

IN DEPTH REVIEW

Farmacogenetica: un possibile strumento per la personalizzazione della terapia immunosoppressiva nel trapianto renale



Chiara Caletti, Simona Granata, Paola Tomei, Alessandra Dalla Gassa, Antonio Lupo, Gianluigi Zaza

Sezione di Nefrologia-Dipartimento di Medicina-Università di Verona, Verona, Italy.

Corrispondenza a: Dr. Gianluigi Zaza, MD, PhD; U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona. Piazzale A. Stefani 1, 37126, Verona (VR), Italia; Tel:+39 045 8122528 Fax:+39 045 8027311
Mail: gianluigi.zaza@univr.it

Abstract

Il trapianto renale rappresenta la terapia d'elezione per la malattia renale allo stadio terminale, una condizione clinica caratterizzata da gravi alterazioni biologiche/biochimiche che richiedono una terapia sostitutiva della funzione renale per garantire la sopravvivenza dei pazienti. Il trapianto è seguito, nella maggior parte dei casi, da un significativo miglioramento della qualità di vita dei pazienti, da una riduzione delle spese mediche e da un prolungamento della vita. Tuttavia i pazienti nefro-trapiantati devono assumere diversi farmaci immunosoppressori (inibitori della calcineurina, inibitori di mTOR e antimetaboliti) caratterizzati da un basso indice terapeutico, che, in alcuni casi, potrebbero determinare importanti effetti collaterali. Per evitare tossicità e reazioni avverse al farmaco, è importante che gli immunosoppressori siano somministrati correttamente sulla base dei livelli ematici degli stessi. Tuttavia questa metodologia risulta spesso poco riproducibile e poco efficiente. Inoltre, come in gran parte descritto, differenze ereditarie nel metabolismo e nella disposizione dei farmaci, e la variabilità genetica nei bersagli terapeutici (es recettori) possono inficiare significativamente i loro effetti e la tossicità. Pertanto, numerosi studi si stanno focalizzando sulla identificazione di biomarcatori utili per personalizzare la terapia sulla base delle caratteristiche genetiche dei pazienti. In questo contesto, riteniamo che le tecniche "omiche" potrebbero rappresentare in futuro potenti strumenti che, se impiegate regolarmente, potrebbero contribuire a raggiungere questo obiettivo.

Parole chiave: biomarcatore, farmacogenetica, immunosoppressione, medicina personalizzata

Pharmacogenetics: a promising tool to personalize immunosuppressive therapy in renal transplantation

Renal transplantation is the gold standard therapy for patients affected by end stage renal disease. It is a clinical condition characterized by severe biological/biochemical alterations that requires renal replacement therapy to ensure patients' survival. In most cases, it is followed by a significant improvement of patients' quality of life, reduction in medical expenses and prolongation of life. However, to reach these positive clinical effects, patients need to take several immunosuppressive medications (calcineurin inhibitors, mTOR inhibitors and antimetabolites) characterized by a narrow therapeutic index, that, in some cases, could cause important adverse effects. To avoid toxicities and adverse drug reactions, immunosuppressors should be correctly administered, according to the blood trough levels. Nevertheless, in most of the times, this methodology to adjust drug doses gives inadequate and non-reproducible results. Additionally, as largely described, inherited differences in drug metabolism and disposition and genetic

variability in therapeutic targets (e.g. receptors) need to be taken into account because of their role in modulating drug effects and toxicities. Therefore, worldwide researchers are working together to identify biomarkers, useful to personalize therapy based on genetic characteristics of patients. In this context, we believe that the “omics” techniques could represent a future powerful instruments that, whether employed routinely, could help to reach this objective.

Key words: biomarker, immunosuppression, personalized medicine, pharmacogenetics, renal transplantation

Assicurare una sopravvivenza a lungo termine dell'organo nel trapianto renale: una questione di adeguata immunosoppressione

Il trapianto renale è la migliore terapia sostitutiva della funzione renale per i pazienti affetti da insufficienza renale cronica terminale, una condizione clinica caratterizzata da gravi alterazioni biologiche/biochimiche che necessita di un trattamento sostitutivo per garantire la sopravvivenza del paziente. Il trapianto renale determina nella maggior parte dei casi, un significativo miglioramento della qualità di vita, una riduzione del costo sanitario e un prolungamento della vita del paziente [1] [2] [3] (full text). Infatti, subito dopo il trapianto, i pazienti subiscono un rapido e significativo miglioramento delle loro condizioni cliniche [4] (full text) [5]. Tuttavia, a volte, possono verificarsi complicanze cliniche importanti (ad esempio, infezioni, tumori e malattie cardiovascolari), il più delle volte indotte dai farmaci [6] (full text) [7] [8]. Infatti, i farmaci immunosoppressori attualmente impiegati, anche se in grado di limitare le complicanze a breve termine (compreso il rigetto acuto), sono ancora deficitari nel garantire la sopravvivenza a lungo termine dell'organo. Come riportato dal registro americano, il tasso annuo di decessi con rene funzionante e con CAD (chronic allograft dysfunction) risulta del 3-5% [9]. Per tali ragioni la comunità scientifica internazionale sta lavorando per identificare biomarcatori utili per personalizzare la terapia sulla base di caratteristiche genetiche/genomiche dei singoli pazienti, per selezionare strumenti molecolari atti al monitoraggio farmacologico e per studiare biomarcatori in grado di identificare i pazienti ad alto rischio di danno cronico, in cui una variazione precoce della terapia immunosoppressiva può sicuramente modificare gli esiti del trapianto. Si ipotizza che, nei prossimi anni, l'uso di tecniche "omiche" possa avere un impatto significativo nel facilitare il raggiungimento di questi obiettivi cruciali.

