplante de órgãos sólidos

Tac: tacrolimus

TDM: monitoramento terapêutico

TMPTs: tiopurina-S metiltransferases

UGTs: uridina difosfato glucoroniltransferases

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do micofenolato mofetil (MMF) e do ácido Micofenólico (MPA).....	15
<b>Figura 2:</b> Representação das etapas da biotransformação do micofenolato mofetil.....	16
<b>Tabela 1.</b> Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo.....	43

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	09
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>Capítulo 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Transplante de Órgãos.....	12
1.2 Transplante Renal.....	13
1.3 Terapia Imunossupressora.....	13
1.4 Micofenolato Mofetil (MMF) e Ácido Micofenólico (MPA).....	15
1.5 Monitoramento terapêutico .....	17
1.6 Farmacogenética.....	18
2. HIPÓTESE OPERACIONAL.....	21
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral .....	21
3.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>Capítulo 2 - ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	22
<b>Capítulo 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46



## RESUMO

Ao realizar um transplante, é de fundamental importância que, seja utilizado todo o arsenal terapêutico disponível e cuidados para evitar a rejeição do enxerto. A incidência e a intensidade da rejeição aguda têm sido reduzidas graças ao uso de fármacos imunossupressores, como ciclosporina, tacrolimus, micofenolato de mofetil (MMF), anticorpos monoclonais e policlonais. O MMF é um pró-fármaco com atividade após sua hidrólise a ácido micofenólico (MPA). No entanto, possui grande variabilidade inter-individual de resposta e por isso é crescente a importância da realização de seu monitoramento terapêutico, o qual permite individualizar a dose de MMF e otimizar a imunossupressão, minimizando os potenciais efeitos tóxicos. A farmacogenética estuda a relação entre as características genéticas do indivíduo e as diferentes respostas a uma mesma terapia farmacológica. No caso de fármacos imunossupressores, alterações genéticas de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em genes que codificam proteínas envolvidas no transporte ou no metabolismo do fármaco podem modificar a resposta do paciente à terapêutica. As UDP-glucuronosiltransferases (UGTs) pertencem a um grupo de enzimas envolvidas na fase II, responsável pela detoxificação de substâncias endógenas e exógenas. A UGT1A9 é de especial interesse por ser a principal enzima envolvida no metabolismo do ácido micofenólico. Esta enzima é codificada pelo gene *UGT1A9*. No presente estudo, foi investigado o efeito das variantes alélicas de *UGT1A9* c.98T>C (rs72551330; g. 87289T>C) no metabolismo de MMF em 39 pacientes voluntários transplantados renais. Foram dosados os níveis de MPA por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detecção com ultravioleta (HPLC/UV) e a análise do polimorfismo c.98T>C do gene *UGT1A9* foi realizada utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR), seguida de purificação do fragmento e sequenciamento. Todos os indivíduos investigados apresentaram o mesmo genótipo (c.98TT) para este polimorfismo, não possibilitando a avaliação da influência das variantes ou genótipos deste polimorfismo sobre os níveis plasmáticos de MPA e MPAG, apesar de níveis diversos destes compostos terem sido identificados nos pacientes.

Palavras-chave: MMF, MPA, UDP-glucuronosiltransferases, farmacogenética, transplante renal.

## ABSTRACT

After the proceeding of a transplant, it is of huge concern the use of all therapeutic resource available in order to prevent graft rejection. The incidence and severity of acute rejection have been reduced along time due to the development of new immunosuppressive agents such as cyclosporin, tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF), specific polyclonal and monoclonal antibodies. Mofetil mycophenolate (MMF) is a prodrug active only after its hydrolysis to mycophenolic acid (MPA). Once it, has a large variability on inter-individual response, an increasing need of therapeutic monitoring arises. This will permit an individualization of MMF therapy, optimizing immunosuppression and minimizing potential toxic effects. The aim of pharmacogenetics is to evaluate the association between individual genetic characteristics and different responses to the same therapeutic regimen. When considering immunosuppressive drugs, genetic changes on a single nucleotide (single nucleotide polymorphisms - SNPs) of genes encoding proteins involved in transport or drug metabolism may affect patient's response to therapy. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) belong to a group of enzymes involved in phase II reactions, responsible for the detoxification of endogenous and exogenous substrates. UGT1A9 is of particular interest once it is the primary enzyme involved in the metabolism of the MPA. This enzyme is encoded by the *UGT1A9* gene. In the present study, we investigated the effect of *UGT1A9* c.98T>C (rs72551330; g. 87289T>C) allelic variants on MMF metabolism in 39 renal transplant volunteers. MPA levels were measured by high pressure liquid chromatography using ultraviolet detection (HPLC/UV). The analysis of c.98T>C polymorphism was performed by polymerase chain reaction (PCR), followed by fragment purification and sequencing. All investigated individuals showed having the same polymorphism genotype (c.98TT) evaluation of variants or genotype influence on plasma levels of MPA and MPAG was not possible, even though different levels were observed in the study.

Keywords: MMF, MPA, UDP-glucuronosyltransferases, pharmacogenetics, kidney transplantation.

# Capítulo 1

## Introdução e objetivos

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 Transplante de Órgãos**

O transplante de órgãos é uma alternativa para o tratamento de certas doenças que são de outra forma consideradas terminais (Reis et al., 2013). Constitui-se em alternativa terapêutica segura e eficaz para o tratamento de diversas doenças, determinando melhoria na qualidade e na perspectiva de vida de muitos pacientes (Zuber et al., 2014).

No Brasil, o primeiro transplante ocorreu em São Paulo, em 1965, com um transplante de rim. No entanto, o número de transplantes era reduzido na época, em razão da pequena sobrevida dos receptores. Em 1991, quando já havia um bom arsenal de fármacos imunossupressores para reduzir a rejeição aos órgãos, foi criada na Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo uma Central de Notificação de Órgãos e Tecidos, mais conhecida como Central de Transplantes (Rossiter et al., 2012).

Os transplantes de rim e de fígado têm aumentado nos últimos anos. Hoje, com a evolução das técnicas científicas, o Brasil detém um dos maiores programas públicos de transplante de órgãos e tecidos do mundo, destacando-se pelo crescimento do número de transplantes a cada ano (Sodré et al., 2012). Por outro lado, as taxas de transplante de pulmão, coração e pâncreas mantiveram-se estáveis nos últimos 10 anos e as listas de espera ainda são longas e, muitas vezes, os pacientes morrem antes de serem chamados, principalmente por causa do baixo número de doadores efetivos (Reis et al., 2013).

O Brasil atingiu a marca de 12,6 doadores por milhão de habitantes em 2012, porém este é um número insuficiente em comparação com os países desenvolvidos. A Espanha, um país de referência para o seu modelo de captação de órgãos, teve uma taxa de 35,3 doadores por milhão no mesmo período (Reis et al., 2013). Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes, até o primeiro semestre de 2009 havia 31.270 pacientes na lista de espera para transplante renal (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2008).

Face ao exposto, é fundamental que, ao realizar um transplante, seja utilizado todo o arsenal terapêutico disponível e cuidados para evitar a rejeição do enxerto.

## 1.2 Transplante Renal

O primeiro transplante renal bem sucedido foi realizado em 1954 em Boston, Massachusetts, nos Estados Unidos, entre gêmeos idênticos, destacando o importante papel de histocompatibilidade no curso clínico de transplante (Nascimento et al., 2014).

Atualmente o transplante de rim é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal terminal, diminuindo a mortalidade e a melhoria da qualidade de vida em comparação com a diálise (Santos et al., 2014). No entanto, a sobrevivência do aloenxerto final depende de muitas variáveis e geralmente não dura, em média, mais do que 15 anos (Álvarez et al., 2011).

Uma das fontes principais de disfunção do enxerto está relacionada com a rejeição crônica devido a respostas imunológicas (Álvarez et al., 2011). Neste contexto, a imunossupressão farmacológica faz-se necessária, não apenas somente após o transplante renal, mas após todos os tipos de transplantes de órgãos, com o objetivo de evitar a rejeição (Banner et al., 2010).

## 1.3 Terapia Imunossupressora

O objetivo da terapia imunossupressora é prevenir a rejeição do enxerto. Para este propósito são administrados fármacos que agem por mecanismos diferentes sobre a resposta aloimune para atingir o mais alto grau de imunossupressão, de modo a minimizar a toxicidade e outros efeitos adversos, em especial o desenvolvimento de tumores e infecções (Tavira et al., 2014).

Até a década de 80 do século passado, a azatioprina e os corticóides eram os principais fármacos imunossupressores disponíveis. A introdução dos inibidores da calcineurina (CNI), ciclosporina (CsA) e tacrolimus (Tac), marcou o início de uma era de melhores evoluções dos enxertos. Estas pequenas moléculas e produtos biológicos tornaram-se disponíveis como resultado de avanços no planejamento de fármacos e uso de tecnologia de DNA recombinante (Hartono et al., 2015).

