Paulo Dominguez Nasser

**Frequência dos polimorfismos no gene da
TPMT em doadores de sangue e pacientes em
uso de azatioprina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências em Gastroenterologia
Orientadora: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nasser, Paulo Dominguez

Frequência dos polimorfismos no gene a TPMT em doadores de sangue e
pacientes em uso de azatioprina / Paulo Dominguez Nasser. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa: Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Suzane Kioko Ono

Descritores: 1.Azatioprina 2.Imunossupressão 3.Hepatite auto-imune
4.Transplante de rim

USP/FM/DBD-181/12

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José e Luisa pelo carinho, apoio e pelo constante incentivo à educação mesmo sem entenderem a metodologia e o trabalho desenvolvido no laboratório.

Aos meus irmãos Mauricio e Luciana pelo otimismo e confiança.

Aos familiares por sempre estarem ao meu lado tanto nos momentos de harmonia como também de dificuldade.

À Prof^a. Dr^a. Suzane Kioko Ono pela orientação, experiência e principalmente paciência. Foi a grande responsável por me oferecer uma oportunidade à vida acadêmica. Sempre empenhada a novos desafios e na melhoria do nosso grupo.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho pelo incentivo à pesquisa científica que sempre o acompanha, um exemplo de liderança.

Ao Prof. Dr. Pedro Renato Chocair pela sua demonstração de simplicidade e amor ao que faz. Foi um dos grandes incentivadores para a realização do trabalho e agradeço por compartilhar comigo sua experiência e vocação. Agradeço também pelas valiosas sugestões e correções como membro examinador da banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado pelo apoio, aprendizado e pelos “puxões de orelha” em toda essa empreitada. Sempre será lembrado também pela dedicação aos seus pacientes com muita dignidade e respeito. Agradeço também pelas valiosas sugestões e correções como membro examinador da banca de qualificação.

Ao Maurílio Pacheco Neto, Alexandre Soriano Fortini e à Dr^a. Atecla Nunciata Lopes Alves pelo imenso conhecimento, ensinamento e por abraçarem a realização deste projeto.

Aos colaboradores do departamento de Gastroenterologia pela convivência e apoio diário. A vocês, meu especial agradecimento.

Ao Prof. Dr. Adérson Omar Mourão Cintra Damião pelas valiosas sugestões e correções como membro examinador da banca de qualificação.

Aos amigos do LIM-07, Jeronimo de Alencar Nogueira, Helena Scavone Paschoale, Eliane P. do Carmo, Cinthia Zanini, Carolina Aguilar, Rodrigo Martins de Abreu, Ana Maria Sousa Silva, Fernanda Pereira de Campos, Mariana Akemi Nabeshima, Natália Companhia, Dr^a Maria Isabel Guedes Coelho, Marianges Z. Gouvêa, Maria Luiza da Nova, Dr^a. Sueli Nakatami e Dr^a Erika Fujihira pela ajuda concedida. A Aline Siqueira Ferreira por realizar e ensinar as análises estatísticas. Em especial, sou grato ao companheirismo e ensinamento de Marcelo Moreira Tavares de Souza e pela aluna Camila da Silva Ferreira por sua dedicação, tolerância, convívio e aprendizado ao longo desses anos. Sem vocês essa etapa não seria concluída.

Ao Grupo LIM-14 pelo incentivo e entusiasmo no dia a dia como também nas reuniões científicas. Em especial, sou grato ao Rodrigo Albergaria Réssio por sua amizade, apoio e por ser o responsável pela minha indicação ao LIM 07. Gostaria também de agradecer a Cinthya dos Santos Cirqueira pelo companheirismo, apoio e tolerância.

Ao serviço de sequenciamento multiusuário do LEMB e do LIM-56, Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Prof. Dr. Alberto Duarte, os alunos Juliana Velasco, Carla Braconi, Danielle Silva, Caio Freire e Karen Brunialti pela ajuda nos sequenciamentos.

Aos amigos do IMT, Dr^a Cristina Oliveira, Dr^a Camila Malta Romano, Rodrigo Melin Zerbinatti, Michele Padovan, Luiz Nali, Paulo Urbano, Cristiane Centrone, Cris Nakhle, Fabiana Cordeiro de Araújo, Thiago Ferreira de Araújo, Clarice Lemos, Monica Alvorada e Michele Gouvêa pela ajuda e receptividade ao longo desses anos.