Genetica e personalizzazione della terapia immunosoppressiva nel trapianto renale

2.1 Inibitori della calcineurina

Ciclosporina (CsA) e tacrolimus (TAC) rappresentano nella maggior parte dei casi i farmaci cardine della terapia antirigetto e presentano un meccanismo d'azione simile. CsA agisce mediante la formazione di un complesso con la ciclofillina e successivamente, inibendo l'attività fosfatase della calcineurina, impedisce la traslocazione nel nucleo dei fattori nucleari delle cellule T attivate (NFAT) e quindi la trascrizione dei geni codificanti per numerose citochine e altri mediatori dell'immunità, tra cui IL-2. TAC agisce invece attraverso il legame con FKBP-12 (FK binding protein 12), inibendo a valle la stessa via di segnale. L'inibizione della calcineurina indotta da queste molecole blocca l'attivazione dei linfociti T e quindi l'amplificazione della risposta immune [10]. Sebbene entrambi i farmaci presentino un meccanismo d'azione simile, usino lo stesso trasportatore e gli stessi enzimi metabolici,

esistono differenze importanti. TAC è metabolizzato principalmente da due enzimi appartenenti alla famiglia del citocromo P450, CYP3A5 e CYP3A4 [11] (full text) [12]. Le varianti genetiche dei geni codificanti per queste due forme enzimatiche influenzano quindi il livello ematico e l'attività del farmaco. Il principale determinante è un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) a livello dell'introne 3 di CYP3A5 (6986 A>G; rs776746 SNP), anche noto come CYP3A5*3. L'allele CYP3A5*3 è una variante di splicing con un codone di stop prematuro e codifica per un enzima con attività ridotta. I pazienti omozigoti per questa variante richiedono una dose di TAC inferiore di circa il 50% per raggiungere la concentrazione target nel sangue rispetto ai portatori dell'allele CYP3A5*1 (wild-type) [13] [14] [15] [16]. Questa condizione ha un notevole impatto clinico considerando che circa il 5-15% degli individui bianchi esprimono CYP3A5*1, rispetto a circa il 30% degli asiatici, e al 70% degli individui di origine africana [17]. Pertanto, una corretta genotipizzazione per CYP3A5, da effettuare insieme agli accertamenti per la lista trapianto, potrebbe essere utile per ottimizzare il dosaggio di TAC nel periodo post-trapianto [18] (full text) [19]. Anche i polimorfismi del CYP3A4 possono influenzare la farmacocinetica di TAC. Lo SNP CYP3A4*22 (rs35599367; c.522-191 C>T nell'introne 6) è stato associato ad una ridotta espressione dell'mRNA di CYP3A4 e ad una minore attività in vitro dello stesso [20]. Nei pazienti sottoposti a trapianto renale, la variante allelica CYP3A4*22 è associata ad una ridotta dose terapeutica di TAC, indipendentemente dal genotipo CYP3A5 [21] (full text). Lo SNP CYP3A4*1B comporta la sostituzione di una A con una G sulla regione del promotore del CYP3A4 (-392A>G), ed è stata associata ad un aumento dell'attività del CYP3A4. Lo studio condotto da Tavira e coll., ha evidenziato come, ad un anno dal trapianto, i pazienti che erano CYP3A5*3/*3 + CYP3A4*1B avevano valori TAC al C0 compresi nell'intervallo di riferimento, mentre il 6% dei soggetti CYP3A5*3/*3 + CYP3A4*1/*1 presentavano valori al di fuori del range terapeutico [22]. La maggior parte delle varianti di CYP3A4 trovata nella regione codificante hanno una frequenza allelica <1%. Una eccezione è rappresentata dal CYP3A4*2, uno SNP nell'esone 7 (15713T>C) con conseguente variazione Ser222Pro, che presenta una frequenza del 5% tra i caucasici, ma non è stato stabilito il suo effetto sulla biodisponibilità di TAC. Questo allele è stato associato ad una ridotta clearance del substrato della nifedipina del CYP3A4, per cui i portatori di tale allele possono essere classificati come "slow metabolizers" [23] [24]. ABCB1 (o MDR-1) è il gene codificante per la P-glicoproteina, una pompa transmembrana che determina il passaggio di farmaco dal dominio intra al dominio extracellulare, influenzando così l'assorbimento, il metabolismo cellulare e la tossicità di diversi agenti farmacologici [25] (full text). I più comuni e ampiamente studiati sono gli SNPs ABCB1 che includono una transizione da C a T in posizione 3435 all'interno dell'esone 26 (rs1045642), da C a T in posizione 1236 all'interno dell'esone 12 (rs1128503) e da G a T in posizione 2677 all'interno esone 21 (rs2032582) del gene ABCB1 [26]. Il ruolo degli SNPs ABCB1 sulla farmacocinetica del TAC rimane incerto in quanto diversi studi hanno ottenuto risultati contrastanti [18] (full text) [27] [28] [29] [30] [31] [32]. CsA è metabolizzata principalmente dal CYP3A4, ma né i polimorfismi di questo gene, né del gene ABCB1, sembrano avere un effetto rilevante sul rapporto dose farmacologica/concentrazione ematica [33] [34] [35]. Tuttavia, la misurazione dell'attività ABCB1 in linfomonociti del sangue periferico dei pazienti nefrotrapiantati ha rilevato che i pazienti portatori di TT sugli SNPs C3435T, G2677T, e C1236T presentano una attività ABCB1 inferiore rispetto ai non portatori [36]. La ridotta attività di ABCB1, soprattutto collegata alla variante allelica 3435T, determina un aumento della concentrazione intracellulare di CsA, esponendo così i pazienti ad un rischio maggiore di effetti collaterali correlati al farmaco [37]. Altri autori hanno riportato un'associazione tra ridotta concentrazione intracellulare CsA nei linfociti T ed episodi di rigetto [38]. Diversi studi hanno inoltre documentato la presenza di associazione tra polimorfismi ABCB1 nel donatore e la sopravvivenza del trapianto a lungo termine. In particolare, la presenza della variante allelica TT

in posizione 3435 del gene ABCB1 sia nel donatore che nel ricevente è stata associata ad una ridotta funzionalità dell'organo oppure ad una perdita del trapianto a lungo termine [39] (full text) [40] (full text) [41] (full text) [42] [43] [44] [45]. Inoltre è stato riportato che il polimorfismo ABCB1 1199G>A si associa ad una migliore funzionalità renale a lungo termine [46]. Tuttavia, anche se la maggior parte degli studi farmacogenetici sul tacrolimus hanno prodotto risultati incoraggianti, l'unico studio randomizzato controllato pubblicato fin ora (TACTIC study) ha documentato che l'aggiustamento della dose di TAC secondo il genotipo CYP3A5 nei pazienti portatori di trapianto renale non riduce l'incidenza di ritardata ripresa funzionale, né il numero di sedute dialitiche nel post-trapianto né il numero di episodi di rigetto acuto rispetto al regime di dose standard [47].