Desde então, a incidência e a intensidade da rejeição aguda têm sido reduzidas, e o desenvolvimento de novos agentes imunossupressores, como ciclosporina, tacrolimus, micofenolato de mofetil (MMF), anticorpos monoclonais e policlonais específicos tem papel fundamental (Mazidi et al., 2013).

Dentre os imunossuppressores, a azatioprina (AZA) e o micofenolato de mofetil (MMF) são importantes no tratamento ou na prevenção de uma variedade de distúrbios renais, como a nefrite do lúpus, a terapia de manutenção para vasculite e a rejeição de aloenxerto renal (Rovin et al., 2009). O metabólito ativo da AZA é a 6-mercaptopurina (Cattaneo et al., 2004), a qual é metabolizada em nucleótidos tóxicos 6-tioguanina, a menos que inativada por tiopurina metil-transferase (TPMT). Embora a maioria dos pacientes possua TPMT de tipo selvagem, em 10% a enzima apresenta-se na forma heterozigótica e provoca uma diminuição moderada na atividade, e em 0,3% na forma homozigótica, o que resulta em atividade muito baixa (Schutz et al., 1996).

A ciclosporina, o membro original da família dos Inibidores da Calcineurina (CNI), é um importante imunossupressor empregado desde o final dos anos 1970. Atua por complexação com a ciclofilina, uma proteína intracelular. O complexo inibe a atividade da calcineurina, impedindo assim a translocação do Fator de Atividade Nuclear de Células T (NFAT) para o núcleo e a subsequente transcrição e produção de citocinas e outros mediadores imunes (Murray et al., 2013).

O tacrolimus (Tac) é outro fármaco fundamental para a prevenção da rejeição do enxerto em transplantes de rim e fígado, com eficácia comprovada em diversos estudos clínicos. No entanto, as formulações de tacrolimus atualmente disponíveis e amplamente utilizadas apresentam grande variabilidade inter e intra-individual, baixa disponibilidade, grandes flutuações entre a concentração sanguínea máxima e concentração mínima e um índice terapêutico estreito (Grinyó et al, 2014). Esse fármaco liga-se à proteína FK506 para formar um complexo que inibe a calcineurina fosfatase em linfócitos T (comumente referido como inibidor da calcineurina - CNI). Devido ao seu índice terapêutico estreito, o acompanhamento terapêutico é necessário. O tacrolimus é metabolizado principalmente pelo citocromo P450-3A no fígado e por um substrato de P-glicoproteína, através de uma bomba de efluxo, no fígado e intestino (Kahn et al, 2014).

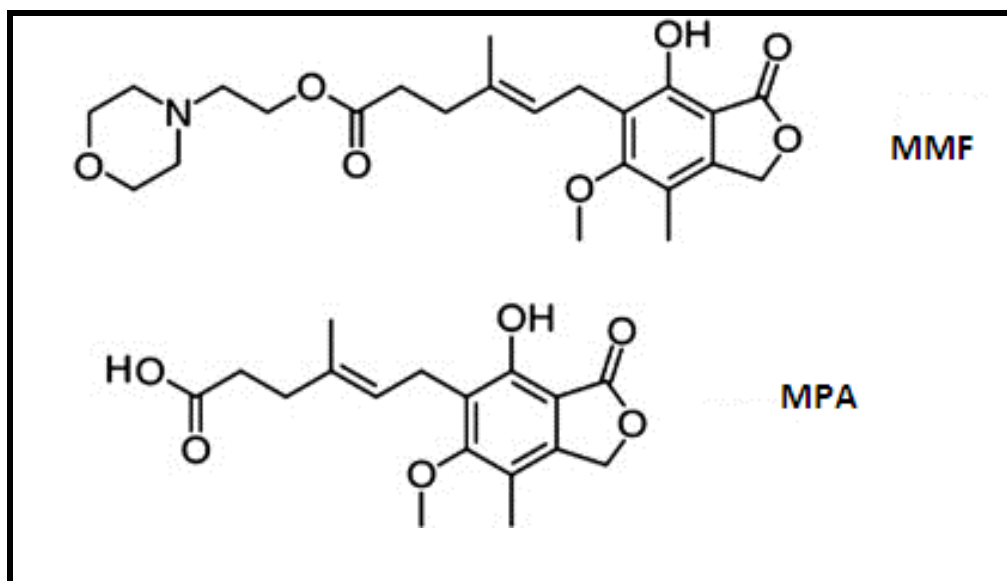
A terapia imunossupressora de manutenção no transplante renal é normalmente iniciada no momento do transplante e pode ou não ser utilizada com a terapia de indução. Regimes de dois ou três imunossuppressores são muitas vezes usados para alcançar a imunossupressão adequada e ao mesmo tempo reduzir a toxicidade associada com as doses mais elevadas de um único agente empregado como monoterapia. Num esforço para melhorar a eficácia e reduzir os efeitos adversos, os diferentes fármacos imunossuppressores são usados em várias combinações. O regime pós-transplante mais comum atualmente prescrito para transplantes

renais é tacrolimus associado a micofenolato com ou sem utilização de prednisona (Coscia et al., 2014).

O uso de derivados de micofenolato mofetil (MMF), ou micofenolato com revestimento entérico de sódio, em combinação com um inibidor da calcineurina, tem demonstrado benefício clínico sobre AZA, diminuindo o risco de rejeição ao enxerto e, possivelmente, prolongando a sobrevida do paciente em vários tipos de transplante (Murray et. al., 2013).

#### 1.4 Micofenolato Mofetil (MMF) e Ácido Micofenólico (MPA)

O micofenolato mofetil (MMF) é um pró-fármaco com atividade somente após sua hidrólise a ácido micofenólico (MPA) (Gironella et al., 2011) (Figura 1). O MMF é um inibidor potente, seletivo, não competitivo e reversível da inosina-monofosfato desidrogenase (IMPDH), enzima-chave da via “de novo” da biossíntese de purinas, inibindo a síntese do nucleotídeo guanosina (Nguyen et al., 2013).



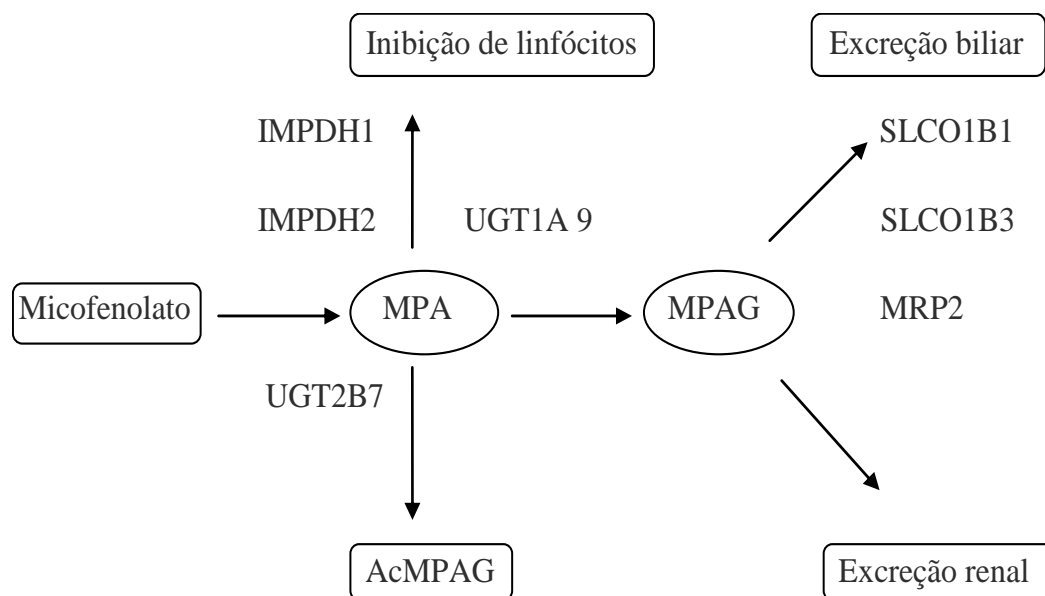
**Figura 1:** Estrutura química do micofenolato mofetil (MMF) e do ácido micofenólico (MPA)

**Fonte:** Adaptado de: Madrakian, Soleimani e Afkhami (2014).

O MMF tem sido usado desde 1970 para tratamento de psoríase, e foi aprovado nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration para uso na prevenção da rejeição de transplante renal (Huh et al., 2014). Atualmente, o MMF é amplamente empregado na profilaxia e tratamento da rejeição em pacientes submetidos a alotransplante renal, hepático ou cardíaco, com elevado potencial de rejeição. Uma dose de 1 a 1,5 g (dose fixa)

administrada por via oral ou intravenosa, duas vezes por dia, é recomendada para pacientes transplantados renais, cardíacos e hepáticos (Nguven et al., 2013).