Aos meus amigos e companheiros do colégio e faculdade pelo apoio à busca dos meus sonhos.

Aos pacientes e doadores que participaram desta pesquisa.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

A FAPESP, CNPq, CAPES e Fundação Família Alves de Queiróz pelo apoio financeiro.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Farmacogenética	2
1.2 Azatioprina	3
1.3 Mecanismo de Ação	4
1.4 Tiopurina S-metiltransferase (TPMT)	7
1.5 Hepatite Autoimune (HAI).....	14
1.5.1 Tratamento de HAI	16
1.6 Transplante renal	17
1.6.1 Imunossupressão pós-transplante renal	18
1.6.2 Corticóides	18
1.6.3 Inibidores da Calcineurina	19
1.6.4 Ácido Micofenólico	21
1.6.5 Uso da azatioprina no HCFMUSP	22
1.7 Custos para a genotipagem da TPMT	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3 CASUÍSTICA.....	26
3.1 Critérios de inclusão	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Desenho de Iniciadores.....	30
4.2 ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System)	32
4.3 Purificação do fragmento de PCR	36
4.4 Eletroforese	36
4.5 Sequenciamento	37
4.6 Análises estatísticas.....	39
4.6.1 Cálculo da equação de Hardy-Weinberg e frequência gênica ..	40

5 RESULTADOS	41
5.1 Avaliação da extração de DNA genômico.....	41
5.2 Avaliação do ARMS-PCR.....	42
5.3 Sequenciamento	43
5.4 Comparação de custos das reações de genotipagem (<i>ARMS-PCR versus Sequenciamento de DNA</i>).....	48
5.4.1 Custos de exames de rotina em pacientes HC-FMUSP	49
5.5- Casos genotipados do grupo Controles.....	50
5.6 Casos Genotipados do Grupo de Hepatite autoimune	53
5.7 Casos Genotipados do Grupo de Transplante renal	58
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÃO.....	70
8 REFERÊNCIAS	71

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

µL	microlitro
µm	micrômetro
6-me-thio-IMP	do inglês <i>S-methyl-thioinosine 5'-monophosphate</i> ou S-metilinosina 5' monofosfato
6-MMP	6-metilmercaptopurina
6-MP	6-mercaptopurina
6p22.3	braço curto do 6º cromossomo na 22ª banda e 3ª sub-banda
6-TG	6-tioguanina
6-TGN	nucleosídeos de 6- tioguanina
A	adenina
A719G	substituição no 719º nucleotídeo de A para G
ADRs	do inglês <i>adverse drug reactions</i> ou reações adversas às drogas
Ala	alanina
ALT	alanina aminotransferase
Ala>Pro	substituição de uma alanina por uma prolina
Ala>Thr	substituição de uma alanina por uma treonina
ANA	anticorpo antinuclear
Anti-LKMA	do inglês <i>liver/kidney microsomal antibody type 1</i> ou anticorpo anti-microsossômico fígado/rim 1
AST	aspartato aminotransferase
AZA	azatioprina
C	citosina

CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Classe I B8	classe I do HLA e antígeno tipo B8
Classe II DR3	classe II do HLA e antígeno tipo DR3
Classe II DR52A	classe II do HLA e antígeno tipo DR52A
cm	centímetro
Cys	cisteína
dGS	5'trifosfato desoxi-6-tioguanosina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAg	DNA genômico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
Et-Br	brometo de etídio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fase G1	fase durante a interfase do ciclo celular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FK506	tacrolimus
G	guanina
g	unidade de medida da força centrífuga relativa
g/dia	grama por dia
G0	fase de estado de dormência do ciclo celular

G238C	substituição no 238º nucleotídeo de G para C
G460A	substituição no 460º nucleotídeo de G para A
GMPS	guanosina monofosfato sintase
GST	glutathione S-transferase
LIM	Laboratório de investigação médica
HAI	hepatite auto imune
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da FMUSP
HGPRT	hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HLA	do inglês <i>human leukocyte antigen</i> ou antígeno leucocitário humano
HLA-DR4	antígeno DR4 do HLA
HLA-DR13	antígeno DR13 do HLA
IBD	do inglês <i>inflammatory bowel disease</i> ou doença inflamatória do intestino
IMPDH	ionosina monofosfato dehidrogenase
Kb	quilobase
Kda	quilodalton
M	molaridade ou concentração molar
mg	miligrama
mg/dia	miligrama por dia
mg/kg	miligrama por quilograma de peso corporal
mg/kg/dia	miligrama por quilograma de peso corporal por dia
MgCl ₂	cloreto de magnésio