2.2. Inibitori di mTOR

Gli Inibitori di mTOR (mTOR-I), sirolimus e everolimus, rappresentano una classe di inibitori della proliferazione cellulare utilizzati nel trapianto renale, dotati di un ampio spettro di attività, tra cui la soppressione della proliferazione delle cellule T e la riduzione della crescita tumorale. Il principale meccanismo di azione di questi farmaci è l'inibizione della mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR è una protein-chinasi regolatoria coinvolta nella proliferazione dei linfociti, nei processi di sviluppo neurologico e muscolare e nella crescita delle cellule tumorali. Sirolimus (SRL, Rapamune, Wyeth Pharmaceuticals, New York, NY) è stato il primo mTOR-I approvato nei pazienti sottoposti a trapianto renale. Esso agisce legando la FKBP-12. Everolimus (EVR), commercializzato come Certican, è stato approvato più recentemente ed è strutturalmente simile a SRL con l'aggiunta di un gruppo idrossietilico in posizione 40. Anche se le caratteristiche farmacocinetiche sono simili tra i due inibitori di mTOR, EVR è stato sviluppato nel tentativo di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche di SRL e la sua biodisponibilità orale; presenta infatti una emivita più breve e pertanto deve essere assunto due volte al giorno [48]. EVR e SRL sono metabolizzati principalmente dalla famiglie enzimatiche CYP3A [49] [50] e ABCB1. Diversi studi hanno indagato l'influenza di SNPs a carico dei geni codificanti per CYP3A4 e CYP3A5 sulla dose necessaria e sulla clearance dell'immunosoppressore. In particolare, un basso rapporto tra concentrazione e dose di SRL è stato osservato nei portatori di CYP3A5*1 (CYP3A5 expresser) rispetto ai portatori di CYP3A5*3/*3 (non expressers), suggerendo che i CYP3A5 non expressers richiedono una dose giornaliera di SRL inferiore per ottenere una adeguata concentrazione ematica. I pazienti con CYP3A5*1/*1 hanno una probabilità superiore di avere un metabolismo epatico maggiore e quindi richiedono una dose giornaliera più elevata per raggiungere adeguati livelli ematici di SRL [51] (full text) [52]. Inoltre, i pazienti portatori di CYP3A4*1B (-392A>G), associato ad un'attività enzimatica superiore, richiedono una dose maggiore di SRL per ottenere adeguate concentrazioni ematiche [51] (full text). Questi risultati sono stati evidenziati solo per SRL, ma non in tutti gli studi e solo in pazienti non in terapia con CNI [53]. Di recente, sono stati documentati nuovi polimorfismi: CYP3A4*22 nell'introne 6 del gene CYP3A4, POR*28 [P450 (citocromo) ossidoreduttasi] (rs1057868-C>T), e PPARA (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (rs4253728-G>a), ma questi non sembrano avere alcun impatto sulla farmacocinetica di SRL o sullo sviluppo di eventi avversi da SRL in pazienti sottoposti a trapianto di rene [54]. Inoltre, lo studio condotto da Sam e coll., ha documentato che il rapporto tra concentrazione e dose di SRL era superiore del 48% nei pazienti con genotipo ABCB1 3435CT/TT rispetto a quelli con genotipo 3435CC, ed era più alto del 24% nei soggetti omozigoti in IL-10 -1082GG rispetto a quelli con -1082AG/AA [55]; questi risultati evidenziano come in pazienti con questo genotipo sia presente una espressione maggiore di IL-10 con conseguente riduzione della attività di CYP3A e riduzione del metabolismo di SRL [56] [57]. In un altro lavoro gli stessi autori suggeriscono un'associazione tra i medesimi SNPs e la presenza di livelli di trigliceridi più elevati dopo

trattamento con SRL [58]. Come per i CNI, gli inibitori di mTOR presentano diversi effetti collaterali (compresi ipertrigliceridemia, iperlipidemia, edema, fibrosi polmonare e anemia) ed una maggiore escrezione urinaria di proteine con conseguente nefrotossicità [59] (full text) [60].