Após administração e absorção oral, o MMF é rápida e completamente hidrolisado a MPA, seguido de extensiva glucoronidação pela enzima uridina difosfato glucoroniltransferase (UGTs), que gera o 7-O glucoronídeo do MPA (MPAG), seu metabólito farmacologicamente inativo (Ling et al., 2015) (Figura 2). A biodisponibilidade do MPA via oral é 94% e a concentração máxima no plasma ocorre aproximadamente 2 horas após a administração (Olejars et al., 2014). O MPAG é excretado pela bile e é hidrolisado a MPA com subsequente reabsorção. Esta circulação enterohepática (EHC) conduz a um segundo pico de MPA no plasma na curva concentração plasmática/tempo 6-12 horas após a administração oral, que responde por 10% a 61% da área sob a curva concentração/tempo (AUC) para MPA (Guo et al., 2013). Pelo menos 90% do MMF é excretado na urina como MPAG (Olejars et al., 2014).



**Figura 2:** Representação das etapas da biotransformação do micofenolato mofetil

AcMPAG: Acil glucoronídeo do ácido micofenólico; MPA: Ácido micofenólico; MPAG: 7-O-glucoronídeo do ácido micofenólico

**Fonte:** Adaptado de: Murray et al. (2013).

Os transportadores são proteínas inseridas na membrana celular e sua função é mediar a translocação de elementos químicos para dentro ou para fora das células, utilizando mecanismo ativo ou passivo (Klaassen et al., 2010). Esses transportadores podem ser



classificados como de efluxo ou de influxo, podendo estar localizados na membrana basolateral ou apical de células polarizadas (Kalliokoski et. al., 2009).

No entanto, grande variabilidade inter-individual na exposição ao MPA tem sido mostrada em pacientes transplantados após uma dose fixa de MMF. Confirma-se no transplante renal que, em comparação com o regime de dose fixa, um regime de concentração controlada de MPA pode reduzir o risco de falha do tratamento e rejeição aguda em receptores 12 meses após o transplante, sem aumento de eventos adversos. Individualizar a dose de MMF ao invés de usar uma dose fixa pode ser útil para otimizar a imunossupressão e minimizar os potenciais efeitos tóxicos. Os principais efeitos adversos do MMF são efeitos gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia) e mielossupressão (leucopenia, anemia e trombocitopenia) (Sollinger et al., 2004; Staatz et al., 2007; Van Gelder et al., 2006).

Duas formas farmacêuticas do fármaco derivado de MPA estão disponíveis comercialmente, o micofenolato mofetil (MMF) e o micofenolato de sódio com revestimento entérico (EC-MPS). Quando doses terapêuticamente equivalentes de MPA, ou seja, 1.000 mg de MMF e 720 mg de EC-MPS são comparadas, os seus níveis de eficiência são os mesmos e resultam em eventos gastrointestinais similares pós-transplante em receptores de transplante renal. No entanto, um estudo *in vivo* prospectivo, multicêntrico, randomizado e duplo cego concluiu que a conversão do MMF para EC-MPS está associada à melhora de sintomas gastrointestinais em determinadas subpopulações (pacientes com indigestão, diabetes, em uso de esteroides, e onde a troca da medicação aconteceu entre 6 e 12 meses de pós-transplante) (Bunnapradist et al., 2014, Bolin et al., 2007, Chan et al., 2006).

O estudo desenvolvido por Bunnapradist e colaboradores (2014) com um total de vinte e três participantes comprovou que a troca do MMF por EC-MPS permitiu um aumento na tolerância à dose máxima de MPA e reduziu complicações gastrointestinais. A possibilidade de redução dos sintomas gastrointestinais durante a utilização de doses de manutenção mais elevadas de MPA é uma justificativa para a troca de MMF por EC-MPS (Bunnapradist et al., 2014).

### **1.5 Monitoramento terapêutico**

Os medicamentos utilizados para o transplante de órgãos sólidos (SOT) têm alta variabilidade na farmacocinética e farmacodinâmica, o que pode gerar desde efeitos tóxicos do fármaco até falta de eficácia (Murray et al., 2013). Por esta razão, o monitoramento

terapêutico é uma ferramenta válida para determinar a farmacocinética de um fármaco e individualizar a terapia, ajustando a dose ao paciente por meio da medição e interpretação das concentrações sanguíneas (Chantry et al., 2014). Apesar do monitoramento terapêutico (TDM) ser utilizado para orientar a terapia, as concentrações tóxicas ou subterapêuticas só podem ser identificadas após a administração do fármaco ao paciente (Murray et al., 2013).

Quando os níveis de MPA estão abaixo do intervalo terapêutico aumenta o risco de episódio de rejeição aguda, enquanto a exposição excessiva aumenta o risco de efeitos adversos, como anemia e diarreia. Além disso, não existe nenhuma relação linear significativa entre a exposição ao MPA e as concentrações sanguíneas, com grande variabilidade inter-individual, indicando que a realização de TDM contribui para o êxito do tratamento. O regime padrão de MMF no transplante renal é normalmente de 1 g duas vezes ao dia em dose fixa (FD). No entanto, aproximadamente 35% dos receptores de transplante renal (KTRS) recebendo este regime estão fora dos níveis terapêuticos devido à grande variação interindividual (Saint-Marcoux et al., 2011). Além disso, novos regimes terapêuticos que envolvem o MMF têm sido utilizados em ensaios clínicos, tais como inibidores de calcineurina, inibidores de mTOR e esteroides, o que aumenta a necessidade de TDM, pois novos regimes aumentam o risco de imunossupressão inadequada ou excessiva (Fu et al., 2014). Em particular, na administração concomitante de ciclosporina foram encontrados níveis significativamente baixos de MPA no sangue (Le Meur et al., 2007).

A importância da realização de monitoramento terapêutico de imunossupressores torna-se crescente (Fu et al., 2014). Individualizar a dose de MMF em vez de usar uma dose fixa pode ser útil para otimizar a imunossupressão e minimizar os potenciais efeitos tóxicos. A realização do TDM parece razoável e necessária no acompanhamento e rotina da administração de MPA, sendo cada vez mais realizada em pacientes transplantados renais (Chen et al., 2014).

## **1.6 Farmacogenética**

A farmacogenética estuda a relação entre as características genéticas do indivíduo e as diferentes respostas a uma mesma terapia farmacológica. No caso de fármacos imunossupressores, alterações genéticas de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em genes que codificam proteínas envolvidas no transporte ou no metabolismo do fármaco podem modificar a resposta do paciente à terapêutica. A farmacogenética tem sido uma ferramenta poderosa para compreender diferenças nas

respostas de pacientes ao tratamento com o mesmo fármaco. As características genéticas de cada indivíduo, em particular no que se refere ao transporte, metabolismo e alvos terapêuticos, são importantes para o sucesso da terapia (Herrero et al., 2010).

Apesar dos grandes progressos na descoberta e no desenho de fármacos, a variabilidade interindividual de resposta à dose padrão de um dado fármaco continua a ser um problema na prática clínica. O objetivo da farmacogenética é o de proporcionar, novas estratégias para otimizar a terapia farmacológica, tanto em termos de eficácia quanto de segurança. A validação clínica de um número crescente de testes de farmacogenética, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias altamente eficientes, devem promover ainda mais a utilização da farmacogenética na prática clínica e levar à otimização e individualização da terapia medicamentosa antes do início do tratamento (Chantry et al., 2014).

A variação genética em seres humanos pode resultar de mutações no DNA genômico, de fatores epigenéticos (ex. alterações na metilação do DNA ou variações nas histonas) ou de alterações citogenéticas, que podem influenciar a expressão de genes. Alterações de DNA vão desde grandes transformações de uma parte ou de um cromossomo inteiro (alterações citogenéticas), que por vezes não são compatíveis com a vida, até pequenas alterações moleculares, como as substituições de um único nucleotídeo (SNP) (Lindgren, 2014).

Embora o impacto clínico de polimorfismos genéticos de enzimas de fase I (responsáveis por reações de oxidação, redução e hidrólise) pareça estar bem definido, em muitos casos o conhecimento sobre o impacto clínico da variabilidade genética das enzimas de fase II é mais limitado. Enzimas de fase II conjugam os metabólitos resultantes das reações de fase I, outros intermediários ou o composto original, e tem como objetivo tornar estes metabólitos mais polares, possibilitando a excreção renal ou biliar. Enzimas de fase II incluem glutatona-S transferases (GSTs), tiopurina-S metiltransferases (TMPTs), UDP glucosiltransferases (UGTs), N-acetiltransferases (NATs), quinona NADH oxidases, entre outras (Yiannakopoulou, 2013).