MALDI-TOF	do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry</i>
MilliQ	água deionizada e purificada pela Millipore©
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	micromolar
MMF	micofenolato mofetil
MP	mercaptopurina
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
pb	par de base
PDNS	síntese <i>de novo</i> de purinas
pmol	picomol
pmol/8x10 ⁸ RBC	picomol por 8x10 ⁸ células vermelhas no sangue
Pro	prolina
Q ₁ -Q ₃	intervalo interquartil
Rac 1	proteína reguladora de processos celulares
RBC	células vermelhas no sangue
RNA	ácido ribonucléico
S	fase de síntese do ciclo celular
SMA	antimúsculo liso

SNPs	do inglês <i>single-nucleotide polymorphisms</i> ou polimorfismos de nucleotídeo único
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	timina
TBE	tris borato EDTA
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TDM	do inglês <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> ou Monitorização terapêutica de fármacos
TG	tioguanina
TGMP	6-tioguanosina 5'-monofosfato
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica
Thr	treonina
tITP	tiinosina trifosfato
tITPase	tiinosina trifosfatase
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR57	receptor tipo 57 do fator de necrose tumoral
TPMT	tiopurina S-metiltransferase
TRAIL	ligante indutor de apoptose realcionada ao TNF
TXA	transplantado renal em uso de AZA
Tyr	tirosina
Tyr>Cys	substituição de uma tirosina por uma cisteína

U	unidade
UV-Vis	espectroscopia no ultravioleta visível
V/cm	Volt por centímetro
XDH	forma desidrogenase da enzima xantina
α 4-integrina	receptor de membrana em leucócitos

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismo de ação de drogas tiopurínicas.	7
Figura 2 - Comparação das estruturas moleculares da proteína TPMT*1 (selvagem) e TPMT*2 (alelo variante) ⁽³⁰⁻³²⁾	10
Figura 3 - Ilustração do alelo selvagem e os principais alelos variantes do gene da TPMT	12
Figura 4. (A) Diagrama esquemático dos iniciadores do gene da TPMT na ARMS-PCR. (B) Representação gráfica dos possíveis genótipos da TPMT em gel de agarose.	34
Figura 5 - Extração de DNA genômico em gel de agarose 1,5%.	41
Figura 6 - PCR-ARMS em gel de agarose 2%.	43
Figura 7 - Eletroferogramas localizados no exon 5.	44
Figura 8 - Eletroferogramas localizados no exon 7 e no exon 10.	45
Figura 9 - Eletroferogramas localizados no exon 10.	46
Figura 10 - Eletroferogramas localizados no exon 7 e no exon 10.	47

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Correlação dos níveis de 6-TGN com a dose de AZA/peso (1,49 mg/kg/dia $\pm$ 1,09) no grupo HAI (p=0,314).....	55
Gráfico 2 - Associação das medianas dos níveis de 6-TGN com os genótipos selvagens e mutados no grupo HAI (**p<0,001).	56
Gráfico 3 - Correlação dos níveis de 6-MMP com a dose de AZA/peso (1,49 mg/kg/dia $\pm$ 1,09) no grupo HAI (p=0,659).....	57
Gráfico 4 - Associação das medianas dos níveis de 6-MMP com os genótipos selvagens e mutados no grupo HAI (*p=0,022).....	57
Gráfico 5 - Correlação dos níveis de 6-TGN com a dose de AZA/peso (1,69 $\pm$ 0,66 mg/kg/dia) no grupo TXA (p=0,992).....	60
Gráfico 6 - Associação das medianas dos níveis de 6-TGN com os genótipos selvagens e mutados no grupo TXA (**p=0,004).	61
Gráfico 7 - Correlação dos níveis de 6-MMP com a dose de AZA/peso (1,69 $\pm$ 0,66 mg/kg/dia) no grupo TXA(p=0,701).....	62
Gráfico 8 - Associação das medianas dos níveis de 6-MMP com os genótipos selvagens e mutados no grupo TXA (p=0,632).	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência dos alelos variantes do TPMT em diversas populações étnicas	13
Tabela 2 - Valores por reação para cada teste de ARMS-PCR.....	48
Tabela 3 - Valores por reação para cada teste de sequenciamento.....	49
Tabela 4 - Valores unitários e mensais dos testes realizados em rotina em transplantados renais no SUS e sistema particular do HC.	50
Tabela 5 - Associação dos genótipos e alelos com sexo e raça em doadores de sangue.	52
Tabela 6 - Associação dos genótipos e alelos com sexo e raça no grupo HAI.....	54
Tabela 7 - Associação dos genótipos e alelos com sexo e raça no grupo TXA.....	59