2.3. Micofenolato Mofetile

Micofenolato Mofetile (MMF) è un profarmaco che viene rapidamente idrolizzato in metabolita attivo, l'acido micofenolico (MPA), e che agisce bloccando la sintesi nucleotidica mediante una inibizione potente, selettiva e non competitiva dell'enzima IMPDH (inosine monophosphate dehydrogenase) che svolge un ruolo chiave nella sintesi de novo delle purine. Attraverso l'inibizione della sintesi de novo delle purine, che viene utilizzata principalmente dai linfociti, questo farmaco determina una riduzione significativa e selettiva della proliferazione di linfociti B e T. Infatti, gli altri tipi cellulari a rapido turnover sono in grado di utilizzare la via di "salvataggio" per la sintesi delle purine che non viene inibita da MPA [61]. MPA è metabolizzato a MPAG (7-O-mycophenolic acid MPA glucuronide) inattiva dall'enzima epatico UDP-glucuroniltransferasi (UGT), in particolare da UGT1A9, e successivamente viene deglucuronidato a livello del tratto gastrointestinale e riconvertito a MPA nel lume intestinale dove viene riassorbito attraverso la circolazione enteroepatica [61] [62] [63]. L'acil glucuronide (AcMPAG) è un altro metabolita di MPA con attività immunosoppressiva, prodotto per effetto dell'enzima UGT2B7 [63]. MPA è legato per 97-98% all'albumina sierica. Nei pazienti con disfunzione renale severa è presente un accumulo di MPAG che può competere con MPA nel legame all'albumina, determinando un incremento della concentrazione di MPA libero [33] [64]. Al momento non sono state identificate chiare associazioni farmacogenetiche per MPA, anche se appaiono promettenti alcuni risultati ottenuti dall'associazione tra specifici polimorfismi, la farmacocinetica e l'incidenza di eventi avversi. In particolare, diversi studi hanno dimostrato che la presenza di due SNP nella regione del promotore del gene UGT1A9, -2152C>T e -275T>A sono associati ad una maggiore glucuronidazione dell'MPA in MPAG [65] e ad una significativa riduzione dei livelli di MPA nelle prime fasi post-trapianto [66] [67]. Lo studio condotto da Van Schaik e coll., [68] ha confermato che i polimorfismi UGT1A9 -275T>A e -2152C>T sono associati ad una riduzione media del 20% dei livelli di MPA (in accordo con una attività enzimatica superiore) e ad un aumento significativo del rischio di rigetto acuto nei pazienti trattati con MMF a dose fissa in associazione a TAC. L'effetto di questi polimorfismi sui livelli di MPA sono stati confermati da altri lavori scientifici [65] [66] [69] [70]. Lo SNP UGT1A9*3 è presente in meno del 5% della popolazione bianca ed è stato associato ad un incremento dei livelli di MPA, per effetto di una riduzione della attività enzimatica in vitro [65] [66] [67]. Anche se sono stati identificati polimorfismi in altri geni che influenzano la farmacocinetica dell'MPA, è evidente che gli SNPs a carico di UGT1A9 hanno una influenza maggiore [66] [71] [72]. Inoltre, i polimorfismi dei geni codificanti per trasportatori farmacologici (compresi ABCB1 e SLCO1B1) o per enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci (UGT1A8 e UGT2B7) sono stati associati alla comparsa di eventi avversi, in particolare diarrea e tossicità ematologica, nei pazienti trattati con MMF [73] [74] [75] [76] [77] [78]. Tuttavia, nessuno di questi risultati ha trovato applicazione nella pratica clinica. Una parte della farmacogenetica del MMF è stata incentrata su IMPDH, un enzima chiave nella sintesi de novo delle purine. IMPDH esiste in due isoforme IMPDH-1 e IMPDH-2 codificate da geni diversi e per cui sono stati evidenziati diversi SNPs [79] [80] (full text) [81] [82]. È stata dimostrata una associazione tra alta attività di IMPDH prima del trapianto e rigetto acuto [83], suggerendo che i pazienti che presentano una alta attività enzimatica possono necessitare di una dose più elevata di MMF per ottenere la medesima immunosoppressione. I pazienti con bassa attività IMPDH richiederebbero invece un dosaggio MMF inferiore per ottenere lo stesso effetto immuno-

soppressivo [83] (full text). Lo studio condotto da Wang e coll., ha evidenziato che gli SNPs rs2278293 e rs2278294 a livello dell'introne 7 di IMPDH1 sono significativamente associati ad una aumentata incidenza di rigetto acuto nelle biopsie eseguite ad un anno post-trapianto [82] [84]. Sebbene la causa di questa associazione non sia stata determinata, gli autori suggeriscono un possibile collegamento con altri SNPs [82]. IMPDH-2 è più conservato di IMPDH-1; è stata documentata una associazione tra il polimorfismo 3757T>C ed una maggiore attività enzimatica in pazienti nefrotrapiantati in terapia con MMF [85]. I pazienti con almeno una variante allelica IMPDH-2 3757C presentavano una attività media superiore del 48% rispetto ai pazienti con IMPDH-2 3757TT wild-type; tuttavia ancora contrastanti sono i dati che valutano l'impatto di questa variante sul rischio di rigetto acuto [86]. Lo studio condotto nel 2012 da Shah e coll., analizzando 1000 pazienti sottoposti a trapianto di rene, non ha documentato alcuna associazione tra varianti di IMPDH, rischio di rigetto e sopravvivenza del trapianto [87]. Nel complesso, al momento non vi sono dati sufficienti per suggerire che l'utilizzo routinario dei test di farmacogenomica nel migliorare l'outcome dei pazienti trattati, in rapporto alla sicurezza ed efficacia del micofenolato stesso.

2.4. Azatioprina

Azatioprina (AZA) è uno dei più vecchi farmaci immunosoppressivi utilizzati in nefrologia, nel trattamento della malattia infiammatoria intestinale e in diverse malattie autoimmuni. AZA viene convertito principalmente nel fegato in 6-mercaptopurina (6-MP), probabilmente grazie all'enzima glutatione-S-transferasi (GST) [88]. La successiva conversione di 6-MP ad opera dell'enzima ipoxantina guanina fosforibosiltransferasi porta alla formazione di 6-tioguanina-nucleotide (6-TGN) che, una volta incorporato nel DNA, svolge azione citotossica diretta e sopprime la sintesi de novo delle purine [89] (full text). L'enzima tiopurina S-metil-transferasi (TPMT) determina invece la metilazione di 6-MP formando 6-metilmercapotpurina, una forma inattiva di AZA [90] [91] [92]. Questo enzima è codificato dal gene TPMT e la sua attività è legata ad un polimorfismo genetico: circa il 90% degli individui è dotato di una alta attività, il 10% di una attività intermedia per una eterozigosi, e lo 0,3% della popolazione è dotato di bassa o assente attività enzimatica, poiché ha ereditato due alleli di TPMT non funzionale [93]. Ad oggi sono state identificate 20 varianti alleliche (TPMT*2*18) associate ad una ridotta attività enzimatica rispetto a TPMT*1 wild-type [94]. Tre alleli, TPMT*2, *3A, e *3C, rappresentano fino al 95% dei casi di attività enzimatica intermedia o bassa [95]. Il tipo e la frequenza di alleli mutanti di TPMT è diverso tra i vari gruppi etnici [96]. L'allele TPMT*3A presenta due mutazioni puntiformi: G460A sull'esone 7 e A719G sull'esone 10 che portano rispettivamente alle sostituzioni amminoacidiche Ala154Thr e Tyr240Cys, l'allele TPMT*3C ha un'unica trasversione A719G, e l'allele TPMT*2 invece una trasversione G238C, producendo una sostituzione Ala80Pro [97] (full text) [98]. Sono state identificate altre varianti alleliche che sono tuttavia molto rare (*3B) o presenti solo in singoli individui (*4-*18) [99]. La ridotta o assente capacità di metabolizzare AZA attraverso l'enzima TPMT porta all'incremento dei livelli ematici di tioguanina e al conseguente aumento del rischio di mielotossicità, potenzialmente pericolosa se non si effettua una riduzione della dose [100] [101] [102] [103] (full text) [104] (full text) [105]. Lo studio condotto da Dervieux e coll., [106], che prevedeva una valutazione della attività TPMT nei globuli rossi di pazienti pediatrici dopo trapianto renale, ha dimostrato che una elevata attività di TPMT era correlata ad un aumentato rischio di rigetto acuto. Inoltre Thervet e coll., hanno osservato che l'induzione di TPMT (determinata dall'aumento della concentrazione del suo substrato, 6-MP) è associata ad una minore incidenza di rigetto acuto [107] (full text). La genotipizzazione dei polimorfismi di TPMT, prima dell'avvio di terapia con AZA, è uno dei pochi esempi di applicazione a livello clinico di un test di farmacogenetica, soprattutto nella terapia delle malattie autoimmuni [108]. Questo test è in grado di migliorare la sicurezza