As UDP-glucuronosiltransferases (UGTs) pertencem a um grupo de enzimas envolvidas na fase II, responsável pela detoxificação de substâncias endógenas e exógenas, incluindo uma variedade de metabólitos, toxinas, fármacos e agentes carcinogênicos. As UGTs transformam seus substratos em glucoronídeos solúveis em água que são excretados na urina ou na bile. A UGT1A9 é de especial interesse por ser a principal enzima envolvida no

metabolismo do ácido micofenólico. Esta enzima é codificada pelo gene *UGT1A9* que é predominantemente expresso no fígado, nos rins, e no trato gastrintestinal (Pazik et al., 2011).

Além do seu papel na glucoronidação do MPA, o *UGT1A9* também é responsável pela eliminação de fenóis, esteroides, ácidos graxos, ácidos biliares, componentes carcinogênicos do tabaco, constituintes da dieta, além de um número considerável de fármacos, como agentes antineoplásicos, fibratos e antiarrítmicos (Burchell, 2003).

Para explorar os fatores que contribuem para a variabilidade interindividual na resposta aos fármacos há um crescente interesse no impacto de polimorfismos de genes de enzimas e transportadores. Numerosas variantes genéticas de UGT e *SLCO* (*solute carrier organic anion transporter*) são conhecidas por estarem relacionadas com os níveis de MPA. Sua importância se deve à sua relação com o ajuste de doses deste imunossupressor em pacientes transplantados renais (Han et al., 2014).

Existem grandes diferenças individuais em parâmetros farmacocinéticos do MMF entre os pacientes transplantados. Alguns estudos têm demonstrado que polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do gene *UGT1A9* são responsáveis por essas diferenças nos primeiros dias após o transplante (Mazidi, 2013), podendo afetar a sua atividade, aumentando ou diminuindo a exposição ao MPA. A menor exposição ao MPA pode ser devida, em parte, à circulação enterohepática prejudicada do MPA, o que contribui significativamente para a exposição total ao MPA *in vivo* (Rovin et al., 2009).

Variantes genéticas de UGT e de proteínas de multirresistência 2 (MRP2) são conhecidas por alterar a atividade do MPA *in vitro*, e vários estudos clínicos mostraram modificação na farmacocinética do MPA associada a essas variantes (Frymoyer et al., 2012).

Os níveis de expressão e a atividade de *UGT1A9* podem depender da presença de alguns SNPs localizados no promotor do gene *UGT1A9* (-2152C>T e -275T>A), bem como de alteração na sequência codificante (c.98T>C). As variantes -2152C>T e -275T>A foram identificadas como associadas com a alta atividade de glucoronidação em espécimes de microsomas de fígado. Além disso, SNP c.98T>C foi relatado que afeta a exposição ao MPA após uma única dose oral em voluntários saudáveis. Assim, os alelos *UGT1A9* -275A e -2152T foram associados com uma reduzida exposição ao MPA com consequente risco 13 vezes superior de ocorrer rejeição aguda, enquanto o alelo c.98C foi consistentemente

associado com maiores valores de exposição ao MPA em pacientes transplantados renais tratados com micofenolato de mofetil e tacrolimus (Pazik et al., 2011).

Vários estudos têm sido realizados avaliando o efeito de variantes alélicas do *UGT1A9* no metabolismo de fármacos (Mazidi et al., 2012; Kuypers et al., 2005). Supõe-se que o polimorfismo do gene *UGT1A9* possa ter um impacto importante na função e sobrevivência dos transplantados renais. A genotipagem para estes polimorfismos pode ser útil no ajuste de dosagem de MMF para otimizar sua dose e sua eficácia (Mazidi et al., 2012). No presente estudo, foi avaliado, o efeito das variantes alélicas de *UGT1A9* c.98T>C (rs72551330; g. 87289T>C) no metabolismo de MMF em pacientes voluntários transplantados renais.

## **2. HIPÓTESE OPERACIONAL**

Há uma relação entre as variantes do polimorfismo c.98T>C do gene *UGT1A9* e níveis plasmáticos de MPA e MPAG nos pacientes transplantados renais analisados, refletindo influência genética deste polimorfismo no metabolismo do MMF.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar se existe relação entre as variantes alélicas ou genótipos do polimorfismo c.98T>C do gene *UGT1A9* e os níveis plasmáticos de MPA e MPAG em pacientes transplantados renais do Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar métodos moleculares para identificação dos genótipos do polimorfismo c.98T>C do gene *UGT1A9*.
- Identificar os genótipos do polimorfismo c.98T>C de *UGT1A9* dos pacientes transplantados renais do Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS analisados.
- Relacionar os genótipos do polimorfismo analisado com os níveis plasmáticos de MPA e MPAG nos pacientes transplantados renais estudados.

# Capítulo 2

## Artigo Científico

#### 4. SCIENTIFIC ARTICLE

STUDY ON THE ASSOCIATION OF *UGT1A9* GENE c.98T>C POLYMORPHISM AND MYCOPHENOLIC ACID PLASMA LEVELS IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS

Manuscript submitted for publication in the Toxicology Mechanisms and Methods.

**Study on the association of *UGT1A9* gene c.98T>C polymorphism and mycophenolic acid plasma levels in renal transplant patients.**

Lizania Rodrigues Ruschel<sup>1</sup>, Virginia Minghelli Schmitt<sup>1,2</sup>, Aline Bueno da Silva<sup>2</sup>, Carmen Silvana Araújo de Oliveira<sup>3</sup>, Karoline Flach<sup>2</sup>, Domingos O d'Ávila<sup>3</sup>, Flávia Valladão Thiesen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Flávia Valladão Thiesen

Av. Ipiranga, 6690 – Partenon

Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

E-mail: fvthiesen@pucrs.br

Phone: +55 51 3320 3656

Fax: +55 51 3320 3612



**Keywords:** Mycophenolate mofetil, therapeutic drug monitoring, pharmacogenetic, transplantation.

## **ABSTRACT**

Mycophenolate mofetil (MMF) is a prodrug active only after its hydrolysis to mycophenolic acid (MPA). The UGT1A9 is of special interest since it is the main enzyme involved in the glucuronidation of MPA. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of UGT1A9 gene may be responsible for individual differences in the pharmacokinetics of MMF. Expression levels and the activity of UGT1A9 may depend on the presence of some SNPs located in gene promoter region (-2152C>T and -275T>A), as well as changes in the coding region (c.98T> C). The objective of this work was evaluate the effect of allelic variants of UGT1A9 c.98T>C polymorphism (rs72551330; g. 87289T>C) on MMF metabolism in renal transplant volunteers. MPA and MPAG levels were determined on plasma samples of kidney transplant patients (n=39) by high performance liquid chromatography using ultraviolet detection (HPLC/UV). DNA was isolated from leucocytes and stored at -20°C. The presence of analyzed SNP was investigated by means of polymerase chain reaction (PCR) followed by amplicon sequencing. The analysis of *UGT1A9* c.98T>C polymorphism revealed that all study patients bared TT genotype. Different MPA and MPAG plasma concentrations were detected, including therapeutic, subtherapeutic and toxic levels. The standardized molecular method permitted identification of *UGT1A9* c.98T>C polymorphism genotypes of study renal transplant patients. All individuals of the study group presented the same genotype (c.98TT) for this polymorphism. Thereby, no association between c.98T>C polymorphism and MPA and MPAG plasma levels could be investigated, even though different levels of these compounds were detected.

## INTRODUCTION

The organ failure has important social and economic consequences, which can be reduced by transplant, substantially improving individuals' quality of life as well as increasing their life expectancy. In United States, more than 100,000 patients are waiting for solid organ transplant. Significant advances in histocompatibility and immunosuppression have dramatically improved short-term graft outcomes and survival rates (Thomas et al., 2015).

Transplant success depends on a well established management especially in the case of patients with kidney disease, in order to avoid rejection (acute/chronic) or toxicity related to immunosuppressive therapy (Tolou-Ghamati et al., 2015).

Immunosuppression chronic maintenance after transplant requires special attention. Low levels of immunosuppression after transplant increase the risk of rejection, while its elevation expands the risk of drug adverse effects (Murray, 2013). Drugs used for solid organ transplant (SOT) have high pharmacokinetics and pharmacodynamics variability and may result in drug toxicity or lack of efficacy. Despite the fact that therapeutic drug monitoring (TDM) is used to guide therapy, subtherapeutic or toxic concentrations it can be only identified after drug administration (De Jonges et al., 2008).

A widely used immunosuppressant in transplant patients is mycophenolate mofetil (MMF). MMF has been employed for prevention of acute kidney transplant rejection and became first-line drug in SOT. The vast majority of patients undergoing kidney transplant in the United States and Europe is treated with MMF at discharge, with widely use as maintenance treatment in post transplant period (Matas et al., 2014).