RESUMO

Nasser PD. *Frequência dos polimorfismos no gene da TPMT em doadores de sangue e pacientes em uso de azatioprina* [dissertação]. São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012

Drogas tiopurínicas como a Azatioprina (AZA) são amplamente utilizadas para diversos tipos de tratamento, como doenças auto-imunes, inflamatórias e até para pacientes submetidos a transplante de órgãos. Assim também, é capaz de causar efeitos adversos como toxicidade hepática e mais frequentemente a mielossupressão. Tiopurina S-metiltransferase (TPMT), uma enzima que catalisa a S-metilação dessas drogas, exibiu um polimorfismo genético em 10% de Caucasianos, sendo 1/300 indivíduos com completa deficiência. Pacientes intermediários ou completamente deficientes da atividade de TPMT estão em risco por excessiva toxicidade após receberem doses padrões de medicações tiopurínicas. O presente estudo visa a 1) pesquisar a frequência desses polimorfismos (TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B e TPMT*3C) em populações de doadores de sangue em Hospital terciário Universitário e em pacientes que utilizem a Azatioprina para o tratamento da hepatite autoimune e transplantado renal, 2) padronizar os métodos para a identificação dos polimorfismos e associá-los com os níveis dos metabólitos da AZA. Esses achados podem explicar os efeitos benéficos da Azatioprina e ter importante implicação para o desenho de novas terapias específicas em doenças autoimunes e em transplante de órgãos.

Descritores: Azatioprina; Imunossupressão; Farmacogenética;; Hepatite autoimune; transplantado de rim.

ABSTRACT

Nasser PD. *Frequency of polymorphisms in the TPMT gene in blood donors and patients using azathioprine* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012

Thiopurine drugs such as azathioprine (AZA) are widely used for many types of treatment: autoimmune and inflammatory diseases and for patients who had undergone organ transplantation. AZA is capable of causing adverse effects such as hepatotoxicity and myelosuppression. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT), which catalyzes the S-methylation of such drugs, exhibits a genetic polymorphism in 10% of Caucasians, and 1 / 300 individuals with complete deficiency. Patients who are intermediary or completely deficient in TPMT activity are at risk for excessive toxicity after receiving standard doses of thiopurine drugs. This recent study aims to 1) investigate the frequency of these polymorphisms (TPMT*2, TPMT*3A, TPMT * 3B and TPMT*3C) in blood donors from a tertiary University Hospital and in patients using azathioprine for the treatment of autoimmune hepatitis and transplanted kidney; 2) standardize the methods for the identification of polymorphisms and associate with levels metabolites of AZA. These findings may explain the beneficial effects of azathioprine and have important implications to design new therapies for autoimmune diseases and organ transplant.

Descriptors: Azathioprine; Immunosuppression; Pharmacogenetics; Autoimmune Hepatitis; Kidney transplantation.

1 - INTRODUÇÃO

O uso de um fármaco atualmente não possui uma resposta determinada para cada indivíduo. Invariavelmente, alguns pacientes respondem benéficamente como esperado ao fármaco, enquanto outros falham à resposta ou têm reações adversas às drogas (ADRs). Prescrição de drogas é, portanto, uma triagem empírica e um processo de tentativa e erro que, frequentemente, resulta em mudanças na escolha de uma droga e suas doses. Estudos que evidenciam as reações farmacológicas específicas ao tratamento demonstram cada vez mais a importância das ADRs e suas implicações nos cuidados da saúde^(1, 2).

Fármacos vêm sendo desenvolvidos, aprovados e rotulados com base na eficácia e segurança de doses na população em geral, sem considerar a variabilidade de respostas individuais^(1, 2). Entretanto, as respostas inesperadas pelas drogas resultam de um padrão rígido de dose que é usualmente recomendado, ignorando a característica individual na população.

Farmacocinética e farmacodinâmica são os dois componentes da relação dose-resposta de uma droga. A resposta pode ser o efeito terapêutico desejado ou não desejado (como as reações adversas). As variações individuais, na farmacocinética (influenciando relação dose-concentração) ou na farmacodinâmica (influenciando concentração-resposta) de uma droga, podem ser decorrentes da influência de genes na atividade funcional de enzimas metabolizadoras da droga⁽¹⁾.