della terapia evitando un trattamento ad alte dosi in pazienti con deficit enzimatico anche solo parziale [105]. A causa della associazione tra genotipo omo- ed eterozigote e attività di TMPT da bassa a moderata con conseguente incremento della soppressione midollare, la Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing ha approvato l'utilizzo della genotipizzazione prima di avviare trattamento con AZA per poter valutare il dosaggio adeguato ed eventualmente la necessità di utilizzo di altri farmaci [109].

Scienze omiche: ricerca di nuovi target terapeutici

Negli ultimi dieci anni, i ricercatori in ambito nefrologico hanno iniziato ad impiegare le tecniche "omiche" per selezionare nuovi potenziali bersagli terapeutici di immunosoppressione [110] (full text) [111] (full text). Nel 2003 Sarwal e coll., hanno dimostrato che una analisi di espressione genica è in grado di rivelare una specifica impronta biologica e patogenetica del rigetto d'organo. I campioni biotici di pazienti con rigetto acuto che presentano caratteristiche istologiche indistinguibili in base alle analisi istologiche convenzionali, hanno dimostrato notevoli differenze di espressione genica, associate a differenze nelle caratteristiche cellulari, immunologiche e di decorso clinico. La presenza di densi clusters di cellule B in un campione biotico è stata strettamente associata con l'insorgenza di rigetto severo, suggerendo un ruolo centrale delle cellule B nel rigetto acuto. Sulla base di questi risultati, gli autori hanno ipotizzato che, nei pazienti in cui è presente un importante infiltrato B, potrebbe essere indicato il trattamento precoce con un anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab) [112] (full text). Successivamente, un approccio metodologico simile è stato intrapreso allo scopo di riconoscere gli elementi biologici specificamente coinvolti nello sviluppo della tolleranza immunologica nel trapianto renale. Alcuni pazienti sottoposti a trapianto, infatti, mostrano una funzione renale stabile senza immunosoppressione, definibile come "operational tolerance" [113] (full text) [114]. L'identificazione dei "biomarcatori di tolleranza" potrebbe consentire di riconoscere nella pratica clinica i pazienti in cui la terapia anti-rigetto potrebbe essere ridotta al minimo o interrotta. Il pacchetto "tollerogenico" attualmente proposto, contiene geni che codificano per proteine implicate in apoptosi, quiescenza immunitaria e risposta T-mediata [113] (full text). Più recentemente lo studio condotto da Newell e coll., attraverso la tecnologia microarray e l'analisi funzionale, ha dimostrato che i pazienti tolleranti presentano un numero aumentato di cellule B totali e naive e sono dotati di una maggiore espressione dei geni responsabili della differenziazione e attivazione delle cellule B, rispetto ai soggetti trattati con immunosoppressione. In particolare, gli autori hanno identificato tre geni predittori di tolleranza (IGKV4-1, IGLLA, e IGKV1D-13) con una precisione del 100%, che potrebbero essere utili come marcatori di tolleranza. Questi geni sono tutti espressi durante la differenziazione delle cellule B o durante la transizione attivazione-indotta. Tali risultati suggeriscono che le cellule B in transizione o in maturazione sono coinvolte nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza [115]. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare l'utilità clinica dei fattori biologici e cellulari sopra identificati. Recentemente, il nostro gruppo, utilizzando una strategia high-throughput combinata con metodologie classiche biomolecolari, ha rivelato che endopeptidasi neutra (NEP), un enzima che catalizza la degradazione di alcuni peptidi vasodilatatori endogeni, come dell'angiotensina II, è significativamente iper-espresso nei pazienti nefrotrapiantati dopo la conversione da AZA a MPA. L'analisi immunoistochimica ha confermato i risultati ottenuti dal microarray e ha rivelato che l'espressione glomerulare di NEP era inversamente correlata con l'entità di glomerulosclerosi e proteinuria, mentre quella di NEP tubulare era inversamente associata alla presenza di fibrosi interstiziale. Questi risultati suggeriscono che una iper-espressione di NEP indotta da MPA potrebbe ridurre l'entità della

proteinuria e ritardare la progressione del danno renale cronico in pazienti sottoposti a trapianto renale [116] (full text). Inoltre, attraverso la stessa metodologia, abbiamo scoperto che le carioferine, proteine adattatorie che riconoscono i segnali di localizzazione nucleare (NLS), che possono avere un ruolo fondamentale nello sviluppo della delay graft function (DGF); tali proteine potrebbero rappresentare un nuovo e importante bersaglio terapeutico. Infatti, negli ultimi anni, si è evidenziato come diversi farmaci agiscano inibendo l'attività delle carioferine (ad esempio Importazole e Ivermectina) [117] (full text) [118] [119]. Sono stati intrapresi inoltre diversi studi basati sulla tecnologia microarray volti a selezionare potenziali bersagli farmacologici utili per ridurre al minimo l'insorgenza di rigetto acuto. Lo studio condotto da Kainz e coll., basato su una complessa analisi genomica di materiali nucleici prelevati da reni prima del trapianto e ad un anno post-trapianto, ha identificato 52 geni in grado di discriminare con precisione i pazienti con funzione renale ottimale rispetto a soggetti con funzione renale non soddisfacente. Nel gruppo con funzione renale ridotta risultavano up-regolati i geni coinvolti nella risposta immune, nella trasduzione del segnale e nella risposta allo stress ossidativo, mentre erano down-regolati i geni coinvolti nel metabolismo, nel trasporto e nel legame ionico [120]. Infine, in un recente lavoro pubblicato da Saint-Mezard e coll., attraverso una analisi comparativa fra tre differenti set di microarray (GSE343, GSE9493 e GSE1563), è stato individuato uno specifico "acute rejection transcript set" comprendente 70 geni [121].