Mycophenolic acid (MPA), the main active metabolite of MMF, is a non-competitive and reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a rate limiting

enzyme in the pathway of the new synthesis of purine nucleotides (Tang et al., 2015). In subsequent phases of biotransformation, mycophenolic acid is glucuronidated mainly by uridine diphosphate glucuronyltransferase enzymes (UGTs). Per share of UGT1A9 isoform, mycophenolic acid is converted to 7-O glucuronide of MPA (MPAG), the predominant and inactive metabolite of this drug (Pazik et al., 2014). By the action of another enzyme group, UGT2B7, it originates the acylglucuronide (AcMPAG), pharmacologically active, which inhibits lymphocyte proliferation (Guo et al., 2013). MPAG is excreted in the bile and is hydrolyzed to MPA by the action of intestinal microbiota, with subsequent reabsorption. This enterohepatic circulation contributes from 35 to 40% of the area under the curve MPA concentration / time from 0 to 12 hours (Van Schaik, 2009).

Studies have assessed the effect of allelic variants of the UGT1A9 gene in drug metabolism, showing, for example that polymorphisms in the gene promoter can affect its expression level, increasing or decreasing MPA exposure (Pazik et al, 2014; Korprasertthaworn et al., 2012; Rovin et al., 2009).

During an *in vitro* study, Korprasertthaworn et al. evaluated the effect of *UGT1A9* c.98T>C allele on mycophenolic acid glucuronidation. This study has shown that the most frequent variant UGT1A9 c.98T is characterized by a hyperbolic enzyme kinetics, while the enzyme encoded by the allelic variant UGT1A9 c.98C displays an atypical kinetic activity with partial inhibition by the substrate (Korprasertthaworn et al. 2012). In a study performed with healthy volunteers, significantly higher levels of mycophenolic acid were observed after a single administration of MMF in carriers of allele UGT1A9 c.98C, compared to those with wild-type allele; while MPAG levels were similar (Levesque et al., 2007).

Clinical studies have identified many genetic variants which could influence response to drug and treatment outcomes (Crews et al, 2012; Salari et al, 2012.). Certain clinical factors

(such as renal function and serum albumin concentration) and genetic polymorphisms of some enzymes involved in the metabolism of MPA, contribute to individual variability in its pharmacokinetic (Guo et al., 2013). Advances in human genome sequencing brought as a scientific benefit the development of predictive genetic tests useful for decision-making in health care. Such tests may indicate risk or susceptibility to future disease in asymptomatic individuals or predict a person's response to medications (ie, pharmacogenomics) or to environmental factors (for example, nutrigenomics predicts responses to dietary factors (Jonas, Wines, 2013).

An example of drug class which will gain benefit from pharmacogenomics studies is the immunosuppressants, including mycophenolate mofetil, with major implications on human health, especially on kidney recipients (van Schaik et al., 2009). There is a known relationship between the effectiveness of products based in mycophenolic acid and acute drug exposure in the prevention of allograft rejection (Van Gelder et al, 2008; Le Meur et al., 2007). The aim of the present study was to investigate whether there is an association of allelic variants or genotypes of *UGT1A9* c.98T>C polymorphism (rs72551330; g.87289T>C) with plasma levels of MPA and MPAG in a group of kidney transplant recipients.

## **METHODS**

### **Sample**

The study population consisted of kidney transplant individuals, 18 years or more, attended at São Lucas Nephrology Service Hospital. All them were in use of MMF for at least four months and participated in the survey "Monitoring Mycophenolic Acid Therapy in Kidney Transplant Patients". All participants signed the Informed Consent Form. Patient information were obtained from hospital records. This study was approved by the PUCRS Research Ethics Committee (protocol number 06/02965).

Blood samples were collected by venipuncture, before mycophenolate first morning dose (C0) in vacuum tube containing EDTA. Samples were transported to the laboratory, centrifuged at 2 000 rpm and plasma was separated and stored at -20°C.

### **MPA and MPAG Dosage**

Dosages of MPA and MPAG were performed on plasma samples by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC/UV-Agilent 1100), with a C18 column. The method was previously validated in our laboratory, presenting a detection limit of 0.001µg/ml for MPA and  $0.53 \pm 0.09\mu\text{g/ml}$  for MPAG, quantification limit of  $0.0937 \pm 0.0077\mu\text{g/ml}$  for MPA and  $1.8 \pm 0.1 \text{ mg/ml}$  for MPAG, linearity of 0.99989 to MPA and 0.99914 to MPAG, intraassay precision from 0.89 to 1.14% for MPA and from 1.20 to 2.57% for MPAG and an accuracy of 91.5 to 102.3% for MPA and 99.89 to 105.85% to MPAG.

### **DNA extraction**

DNA from leukocytes was extracted following standard protocol (Lahiri and Nurnberger, 1991) with minor adaptations, and stored at -20°C.

### **Analysis of DNA viability of stored samples**

The viability of stored DNA samples was conducted using primers GH20 (5'-CCA GAA GAG GGT AGG ACA AC-3 ') and PC04 (5' CCA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'), specific for the human beta globin gene (Manos & Bauer, 1993). Reaction mix consisted of 50mM KCl, 10mM Tris HCl pH 8.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP mixture, 10 pmol of each primer, 1U Taq DNA polymerase in a total volume of 25µl. Electrophoresis in a 1.5% agarose gel was performed and DNA integrity analyzed.

### **Analysis of the *UGT1A9* c.98T>C polymorphism**

The analysis of *UGT1A9* c.98T>C polymorphism was conducted by means of polymerase chain reaction (PCR), followed by sequencing.

For the polymorphism analysis primer forward Mico 98D (5 'GTT CTC TGA TGG CTT GCA CA 3') and primer reverse Mico-98R (5 'ATG CCT CCC GAG GAG AAT TT 3 ') were used. PCR reaction conditions were: 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM of dNTPs mix, 10 pmol of each primer, 1U Taq DNA polymerase in a total volume of 25µl. The amplification program used was an initial denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 35 seconds, 72°C for 30 seconds, with a final extension at 72°C for 6 minutes. Na amplicon of 167bp indicated successful amplification of the target region (Jiao et al., 2008).

### **Amplicon, Purification and Sequencing**

Purification was performed using the enzyme purification method with exonuclease I and Fastap (FastAPT<sup>TM</sup> thermosensitive Alkaline Phosphatase) (Thermo Scientific).

Sequencing of PCR products was performed on the ABI 3500 sequencer with same primers used for amplification. Alleles sequence definition was performed with BLAST, using as reference sequence the NG 002601.2 (GenBank).

## **RESULTS**

The initial number of patients enrolled in the study was fifty. The DNA viability test confirmed that forty-five samples were capable of sequencing and out of these, thirty-nine presented electropherogram with adequate quality for analysis.

All patients received at least one immunosuppressive drug beyond MMF according to standard care of the Nephrology Service from PUCRS São Lucas Hospital. No patient experienced graft rejection, two patients had leucopenia and data on diarrhea was not found in

patients records. Some demographic and clinical data of study group are shown in Table 1. The group presented an equitable number of men and women (19 and 20 respectively), with an average of  $40.59 \pm 12.5$  years, with characterized the study population as young adults.

TABLE 1

According to Shaw et al., therapeutic levels of MPA are  $\geq 1.0 \mu\text{g/mL}$  to  $3.0 \mu\text{g/ml}$ . In the sample study 46.1% of the patients had plasma levels in this range and 38.5% of MPA levels were above the therapeutic range (Shaw et al., 2007).

Analysis of *UGT1A9* c.98T>C polymorphism showed all patients had TT genotype.

## DISCUSSION

Brazil current population exceeds 195 million people, largely miscigenated, with ancestors from Europe, Africa and Americas (Suarez-Kurtz et al., 2014). According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), 48.4% of the population reported themselves as white and 6.8% as black (Pena et al, 2011; Suarez-Kurtz, 2010). In our study group, there was also a predominance of white individuals (59%).

In 38.5% of evaluated patients MPA levels were above the therapeutic range, corresponding to an adequate immunosuppression, but also to an increased risk of toxic effects of MPA. It is known that the most common side effects of MMF use are diarrhea and leukocytosis, which can reduce treatment adherence and mainly, compromise patients' life quality (Shaw et al., 2007). Moreover, 15.4% of patients had levels below the therapeutic, which poses a risk of graft rejection. Two patients had leukopenia, but in none of the reports registers of diarrhea were found.