Os polimorfismos genéticos da enzima tiopurina-metiltransferase (TPMT) representam um dos exemplos da farmacogenômica mais relevantes clinicamente⁽³⁾. Esta enzima metaboliza a azatioprina, medicação efetiva para imunossupressão e uma droga de baixo custo comparado aos outros imunossupressores mais novos.

1.1 - Farmacogenética

Como muito da atenção em farmacogenética tem por assim focado na farmacocinética, não surpreende haver monitoração em terapias e seus efeitos adversos. A grande parcela das enzimas que metabolizam os fármacos é expressa de formas genéticas variantes com propriedades funcionais alteradas.

Em termos de influências genéticas, a presença de alelos variantes influencia ou acaba excedendo outras covariáveis, como por exemplo idade, sexo, co-medicações ou até presença de doenças concomitantes assim como a disfunção hepática. Entretanto, o perfil genético (genótipo) de um indivíduo precisa estar em conjunto com resultados fenotípicos e com as intervenções farmacológicas clínicas para buscarmos resultados mais conclusivos. Portanto, fatores genéticos como a causa de variações em respostas das drogas têm sido cada vez mais observados^(1, 2).

1.2 - Azatioprina

Drogas imunossupressoras, como a Azatioprina (AZA), são efetivas em uma variedade de condições clínicas. São comumente utilizadas no tratamento de doenças crônicas inflamatórias, doenças auto-imunes, doenças malignas hematológicas e em transplantes renais. Neste último caso, teríamos ainda uma possível melhora da terapêutica imunossupressora com a combinação do alopurinol^(4, 5). AZA é uma purina análoga que age como antagonista para as purinas endógenas, que são componentes essenciais de DNA, RNA e algumas coenzimas. Inicialmente foi validada para tratamento de leucemia no final dos anos de 50, sendo introduzida nos anos 60 como imunossupressor em transplante de órgãos.

É sempre desejável que o tratamento resulte em mais benefícios e menos efeitos tóxicos. Na terapia com AZA, os pacientes apresentam variações nos níveis de nucleosídeos de 6- tioguanina (6-TGN), devido ao complexo metabolismo da droga e também ao polimorfismo genético da enzima TPMT, mesmo quando submetidos a uma dose convencional. Entre 9 e 25% dos pacientes em tratamento com AZA abandonam a terapia devido aos efeitos tóxicos⁽⁶⁾.

1.3 - Mecanismo de Ação

Os metabólitos de AZA e 6-mercaptopurina (6-MP) são convertidos para o principal metabólito ativo e dosável que caracteriza a ação imunossupressora, o 6-TGN, que é incorporado aos ácidos nucleicos, resultando em inibição dos nucleotídeos, na síntese de proteínas e, por último, na inibição de proliferação linfocitária⁽⁶⁾.

O mecanismo de ação da imunossupressão pelo metabólito 6-TGN está relacionado também com o aumento de apoptose dos Linfócitos T ativados. Na presença da ativação de células T, como ocorre em doenças imunologicamente dirigidas, 6-TGN bloqueia a expressão de TRAIL, TNFRS7 e α 4-integrina, efeitos que diminuem funcionalmente a inflamação como visto em pacientes com doença inflamatória intestinal (IBD)⁽⁷⁾.

Outro relato descreve o papel de AZA e seus metabólitos no controle da apoptose das células T por modulação de ativação de Rac1. Esses achados podem explicar os efeitos imunossupressores benéficos de azatioprina e ter implicações importantes para o desenho de novas terapias específicas em doenças autoimunes e transplante de órgãos⁽⁸⁾.

A AZA é convertida para a 6-MP através da glutathione transferase (GST) e/ou por reações não enzimáticas^(9, 10). A partir da conversão de 6-MP, a formação do 6-TGN inicia-se através da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT)⁽⁶⁾. Metabolismo de 6-MP por HGPRT

produz tionosina monofosfato (tIMP) e por fim a 6-tioguanosina 5'-monofosfato (TGMP), a qual é ainda metabolizada por uma série de quinases e redutases para formar 6-TGN e, conseqüentemente, 5'-trifosfato desoxi-6-tioguanosina (dGS).