Conclusioni

Una corretta gestione della terapia immunosoppressiva ha un impatto significativo sulla sopravvivenza dell'organo trapiantato e del paziente. Numerosi studi in vivo e in vitro hanno sottolineato come la dose farmacologica abbia un ruolo importante nel minimizzare il danno cronico del graft, ma purtroppo, al momento, ad eccezione della valutazione del trough level del farmaco, non vi sono strumenti clinici utili per gestire correttamente la terapia immunosoppressiva. A questo proposito, riteniamo che le tecniche "omiche" potrebbero rappresentare in futuro un strumento importante che, se impiegato routinariamente, potrebbe aiutare i medici nella personalizzazione del trattamento, evitando così gravi effetti collaterali ed incrementando invece gli effetti terapeutici. Tuttavia, in base agli attuali dati di letteratura, siamo ancora lontani da un impiego clinico di queste strategie in tema di nefrologia e trapianti d'organo; è pertanto necessario che medici e ricercatori collaborino per superare gli ostacoli scientifici, economici, educativi e giuridici che ancora sussistono.

Bibliografia

[1] Jofré R, López-Gómez JM, Moreno F et al. Changes in quality of life after renal transplantation. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1998 Jul;32(1):93-100

[2] Karlberg I, Nyberg G Cost-effectiveness studies of renal transplantation. *International journal of technology assessment in health care* 1995 Summer;11(3):611-22

[3] Schnuelle P, Lorenz D, Trede M et al. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1998 Nov;9(11):2135-41 (full text)

[4] Tonelli M, Wiebe N, Knoll G et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011 Oct;11(10):2093-109 (full text)

[5] Rezzani R, Rodella L, Bianchi R et al. Early metabolic changes in peripheral blood cells of renal transplant recipients treated with cyclosporine A. *International journal of immunopharmacology* 1999 Jul;21(7):455-62

[6] Zaza G, Tomei P, Granata S et al. Monoclonal antibody therapy and renal transplantation: focus on adverse effects. *Toxins* 2014 Feb 28;6(3):869-91 (full text)

- [7] Pallet N, Djamali A, Legendre C et al. Challenges in diagnosing acute calcineurin-inhibitor induced nephrotoxicity: from toxicogenomics to emerging biomarkers. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2011 Jul;64(1):25-30
- [8] Min DI, Monaco AP Complications associated with immunosuppressive therapy and their management. *Pharmacotherapy* 1991;11(5):119S-125S
- [9] U.S. Renal Data System, USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.
- [10] Rao A, Luo C, Hogan PG et al. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology* 1997;15:707-47
- [11] Kamdem LK, Streit F, Zanger UM et al. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clinical chemistry* 2005 Aug;51(8):1374-81 (full text)
- [12] Vincent SH, Karanam BV, Painter SK et al. In vitro metabolism of FK-506 in rat, rabbit, and human liver microsomes: identification of a major metabolite and of cytochrome P450 3A as the major enzymes responsible for its metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics* 1992 May 1;294(2):454-60
- [13] Macphee IA, Fredericks S, Tai T et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002 Dec 15;74(11):1486-9
- [14] Thervet E, Anglicheau D, King B et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003 Oct 27;76(8):1233-5
- [15] Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004 Mar;14(3):147-54
- [16] Jacobson PA, Oetting WS, Brearley AM et al. Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: results from a multicenter kidney transplant consortium. *Transplantation* 2011 Feb 15;91(3):300-8
- [17] Hesselink DA, Bouamar R, Elens L et al. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics* 2014 Feb;53(2):123-39
- [18] Haufroid V, Wallemacq P, VanKerckhove V et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2006 Nov;6(11):2706-13 (full text)
- [19] MacPhee IA, Holt DW A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation* 2008 Jan 27;85(2):163-5
- [20] Wang D, Guo Y, Wrighton SA et al. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *The pharmacogenomics journal* 2011 Aug;11(4):274-86
- [21] Elens L, Bouamar R, Hesselink DA et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clinical chemistry* 2011 Nov;57(11):1574-83 (full text)
- [22] Tavira B, Coto E, Díaz-Corte C et al. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2011 May;49(5):825-33
- [23] Shchepotina EG, Vavilin VA, Goreva OB et al. Some mutations of exon-7 in cytochrome P450 gene 3A4 and their effect on 6beta-hydroxylation of cortisol. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2006 Jun;141(6):701-3
- [24] Sata F, Sapone A, Elizondo G et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2000 Jan;67(1):48-56
- [25] Evans WE, McLeod HL Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *The New England journal of medicine* 2003 Feb 6;348(6):538-49 (full text)
- [26] Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003 Aug;13(8):481-94
- [27] Tsuchiya N, Satoh S, Tada H et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004 Oct 27;78(8):1182-7
- [28] Tada H, Tsuchiya N, Satoh S et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* 2005 May;37(4):1730-2
- [29] Zhang X, Liu ZH, Zheng JM et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clinical transplantation* 2005 Oct;19(5):638-43
- [30] Roy JN, Barama A, Poirier C et al. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics* 2006 Sep;16(9):659-65
- [31] Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M et al. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2006;44(10):1192-8
- [32] Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H et al. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Therapeutic drug monitoring* 2010 Aug;32(4):394-404
- [33] Staatz CE, Goodman LK, Tett SE et al. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clinical pharmacokinetics* 2010 Mar;49(3):141-75
- [34] Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH et al. Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Therapeutic drug monitoring* 2011 Apr;33(2):178-84
- [35] Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2003 Sep;74(3):245-54