In studies conducted by Fu et al. and Zicheng et al., using a starting dose of MMF of 2 g/day, about 30-40% of Chinese patients had high levels of MPA (Fu et al., 2014; Zicheng et

al., 2006). On the contrary, with the same initial dose of MMF, only a minority of Caucasian patients had MPA levels above minimum therapeutic level (Mourad et al., 2001; deWinter et al., 2011; Van Gelder et al., 2008; Gaston et al., 2009). In studies with Asian patients, it was found that, after an initial dose of MMF of 750 mg twice a day, in place of 1g dose, efficacy presented was comparable, with a lower incidence of adverse events (leukopenia, gastrointestinal effects, or cytomegalovirus infection) (Jiao et al., 2007; Jirasiritham et al., 2004).

Patients from the Mazidi et al. study showed elevated plasma levels of MPA ( $104.8 \pm 32,3\text{mg/m/L}$ ) (Mazidi et al., 2013). This may be due in part to other genetic factors, such as simultaneous UGT1A8 and UGT2B7 polymorphisms or SNPs in MRP-2 gene, or non-genetic factors, such as ethnicity, dietary habits and drug interactions. The authors conclude that *UGT1A9* gene polymorphisms may be partially responsible for the interindividual differences among stable renal transplant recipients, although most patients had acceptable levels of MPA plasma (Neylan, 1997; Chen et al, 2007; Hesselink, 2005).

UGT1A9 is one of the main enzymes involved in the metabolism of MPA and its greater activity can reduce MPA plasma concentration and, therefore, the mediated immunosuppression (Picard, 2005). The *UGT1A9* c.98T>C is a functional polymorphism that results in reduced enzyme activity and a lower glucuronidation rate of the c.98C variant compared to the wild form. Thus, the detrimental effect of the allele *UGT1A9* c.98C in graft function and survival rate of patients may be a result of reduced potential of detoxification of UGT1A9 enzyme, leading to increased exposure to toxic substances, or, in the case of our study, to MPA (Pazik et al., 2011). This increased exposure to MPA, if known, can be desirable, considering it is not at toxic levels, because the most important purpose of treatment is to keep levels within therapeutic range, once it is the active metabolite of MMF.



In a study conducted by Van Schaik et al., which examined the relationship between *UGT1A9* c.98T>C polymorphism and exposure to MPA in 340 kidney transplant recipients, a 50% increase in exposure to MPA was demonstrated for the polymorphic *UGT1A9* c.98C variant in the post transplant period, in patients treated with MMF (van Schaik et al., 2009).

According to Levesque et al., after a single dose of MMF administered to healthy volunteers, an increase on both exposure to mycophenolic acid and excretion of its metabolite was observed in the urine of patients with the variant c.98T>C, besides the increase of exposure to the drug (Levesque et al., 2007).

According to Pazik et al., comparing homozygous c.98TT patients with c.98C allele carriers, homozygous had worse renal graft function, already in the first month after transplant, and it was manifested by a significantly lower glomerular rate ( $P = 0.02$ ) which persisted in a lower level ( $P = 0.03$ ) eight years after the procedure (Pazik et al., 2014).

Studies from van Schaik et al., and Bosó et al., both held in Caucasian populations, with 338 and 570 renal transplant patients, respectively, showed a frequency of *UGT1A9* allele c.98C between 1% and 4% (Schaik et al., 2009; Bosó et al., 2014). Study from Zaberska et al., conducted with 308 Polish patients, showed that 1.6% of the population had allele c.98C (Zaberska et al., 2013). In the study of Pazik et al., conducted with 103 kidney recipients of Polish origin a frequency of 1.7% of the allelic variant c.98C was found (Pazik et al., 2011). In our study, analysis of *UGT1A9* c.98T>C polymorphism showed all patients had TT genotype. Considering the low prevalence of allele c.98C found in the studies mentioned above, the chance of finding any patient with this allele in our study, conducted with 39 patients, would be very low, which was confirmed by our results. As only patients homozygous for the c.98T allele were found, it was not possible to investigate whether there

is an association between the *UGT1A9* c.98T>C polymorphism and plasma levels of MPA and MPAG.

The difference in levels of MPA in patients undergoing treatment with MMF may not necessarily be associated directly with the polymorphism here studied, as there are other factors which can influence these levels, such as comorbidities and other drugs administered to patients (Mazidi et al., 2013). In our study different plasma levels of MPA were observed, despite being all patients homozygous for the wild allele (TT). However, there are other polymorphisms of the *UGT1A9* gene that can influence MPA levels, as well as gene polymorphisms encoding other phase I or II enzymes or even carriers, such as *UGT1A8*, *UGT2B7* and *MRP2* (van Schaik et al., 2009).

Among polymorphisms in the *UGT1A9* gene that can also influence the response to MMF are I399C>T, M33T, -2152C>T, -665, -331/-440, and -275T>A (Hesselink et al., 2005; Girard et al., 2004; Inoue et al, 2007). *In vitro* experiments, showed that polymorphisms -275T>A and -2152T>C are related to an increased hepatic expression of *UGT1A9* and increased glucuronidation activity of MPA compared to individuals with wild type (Girard et al., 2004).

In a study performed by Mazidi et al., significantly lower levels of MPA were obtained from patients with the *UGT1A9* -275T>A SNP when compared to non-carriers, and often 15% (n = 40), as well as in the study of Kuypers et al., with a similar frequency of 16.8%. While the frequency of -2152C>T was of 12.6% in Kuypers study, this SNP was not detected in Mazidi population study (Mazidi et al., 2013; Kuypers et al., 2005). The lack of detection of some of these mutations were assessed in Japanese and Chinese populations in which none of these SNPs were found (Jiao et al., 2008; Saeki et al., 2006; Kagaya et al., 2007).

Considering the possibility that above cited polymorphisms may influence the pharmacokinetics of MMF, the next phase of this study will be to evaluate other polymorphisms in order to investigate their likely association with the different MPA and MPAG levels found in our study patients. Also, expand the size of the study population could be an attractive alternative.

## **CONCLUSIONS**

Renal transplant patients genotype for *UGT1A9* c.98T>C polymorphism was determined, and all individuals in the investigated group showed the same genotype (c.98TT) compromising the analysis of an association of the investigated polymorphism with MPA or MPAG plasma levels. Besides bearing the same genotype, study patients presented a considerable variation on MPA and MPAG plasma levels which might indicate that other variables, like other gene polymorphisms or even environmental factors, could interfere on their levels.

## **Acknowledgments**

This work was supported by FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## **REFERENCES**

Bauer HM, & Manos MM. (1993). PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: Persing, D. (ed) Diagnostic Molecular Microbiology, American Society for Microbiology, 407-13.

Bosó V, Herrero MJ, Buso E, Galán J, Almenar L, Sánchez-Lázaro I, Sánchez-Plumed J, Bea S, Prieto M, García M, Pastor A, Sole A, Poveda JL, Aliño SF. (2014). Genotype and allele frequencies of drug-metabolizing enzymes and drug transporter genes affecting immunosuppressants in the Spanish white population. *Ther Drug Monit*, 36, 159-68.

Chen H, Peng C, Yu Z, Shen B, Deng X, Qiu W, Fei Y, Shen C, Zhou G, Yang W, Li H. (2007). Pharmacokinetics of mycophenolic acid and determination of area under the curve by abbreviated sampling strategy in Chinese liver transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*, 46, 175-85.

Crews KR, Hicks JK, Pui CH, Relling MV, Evans WE. (2012). Pharmacogenomics and individualized medicine: Translating science into practice. *Clin Pharmacol Ther*, 92, 467-75.

De Jonge H, Kuypers DR. (2008). Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplant Rev*, 22, 6-20.

de Winter BC, Mathot RA, Sombogaard F, Vulto AG, van Gelder T. (2011). Nonlinear relationship between mycophenolate mofetil dose and mycophenolic acid exposure: implications for therapeutic drug monitoring. *Clin J Am Soc Nephro*, 6, 656-63.

Fu L, Huang Z, Song T, He S, Zeng D, Rao Z, Xie L, Song Y, Wang L, Lin T. (2014). Short-term therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid reduces infection: a prospective, single-center cohort study in Chinese living-related kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*, 16, 760-6.

Gaston RS, Kaplan B, Shah T, Cibrik D, Shaw LM, Angelis M, Mulgaonkar S, Meier-Kriesche HU, Patel D, Bloom RD. (2009). Fixed- or controlled-dose mycophenolate mofetil with standard- or reduced-dose calcineurin inhibitors: the Opticcept trial. *Am J Transplant*, 9, 1607-19.

Girard H, Court MH, Bernard O, Fortier LC, Villeneuve L, Hao Q, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perused L, Guillemette C. (2004). Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics*, 14, 501-15.

Guo D, Pang LF, Han Y, Yang H, Wang G, Tan ZR, Zhang W, Zhou HH. (2013).

Polymorphisms of UGT1A9 and UGT2B7 influence the pharmacokinetics of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy Chinese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 69, 843-49.

Hesselink DA, van Gelder T. (2005). Genetic and nongenetic determinants of between-patients variability in the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Clin Pharmacol Ther*, 78, 317-21.