Incorporação de dGS no DNA foi demonstrado por acionar o ciclo de apoptose por um processo que envolve as vias de reparo⁽¹¹⁾. Citotoxicidade está ativa na fase S do ciclo celular. Citotoxicidade de metabólitos da mercaptopurina (MP) em células leucêmicas foi encontrado por ser compatível com a morte mitótica causada por danos no DNA em função da incorporação de tioguanina (TG) como um nucleotídeo. As células leucêmicas tratadas com 6-MP demonstraram mudanças morfológicas no tamanho das células e núcleos. A partir desses achados, a morte das células mitóticas pode ser um mecanismo que ocorre através do metabólito de AZA ou 6-MP para a destruição das células do ciclo, nas fases G0 ou na prolongada G⁽¹²⁾.

O metabolismo de 6-MP para TGMP envolve duas enzimas adicionais, inosina monofosfato dehidrogenase (IMPDH) e guanossina monofosfato sintase (GMPS). Essas enzimas são relevantes por causa do metabólito intermediário tIMP, da via de AZA/6-MP, que pode agir também como um substrato para TPMT, levando à produção de S-metil-tionosina 5'-monofosfato (6-Me-Thio-IMP). O 6-Me-Thio-IMP é um forte inibidor da síntese *de novo* de purinas (PDNS)⁽¹³⁾.

Inibição de PDNS está bem estabelecido para alcançar imunossupressão e bloquear proliferação de vários tipos de linhagens de

linfócitos. Contudo, inibição significativa de PDNS por 6-Me-Thio-IMP pode contribuir para a ação citotóxica de AZA/6-MP⁽¹⁴⁾.

Uma das vias para inativação de tiopurinas é realizada através da xantina desidrogenase (XDH). Outra via concorrente e de grande importância é a S-metilação de 6-mercaptopurina (6-MP) para 6-metilmercaptopurina (6-MMP) através da TPMT, sendo 6-MMP um metabólito dosável, que em elevados níveis pode causar hepatotoxicidade^(6, 15, 16).

Esta via de metilação de 6-MP para 6-MMP representa o caminho predominante da inativação de tiopurinas em células hematopoiéticas, sendo a atividade da TPMT inversamente proporcional em relação aos níveis de 6-TGN produzidos ao fim da via imunossupressora. Portanto, pacientes que herdaram deficiência na TPMT acumulam concentrações excessivas dos nucleotídeos ativos TG em células do sangue quando tratados com doses convencionais dessas medicações⁽¹²⁾.

Figura 1 - Mecanismo de ação de drogas tiopurínicas.

AZA: Azatioprina, GST: glutathione s-transferase, 6MP: 6-mercaptopurina, HGPRT: Hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase, 6-MMP: 6 metil mercaptopurina, 6-Me-tIMP: 6-metil-tionosina 5'-monofosfato, TPMT: tiopurina metiltransferase, XDH: xantina desidrogenase, tIMP: tionosina monofosfato, IMPDH: inosina monofosfato dehidrogenase, tXMP: tioxantina monofosfato, GMPS: guanosina monofosfato sintetase, tGMP: tioguanina monofosfato, PK: fosfoquinase, 6-TGN: nucleotídeos de 6-tioguanina. Adaptado de Smith MA e cols ⁽¹⁷⁾.

1.4 - Tiopurina S-metiltransferase (TPMT)

A natureza hereditária da deficiência da TPMT em humanos foi inicialmente identificada por Weinshilboum e Sladek em 1980 no estudo de atividade da TPMT em células vermelhas do sangue (RBC)⁽¹⁸⁾. Em

meados dos anos 80, relataram-se diferenças na atividade da TPMT entre indivíduos, como um padrão de herança codominante autossômica. Quando indivíduos recebiam doses padrões de AZA com atividade baixa ou indetectável do TPMT, tinham concentrações elevadas de metabólitos ativos 6-TGN e mielossupressão induzida por droga^(19, 20). Entretanto, pacientes com alta atividade funcional de TPMT poderiam converter a maioria de 6-MP em 6-MMP com produção inadequada de 6-TGNs para eficácia terapêutica. Em um trabalho realizado por Chrzanowska e cols.⁽²¹⁾ foram medidas as concentrações de 6-TGN e 6-MMP em 27 pacientes transplantados renais recebendo doses de 100 ou 50 mg/dia de AZA, e 6 pacientes administrando alopurinol concomitantemente. Foram obtidos em 21 pacientes os valores dos níveis de 6-TGN e 6-MMP em uma mediana de 122 pmol / 8×10^8 RBCs e 280 pmol / 8×10^8 RBC, respectivamente. Nos pacientes que recebiam alopurinol, a mediana foi mais alta, com 363 pmol / 8×10^8 RBCs para o metabólito 6-TGN, obtendo-se então uma diferença significativa ($p=0,004$). Em adição, foi demonstrado que a evolução da atividade da TPMT correlaciona-se também com resultado a curto e longo tempo após um transplante renal⁽²²⁾.