- [36] Llaudó I, Colom H, Giménez-Bonafé P et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2013 Feb;26(2):177-86
- [37] Crettol S, Venetz JP, Fontana M et al. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics* 2008 Apr;18(4):307-15
- [38] Falck P, Asberg A, Guldseth H et al. Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine precedes acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008 Jan 27;85(2):179-84
- [39] Naesens M, Lerut E, de Jonge H et al. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009 Nov;20(11):2468-80 (full text)
- [40] Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005 May;16(5):1501-11 (full text)
- [41] Cattaneo D, Ruggenenti P, Baldelli S et al. ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009 Jun;20(6):1404-15 (full text)
- [42] Woillard JB, Rerolle JP, Picard N et al. Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010 Jul;88(1):95-100
- [43] Joy MS, Nিকেleit V, Hogan SL et al. Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. *Pharmacotherapy* 2005 Jun;25(6):779-89
- [44] Anglicheau D, Pallet N, Rabant M et al. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney international* 2006 Sep;70(6):1019-25
- [45] Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T et al. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Therapeutic drug monitoring* 2010 Aug;32(4):387-93
- [46] De Meyer M, Haufroid V, Elens L et al. Donor age and ABCB1 1199G>A genetic polymorphism are independent factors affecting long-term renal function after kidney transplantation. *The Journal of surgical research* 2012 Dec;178(2):988-95
- [47] Thervet E, Lorient MA, Barbier S et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010 Jun;87(6):721-6
- [48] Gabardi S, Baroletti SA Everolimus: a proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation, oncology, and cardiology. *Pharmacotherapy* 2010 Oct;30(10):1044-56
- [49] Jacobsen W, Serkova N, Hausen B et al. Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD. *Transplantation proceedings* 2001 Feb-Mar;33(1-2):514-5
- [50] Sattler M, Guengerich FP, Yun CH et al. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 1992 Sep-Oct;20(5):753-61
- [51] Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S et al. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2005 Mar;5(3):595-603 (full text)
- [52] Le Meur Y, Djebli N, Szelag JC et al. CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2006 Jul;80(1):51-60
- [53] Mourad M, Mourad G, Wallemacq P et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005 Oct 15;80(7):977-84
- [54] Picard N, Rougueie-Malki K, Kamar N et al. CYP3A5 genotype does not influence everolimus in vitro metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transplantation* 2011 Mar 27;91(6):652-6
- [55] Sam WJ, Chamberlain CE, Lee SJ et al. Associations of ABCB1 3435C>T and IL-10-1082G>A polymorphisms with long-term sirolimus dose requirements in renal transplant patients. *Transplantation* 2011 Dec 27;92(12):1342-7
- [56] Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Molecular pharmacology* 1993 Oct;44(4):707-15
- [57] Bertilsson PM, Olsson P, Magnusson KE et al. Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDRI in intestinal cells. *Journal of pharmaceutical sciences* 2001 May;90(5):638-46
- [58] Sam WJ, Chamberlain CE, Lee SJ et al. Associations of ABCB1 and IL-10 genetic polymorphisms with sirolimus-induced dyslipidemia in renal transplant recipients. *Transplantation* 2012 Nov 15;94(9):971-7
- [59] Zaza G, Tomei P, Ria P et al. Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clinical & developmental immunology* 2013;2013:403280 (full text)
- [60] Zaza G, Granata S, Tomei P et al. mTOR inhibitors and renal allograft: Yin and Yang. *Journal of nephrology* 2014 Oct;27(5):495-506
- [61] Allison AC, Eugui EM The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer seminars in immunopathology* 1993;14(4):353-80
- [62] Ting LS, Partovi N, Levy RD et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid and its phenolic-glucuronide and ACYI glucuronide metabolites in stable thoracic transplant recipients. *Therapeutic drug monitoring* 2008 Jun;30(3):282-91
- [63] Johnson AG, Rigby RJ, Taylor PJ et al. The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1999 Nov;66(5):492-500
- [64] Meier-Kriesche HU, Shaw LM, Korecka M et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal insufficiency. *Therapeutic drug monitoring* 2000 Feb;22(1):27-30
- [65] Girard H, Court MH, Bernard O et al. 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* 2004 Aug;14(8):501-15

[66] Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S et al. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2005 Oct;78(4):351-61

[67] Hesselink DA, van Gelder T Genetic and nongenetic determinants of between-patient variability in the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2005 Oct;78(4):317-21

[68] van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW et al. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2009 Sep;86(3):319-27

[69] Lévesque E, Delage R, Benoit-Biancamano MO et al. The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphisms on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2007 Mar;81(3):392-400

[70] Sánchez-Fructuoso AI, Maestro ML, Calvo N et al. The prevalence of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T and its influence on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant patients. *Transplantation proceedings* 2009 Jul-Aug;41(6):2313-6

[71] Baldelli S, Merlini S, Perico N et al. C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 2007 Sep;8(9):1127-41

[72] van Gelder T, van Schaik RH, Hesselink DA et al. Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation. *Nature reviews. Nephrology* 2014 Dec;10(12):725-31

[73] Picard N, Yee SW, Woillard JB et al. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010 Jan;87(1):100-8

[74] Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH et al. Mycophenolic acid-related diarrhea is not associated with polymorphisms in SLCO1B1 nor with ABCB1 in renal transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics* 2012 Jun;22(6):399-407

[75] Jacobson PA, Schladt D, Oetting WS et al. Genetic determinants of mycophenolate-related anemia and leukopenia after transplantation. *Transplantation* 2011 Feb 15;91(3):309-16

[76] Woillard JB, Rerolle JP, Picard N et al. Risk of diarrhoea in a long-term cohort of renal transplant patients given mycophenolate mofetil: the significant role of the UGT1A8 2 variant allele. *British journal of clinical pharmacology* 2010 Jun;69(6):675-83

[77] van Agteren M, Armstrong VW, van Schaik RH et al. AcylMPAG plasma concentrations and mycophenolic acid-related side effects in patients undergoing renal transplantation are not related to the UGT2B7-840G>A gene polymorphism. *Therapeutic drug monitoring* 2008 Aug;30(4):439-44

[78] Prausa SE, Fukuda T, Maseck D et al. UGT genotype may contribute to adverse events following medication with mycophenolate mofetil in pediatric kidney transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2009 May;85(5):495-500

[79] Digits JA, Hedstrom L Species-specific inhibition of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase by mycophenolic acid. *Biochemistry* 1999 Nov 16;38(46):15388-97

[80] McPhillips CC, Hyle JW, Reines D et al. Detection of the mycophenolate-inhibited form of IMP dehydrogenase in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Aug 17;101(33):12171-6 (full text)