Inoue K, Miura M, Satoh S, Kagaya H, Saito M, Habuchi T. (2007). Influence of UGT1A7 and UGT1A9 intronic I399 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit*, 29, 299-304.

Jiao Z, Ding JJ, Shen J, Liang HQ, Zhong LJ, Wang Y, Zhong MK, Lu WY. (2008).

Population pharmacokinetic modeling for enterohepatic circulation of mycophenolic acid in healthy Chinese and the influence of polymorphism in UGT1A9. *Br J Clin Pharmacol*, 65, 893-907.

Jiao Z, Zhong JY, Zhang M, Shi XJ, Yu YQ, Lu WY. (2007). Total and free mycophenolic acid and its 7-O-glucuronide metabolite in Chinese adult renal transplant patients: pharmacokinetics and application of limited sampling strategies. *Eur J Clin Pharmacol*, 63, 27-37.

Jirasiritham S, Sumethkul V, Mavichak V, Na-Bangchang K. (2004). The pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in Thai kidney transplant recipients. *Transplant Proc*, 36, 2076-78.

Jonas DE, Wines R. (2013). Pharmacogenomic testing and the prospect of individualized treatment. *N C Med J*, 74, 485-93.

Kagaya H, Inoue K, Miura M, Satoh S, Saito M, Tada H, Habushi T, Suzuki T. (2007). Influence of UGT1A8 and UGT2B7 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*, 63, 279-88.

Korprasertthaworn P, Rowland A, Lewis BC, Mackenzie PI, Yoovathaworn K, Miners JO. (2012). Effects of amino acid substitutions at positions 33 and 37 on UDP-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) activity and substrate selectivity. *Biochem Pharmacol*, 84, 1511-21.

Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. (2005). The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphism T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther*, 78, 351-61.

Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19, 5444.

Le Meur Y, Büchler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, Etienne I, Westeel PF, Hurault de Ligny B, Rostaing L, Thervet E, Szlag JC, Rérolle JP, Rousseau A, Touchard G, Marguet P. (2007). Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant*, 7, 2496-503.

Lévesque E, Delage R, Benoit-Biancamano MO, Caron P, Bernard O, Couture F, Guillemette C. (2007). The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphisms on the

pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 81, 392-400.

Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL. (2014). OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant*, 14,11-44.

Mazidi T, Rouini MR, Ghahremani MH, Dashti-Khavidaki S, Lessan-Pezeshki M, Ahmadi FL, Salam-Zadeh J, Mandegary A, Gholami K. (2013). Impact of UGT1A9 polymorphism on mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in stable renal transplant patients. *Iran J Pharm Res*, 12, 547-56.

Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, De Meyer M, Konig J, Schepers R, Squifflet JP, Wallemacq P. (2001). Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem*, 47, 88-94.

Murray B, Hawes E, Lee RA, Watson R, Roederer MW. (2013). Genes and beans: pharmacogenomics of renal transplant. *Pharmacogenomics*, 14,783-98.

Neylan JF. (1997). Immunosuppressive therapy in high-risk transplant patients: Dose dependent efficacy of mycophenolate mofetil in African-American renal allograft recipients. *Transplantation*, 64, 1277-82.

Pazik J, Oldak M, Lewandowski Z, Dabrowski M, Podgórska M, Sitarek E, Malejczyk J, Płoski R, Durlik M. (2014). Recipient uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase UGT1A9 c.98T>C variant determines transplanted kidney filtration rate. *Transplant Proc*, 46, 2678-82.

Pazik J, Ołdak M, Dabrowski M, Lewandowski Z, Sitarek E, Podgórska M, Ważna E, Płoski R, Szmidt J, Chmura A, Durlik M, Malejczyk J. (2011). Association of udp-

glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene polymorphism with kidney allograft function. *Ann Transplant*, 16, 69-73.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. (2011). The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*, 6, 1-9.

Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, Le Meur Y, Marquet P. (2005). Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos*, 33, 139-46.

Rovin BH, McKinley AM, Birmingham DJ. (2009). Can We Personalize Treatment for Kidney Diseases? *Clin J Am Soc Nephrol*, 4, 1670-76.

Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Ozawa S, Kurose K, Kaniwa N, Komamura K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N, Kunitoh H, Hamaguchi T, Yoshida T, Kubota K, Ohtsu A, Muto M, Minami H, Saijo N, Kamatani N, Sawada JI. (2006). Haplotype structures of the UGT1A gene complex in a Japanese population. *Pharmacogenomics*, 6, 63-75.

Salari K, Watkins H, Ashley EA. (2012). Personalized medicine: Hope or hype? *Eur Heart J*, 33, 1564-70.

Shaw LM, Figurski M, Milone MC, Trofe J, Bloom RD. (2007). Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2, 1062-72.



Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Santoro AB, Hutz MH, de Moraes ME, Pena SD, Ribeiro-dos-Santos A, Romano-Silva MA, Struchiner CJ. (2014). Global Pharmacogenomics: Distribution of CYP3A5 Polymorphisms and Phenotypes in the Brazilian Population . PLoS One, 9, 1-6.

Suarez-Kurtz G. (2010). Pharmacogenetics in the Brazilian population. Front Pharmacol, 1, 1-10.

Tang Q, Yang Y, Zhao M, Liang G, Wu H, Liu Q, Xie Y, Li D, Dai Y, Yung S, Chan TM, Lu Q. (2015). Mycophenolic acid upregulates miR-142-3P/5P and miR-146a in lupus CD4<sup>+</sup> T cells. Lupus, 0,1-8.

Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. (2015). The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection. Trends in Molecular Medicine, 21, 319-29.

Tolou-Ghamari Z, Mortazavi M, Palizban AA, Najafi MR. (2015). The investigation of correlation between Iminoral concentration and neurotoxic levels after kidney transplantation. Adv Biomed Res, 4, 59.

van Gelder T, Silva HT, de Fijter JW, Budde K, Kuypers D, Tyden G, Lohmus A, Sommerer C, Hartmann A, Le Meur Y, Oellerich M, Holt DW, Tonshoff B, Keown P, Campbell S, Mamelok RD. (2008). Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled Trial. Transplantation, 86, 1043-51.

van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Schmidt J, Budde K, Kuypers D, Le Meur Y, van der Werf M, Mamelok R, van Gelder T. (2009). UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus treated kidney transplant patients. Clin Pharmacol Ther, 86, 319-27.

Zakerska O, Skrzypczak-Zielinska M, Mikstacki A, Tamowicz B, Malengowska B, Szalata M, Slomski R. (2013). Genotype and allele frequencies of polymorphic UGT1A9 in the Polish population. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 38, 217-21.

Zicheng Y, Peijun Z, Da X, Xianghui W, Hongzhuan C. (2006). Investigation on pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese adult renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*, 62, 446-52.

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study participants**

<b>Parameters</b>	<i>Value</i>
Patients (n)	39
Sex (female/male)	20/19
Age (yers – average $\pm$ SD)	40.6 $\pm$ 12.5
Color (n/%)	
White	23/59.0
Black	7/17.9
Uninformed	9/23.1
<b>Transplant characteristic</b>	
Post Transplantation Time (months – mean $\pm$ SD)	44.4 $\pm$ 55.7
<b>Biochemical parameters</b>	
MPA plasma level (ug/ml – mean $\pm$ SD)	3.5 $\pm$ 3.1
Range of MPA plasma level (n/%)	
Therapeutic	18/46.1
Toxic	15/38.5
Subtherapeutic	6/15.4
MPAG plasma level (ug/ml – average $\pm$ SD)	81.5 $\pm$ 41.1
Creatinine blood concentration (mg/dL – average $\pm$ SD)	2.0 $\pm$ 1.0
Range of creatinine blood concentration (n/%)	
Normal	4/12.9
Increased	27/87.1

# Capítulo 3

## Considerações Finais

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados nesse trabalho não permitiram avaliar a relação farmacogenética existente entre o polimorfismo c.98T>C do gene *UGT1A9* e níveis plasmáticos de MPA e MPAG, pois os pacientes transplantados apresentaram somente o genótipo TT, não havendo a possibilidade de avaliar de que forma este polimorfismo interfere nos níveis de MPA. No entanto, frente à baixa percentagem de achados do genótipo c.98CC em outros estudos e ao número reduzido de voluntários transplantados renais participantes deste estudo, estes resultados não surpreendem. Esta linha de pesquisa deve ser continuada aumentando o tamanho da amostra e ampliando a investigação para a análise dos demais polimorfismos do mesmo gene *UGT1A9*, bem como para outras enzimas e transportadores que também sofrem influência genética e estão relacionados à farmacocinética do MMF.