Foi encontrado no trabalho de Heneghan e cols.⁽²³⁾ 26 pacientes com hepatite autoimune, recebendo somente AZA (dose média de 1,52 mg/kg/dia $\pm$ 0,11), níveis dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP de 152 pmol / 8×10^8 RBCs e 884 pmol / 8×10^8 RBC, respectivamente. E também, um segundo grupo de 26 pacientes recebendo AZA (dose média de

1,71mg/kg/dia $\pm$ 0,09) e prednisona (mediana de 5mg/dia), os níveis dos metabólitos para 6-TGN e 6-MMP foram de 157 pmol / 8×10^8 RBCs e 1034 pmol / 8×10^8 RBC. Demonstra-se algumas particularidades da relação dessas concentrações dos metabólitos (6-TGN e 6-MMP) entre as doenças como até uma suposta interferência com co-medicações.

No trabalho de Dubinsky e cols⁽²⁴⁾, foi determinada em 92 pacientes com doença inflamatória intestinal a alta correlação dos níveis de 6-TGN e a resposta clínica ($p < 0,0001$), mas não com outras variáveis, incluindo níveis de 6-MMP, dosagem da droga, sexo e co-medicações. A frequência da resposta terapêutica do metabólito 6-TGN foi de >235 pmol/ 8×10^8 RBCs ($p < 0,001$) e a hepatotoxicidade foi correlacionada com elevação dos níveis de 6-MMP (>5700 pmol/ 8×10^8 RBCs; $p < 0,05$). Pacientes heterozigotos para TPMT obtiveram níveis mais altos de 6-TGN ($p < 0,0001$). Com isso, a dosagem desses níveis tem sido utilizada atualmente até mesmo na rotina para monitoração de possíveis toxicidades⁽²⁵⁻²⁹⁾.

A ausência da TPMT em indivíduos com fenótipos alterados indica uma deficiência no mecanismo pós-transcricional, o que é consistente com os resultados de sistema de expressão dos cDNAs selvagens e mutantes. No estudo em leveduras, os alelos TPMT*2 e TPMT*3A apresentaram redução significativa dos níveis de proteína em comparação com o alelo selvagem TPMT*1. Esta diferenciação foi também evidente quando expressados em células de mamíferos COS-1. Estes resultados indicaram que mutações ocorridas em cDNAs tiveram

um efeito significativo sobre a degradação protéica. Portanto, enquanto com os alelos selvagens obteve-se uma meia-vida em média da TPMT de 18 horas, nos alelos mutados G238C e G460A obteve-se uma meia-vida em torno de 15 minutos e 6 horas respectivamente⁽³⁰⁻³²⁾.

Figura 2 - Comparação das estruturas moleculares da proteína TPMT*1 (selvagem) e TPMT*2 (alelo variante)⁽³⁰⁻³²⁾.

A TPMT foi parcialmente purificada e caracterizada em 1983. Foi codificada por um gene de 27 kilobases (kb) na região 6p22.3 do cromossomo humano e contém 10 exons, sendo que 8 deles codificam uma proteína de 28 KiloDaltons (kDa)⁽¹⁸⁾. Foram identificados 27 alelos variantes, sendo incluídos TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B e TPMT*3C, que

acometem de 80 a 95% dos casos de atividade enzimática intermediária ou baixa⁽³³⁾.

O primeiro alelo identificado, TPMT*2, contém uma troca nucleotídica (G238C), levando à substituição de uma prolina rígida para um flexível resíduo de alanina no códon 80 (Ala>Pro)⁽³⁴⁾. TPMT*3A, o mais comum alelo variante, responsável pela atividade baixa da TPMT em brancos, codifica uma proteína com dois polimorfismos (SNPs), G460A no exon 7 e A719G no exon 10, levando à substituição de um aminoácido no códon 154 (Ala>Thr) e no códon 240 (Tyr>Cys)⁽³⁰⁾. Estudos subsequentes estabeleceram proteínas TPMT*3B (G460A; Ala154YThr) e TPMT*3C (A719G; Tyr240YCys), tendo uma elevada taxa de proteólises quando expressos em células de mamíferos, consistente com baixos níveis da enzima em indivíduos que herdaram esses alelos^(30, 34, 35).