[81] Roberts RL, Geary RB, Barclay ML et al. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *The pharmacogenomics journal* 2007 Oct;7(5):312-7

[82] Wang J, Yang JW, Zeevi A et al. IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2008 May;83(5):711-7

[83] Glander P, Hambach P, Braun KP et al. Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004 Dec;4(12):2045-51 (full text)

[84] Kagaya H, Miura M, Saito M et al. Correlation of IMPDH1 gene polymorphisms with subclinical acute rejection and mycophenolic acid exposure parameters on day 28 after renal transplantation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2010 Aug;107(2):631-6

[85] Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA et al. Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenetics and genomics* 2009 Aug;19(8):626-34

[86] Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2008 Sep;21(9):879-91

[87] Shah S, Harwood SM, Döhler B et al. Inosine monophosphate dehydrogenase polymorphisms and renal allograft outcome. *Transplantation* 2012 Sep 15;94(5):486-91

[88] Chalmers AH, Knight PR, Atkinson MR et al. 6-thiopurines as substrates and inhibitors of purine oxidases: a pathway for conversion of azathioprine into 6-thiouric acid without release of 6-mercaptopurine. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 1969 Apr;47(2):263-73

[89] Fink D, Aebi S, Howell SB et al. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1998 Jan;4(1):1-6 (full text)

[90] Lennard L The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European journal of clinical pharmacology* 1992;43(4):329-39

[91] McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV et al. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000 Apr;14(4):567-72

[92] Fabre MA, Jones DC, Bunce M et al. The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms on azathioprine dose 1 year after renal transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2004 Oct;17(9):531-9

[93] Weinshilboum RM, Sladek SL Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American journal of human genetics* 1980 Sep;32(5):651-62

- [94] Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of internal medicine* 1997 Apr 15;126(8):608-14
- [95] McLeod HL, Siva C The thiopurine S-methyltransferase gene locus -- implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2002 Jan;3(1):89-98
- [96] Krynetski EY, Evans WE Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 2000 Sep;61(3):136-46
- [97] Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ et al. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995 Feb 14;92(4):949-53 (full text)
- [98] Tai HL, Krynetski EY, Yates CR et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *American journal of human genetics* 1996 Apr;58(4):694-702
- [99] Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D et al. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004 Jul;14(7):407-17
- [100] Evans WE, Hon YY, Bomgaars L et al. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001 Apr 15;19(8):2293-301
- [101] Evans WE Thiopurine S-methyltransferase: a genetic polymorphism that affects a small number of drugs in a big way. *Pharmacogenetics* 2002 Aug;12(6):421-3
- [102] Black AJ, McLeod HL, Capell HA et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Annals of internal medicine* 1998 Nov 1;129(9):716-8
- [103] Relling MV, Hancock ML, Rivera GK et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *Journal of the National Cancer Institute* 1999 Dec 1;91(23):2001-8 (full text)
- [104] Ishioka S, Hiyama K, Sato H et al. Thiopurine methyltransferase genotype and the toxicity of azathioprine in Japanese. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 1999 Dec;38(12):944-7 (full text)
- [105] Kurzawski M, Dziewanowski K, Gawrońska-Szklarz B et al. The impact of thiopurine s-methyltransferase polymorphism on azathioprine-induced myelotoxicity in renal transplant recipients. *Therapeutic drug monitoring* 2005 Aug;27(4):435-41
- [106] Dervieux T, Médard Y, Baudouin V et al. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *British journal of clinical pharmacology* 1999 Dec;48(6):793-800
- [107] Thervet E, Anglicheau D, Toledano N et al. Long-term results of TPMT activity monitoring in azathioprine-treated renal allograft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2001 Jan;12(1):170-6 (full text)
- [108] Thompson AJ, Newman WG, Elliott RA et al. The cost-effectiveness of a pharmacogenetic test: a trial-based evaluation of TPMT genotyping for azathioprine. *Value in health : the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* 2014 Jan-Feb;17(1):22-33
- [109] Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011 Mar;89(3):387-91
- [110] Zaza G, Granata S, Tomei P et al. Personalization of the immunosuppressive treatment in renal transplant recipients: the great challenge in "omics" medicine. *International journal of molecular sciences* 2015 Feb 17;16(2):4281-305 (full text)
- [111] Zaza G, Granata S, Sallustio F et al. Pharmacogenomics: a new paradigm to personalize treatments in nephrology patients. *Clinical and experimental immunology* 2010 Mar;159(3):268-80 (full text)
- [112] Sarwal M, Chua MS, Kambham N et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *The New England journal of medicine* 2003 Jul 10;349(2):125-38 (full text)
- [113] Brouard S, Mansfield E, Braud C et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Sep 25;104(39):15448-53 (full text)
- [114] Yabu JM, Vincenti F Kidney transplantation: the ideal immunosuppression regimen. *Advances in chronic kidney disease* 2009 Jul;16(4):226-33
- [115] Newell KA, Asare A, Kirk AD et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation* 2010 Jun;120(6):1836-47
- [116] Dell'Oglio MP, Zaza G, Rossini M et al. The anti-fibrotic effect of mycophenolic acid-induced neutral endopeptidase. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010 Dec;21(12):2157-68 (full text)
- [117] Zaza G, Rascio F, Pontrelli P et al. Karyopherins: potential biological elements involved in the delayed graft function in renal transplant recipients. *BMC medical genomics* 2014 Mar 14;7:14 (full text)
- [118] Soderholm JF, Bird SL, Kalab P et al. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-β. *ACS chemical biology* 2011 Jul 15;6(7):700-8
- [119] Wagstaff KM, Rawlinson SM, Hearps AC et al. An AlphaScreen®-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *Journal of biomolecular screening* 2011 Feb;16(2):192-200
- [120] Kainz A, Perco P, Mayer B et al. Gene-expression profiles and age of donor kidney biopsies obtained before transplantation distinguish medium term graft function. *Transplantation* 2007 Apr 27;83(8):1048-54
- [121] Saint-Mezard P, Berthier CC, Zhang H et al. Analysis of independent microarray datasets of renal biopsies identifies a robust transcript signature of acute allograft rejection. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2009 Mar;22(3):293-302