## REFERÊNCIAS

- ÁLVARES, S. et al. Unresponsiveness to a kidney graft after a fully matched allogenic bone marrow transplantation combined with low-dose tacrolimus therapy: a case report. *Transplant Proc*, v. 43, n. 6, p. 2344-6, 2011.
- BANNER, N. R.; LYSTER, H. Pharmacological immunosuppression. *Cambridge books online*, 2010.
- BOLIN, P. et al. Improvement in 3-month patient-reported gastrointestinal symptoms after conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in renal transplant patients. *Transplantation*, v.84, n. 11, p.1443-1451, 2007.
- BUNNAPRADIST, S. et al. Changes in the Small Bowel of Symptomatic Kidney Transplant Recipients Converted from Mycophenolate Mofetil to Enteric-Coated Mycophenolate Sodium. *Am J Nephrol.*, v.40, n.2, p.184-90, 2014.
- BURCHELL, B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics*, v. 3, n.1, p. 37–52, 2003.
- CATTANEO, D. et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of immunosuppressive agents: Perspectives for individualized therapy. *Personalized Medicine*, v.1, n. 1, p. 53–62, 2004.
- CATTANEO, D.; BALDELLI, S.; PERICO, N. Pharmacogenetics of immunosuppressants: Progress, pitfalls and promises. *Am J Transplant*, v.8, n. 7, p.1374-83, 2008.
- CHAN, L. et al. Patient-reported gastrointestinal symptom burden and health-related quality of life following conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium. *Transplantation*, v.81, n. 9, p.1290-1297, 2006.
- CHANTRY, A. S. et al. Clinical application, limits and perspectives of pharmacogenetic and pharmacokinetic analysis of anticancer drugs. *Ann Biol Clin (Paris)*, v.72, n. 5, p. 527-542, 2014.
- CHEN, H.; CHEN, B. Clinical mycophenolic acid monitoring in liver transplant recipients. *World J Gastroenterol.*, v. 20, n. 31, p. 10715–10728, 2014.
- COSCIA, L. A. et al. Immunosuppressive drugs and fetal outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, v. 28, n. 8, p.1174-87, 2014.

FRYMOYER, A. et al. Population pharmacokinetics of unbound mycophenolic acid in adult allogeneic haematopoietic cell transplantation: effect of pharmacogenetic factors. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 75, n. 2, p. 463-75, 2013.

FU, L. et al. Short-term therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid reduces infection: a prospective, single-center cohort study in Chinese living-related kidney transplantation. *Transpl. Infect. Dis.*, v.16, n. 5, p. 760-6, 2014.

GIRONELLA, A. C. P. S. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid and their relation response to therapy of childhood-onset systemic lúpus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.*,v. 40, n.4, p. 307–313, 2011.

GRINYÓ, J. M.; PETRUZZELLI, S. Once-daily LCP-Tacro MeltDose tacrolimus for the prophylaxis of organ rejection in kidney and liver transplantations. *Expert RevClin Immunol.*, v. 10, n. 12, p. 1567-1579, 2014.

GUO, D. et al. Polymorphisms of UGT1A9 and UGT2B7 influence the pharmacokinetics of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy Chinese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, v.69, n. 4, p.843–849, 2013.

HAN, N. et al. Population pharmacogenetic pharmacokinetic modeling for flip-flop phenomenon of enteric-coated mycophenolate sodium in kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.*, v.70, n. 10, p.1211-9, 2014.

HARTONO, C.; MUTHUKUMAR, T.; SUTHANTHIRAN, M. Immunosuppressive Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med (CSH)*, 2015.

HERRERO, M. J. et al. Influence of pharmacogenetic polymorphisms in routine immunosuppression therapy after renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, v. 42, n. 8, p. 3134-3136, 2010.

Hoffman-La Roche Ltda, CellCept Prescribing information. Accessed 20/12/2014. Available from: <http://www.gene.com/gene/products/information/cellcept/pdf/pi.pdf>.

HUH, S. Y. et al. Mycophenolate Mofetil in the Treatment of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *JAMA Neurol.*, v. 71, n. 11, p. 1372-8, 2014.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*, v. 158, n. 3, p. 693-705, 2009.

- KHAN, E. et al. Long-term outcome of ketoconazole and tacrolimus co-administration in kidney transplant patients. *World J Nephrol.*, v. 3, n. 3, p.107-113, 2014.
- KLAASSEN, C. D.; ALEKSUNES, L. M. Xenobiotic bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev*, v. 62, n. 1, p. 1-96, 2010.
- KUYPERS, D. R.; NAESENS, M.; VERMEIRE, S.; VANRENTERGHEM, Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphism T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin. Pharmacol. Ther.* v. 78, n. 4, p. 351-361, 2005.
- LE MEUR, Y. et al. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant.*, v.7, n.11, p. 2496-503, 2007.
- LINDGREN, A. Stroke Genetics: A Review and Update. *J Stroke*, v.16, n.3, p. 114-123, 2014.
- LING, J. et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and its main glucuronide metabolite: a comparison between healthy Chinese and Caucasian subjects receiving mycophenolate mofetil. *Eur J Clin Pharmacol.*, v.71, n.1, p. 95-106, 2015.
- MADRAKIAN, T.; SOLEIMANI, M.; AFKHAMI, A. Simultaneous determination of mycophenolate mofetil and its active metabolite, mycophenolic acid, by differential pulse voltammetry using multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, v. 42, p. 38–45, 2014
- MURRAY, B. et al. Genes and beans: pharmacogenomics of renal transplant. *Pharmacogenomics.*, v.14, n.7, p.783-98, 2013.
- NASCIMENTO, E. et al. Transplante Renal: Avaliação e Resultados Clínicos de 237 destinatários Baixo, Médio, Alto e forte risco imunológico de Rejeição. *Proceedings transplante*, v. 46, p. 101-107, 2014.
- NGUYEN, T. M. T. et al. Mycophenolic acid quantification in human peripheral blood mononuclear cells using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. v. 46, n. 18, p. 1909-11, 2013.



- OLEJARZ, W.; BRYK, D.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D. Mycophenolate mofetil a new atheropreventive drug? *Acta Pol Pharm.*, v.71, n. 3, p.353-61, 2014.
- PAZIK, J. et al. Association of udp-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene polymorphism with kidney allograft function. *Ann Transplant*, v.16, n. 4, p. 69-73, 2011.
- REIS, F. P.; GOMES, B. H. P.; PIMENTA, L. L., ETZEL, A. Brain death and tissue and organ transplantation: the understanding of medical student. *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 25, n. 4, p. 279-283.
- MAZIDI, T.; ROUINI, M. R.; GHAHREMANI, M. H., et al. Impact of UGT1A9 polymorphism on mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in stable renal transplant patients. *Iran J Pharm Res*, v. 12, n. 3, p. 547-556, 2013.
- ROSSITER, M. W.; VALENÇA, M. P.; VALOIS, A. A. Renal transplantation: awareness of patient as to the perioperative period. *JBT J Bras Transpl.*, v.15, p.1620-1650, 2012.
- ROVIN, B. H.; MCKINLEY, A. M.; BIRMINGHAM, D. J. Can We Personalize Treatment for Kidney Diseases? *Clin J Am Soc Nephrol*, v.4, p.1670 –1676, 2009.
- SAINT-MARCOUX, F. et al. Large scale analysis of routine dose adjustments of mycophenolate mofetil based on global exposure in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* , v. 33, n. 3, p. 285–94, 2011.
- SANTOS, C. et al. Kidney transplantation across a positive crossmatch: a single-center experience. *Transplant Proc.*, v. 46, n. 6, p.1705-9, 2014.
- SCHUTZ, E. et al. Azathioprine pharmacogenetics: The relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, v. 34, n. 3, p.199–205, 1996.
- SODRÉ, A. C. B. M.; SILVA, D. S. S.; COSTA, M. C. O. Perception by nurses of the donation-transplantation of organs and tissue intensive process. *JBT J Bras Transpl.*, v.15, p.1620-1650, 2012.
- SOLLINGER, H. W. Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant*, Madison, v. 18, n.15, p. 485-492, Oct. 2004.

STAATZ, C. E.; TETT, S. E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients, *Clin Pharmacokinet*, v. 46, n. 1, p. 13-58, 2007.

TAVIRA, B. et al. Pharmacogenetics of tacrolimus: from bench to bedside? *Nefrologia*, v. 34, n.1, p.11-7, 2014.

VAN GELDER, T. et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Ther Drug Monit*, v. 28, n. 2, p. 145-154, 2006.

YIANNAKOPOULOU, E. Ch. Pharmacogenetics of phase II metabolizing enzymes and drug transporters: clinical implications. *The Pharmacogenomics Journal*, v.13, n. 2, p.105-109, 2013.

ZUBER, K.; HOWARD, T.; DAVIS, J. Transplant in the 21 st century. *JAAPA*, v. 27, n. 11, p: 26-34, 2014.