TPMT*1 (selvagem)

Alelos mutados mais prevalentes

Figura 3 - Ilustração do alelo selvagem e os principais alelos variantes do gene da TPMT

Baseado nas prevalências dos estudos genótipos-fenótipos sobre a população do mundo inteiro, ensaios para o diagnóstico molecular em deficiência da TPMT tem focado sobre os alelos mutantes TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B e TPMT*3C. O alto grau de concordância foi demonstrado entre a correlação dos genótipos e fenótipos da TPMT em caucasianos ⁽³⁶⁾. Pacientes heterozigotos têm atividade intermediária e pacientes homozigotos têm baixa atividade, embora as variabilidades

possam ser vistas entre os grupos mencionados⁽³⁷⁾. A frequência dos alelos variantes predominantes está descrita na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Frequência dos alelos variantes do TPMT em diversas populações étnicas

Grupo Étnico	Nº de alelos	*2	*3A	*3C
Caucasiano americano	282	0.2	3.2	0.2
Caucasiano inglês	398	0.5	4.5	0.3
Caucasiano francês	382	0.5	5.7	0.8
Caucasiano alemão	2428	0.5	8.6	0.8
Afro-americano	248	0.4	0	2.4
Ganês	434	0	0	7.6
Chinês	384	0	0	2.3
Japonês	1044	0	0	1.6
Brasileiro	408	2.2	1.5	1

Fonte: Adaptado de Sahasranaman S. e cols.⁽³⁸⁾

No Brasil, há três estudos existentes na literatura sobre as frequências dos polimorfismos no gene da TPMT. Entretanto, em

diferentes populações. O primeiro trabalho incluído foi direcionado a 306 indivíduos saudáveis. Foi analisada a frequência dos polimorfismos no grupo de estudo com ancestralidade e raça autodeclarada. Obtiveram uma prevalência no alelo variante TPMT *3C (2,12%), realizado no Instituto do Câncer do Rio de Janeiro no ano de 2003⁽³⁹⁾. O segundo trabalho foi realizado em um grupo de 202 pacientes com diagnósticos ausentes para leucemia e mais 2 pacientes leucêmicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Nesse estudo, obtiveram uma prevalência no alelo variante TPMT*2 de 2,2%⁽⁴⁰⁾ (citado na Tabela 1). No mais recente estudo, em uma população de 116 crianças e adolescentes com leucemia linfoblástica aguda (ALL), obteve-se um resultado prevalente no alelo variante TPMT*3A de 3,9%. Além disso, buscaram neste estudo correlacionar as mutações com dados clínicos e laboratoriais durante o tratamento quimioterápico nesses pacientes⁽⁴¹⁾.

1.5 - Hepatite Autoimune (HAI)

A HAI é um distúrbio inflamatório crônico do fígado de causa desconhecida. É caracterizada pela presença de autoanticorpos, altos níveis de imunoglobulinas séricas e frequente associação a outras doenças autoimunes.

Acredita-se que seja causada por reações imunológicas contra os hepatócitos normais. A doença parece ocorrer entre indivíduos geneticamente predispostos à exposição a agentes ambientais nocivos

ainda não identificados, acionando um processo imunológico direcionado aos antígenos hepáticos. Em pacientes com HAI, associações primárias foram encontradas nos *loci* do antígeno leucocitário humano (HLA) classe I B8 e classes II DR3 e DR52a. Entre os asiáticos, a hepatite autoimune está associada ao HLA-DR4, uma associação menos comum entre os pacientes ocidentais ⁽⁴²⁾. No Brasil, há uma associação também menos comum com o HLA-DR13 em pacientes com hepatite auto imune do tipo 1⁽⁴³⁾.

A doença é mais comum em mulheres do que em homens e tipicamente tem seu início ou na infância e começo da idade adulta (entre as idades de 15 e 25) ou em torno do período da menopausa (entre as idades de 45 e 60). Dois tipos de HAI têm sido descritas: tipo 1 (ou clássica) e tipo 2. Ambas as formas possuem características clínicas e bioquímicas séricas similares. A hepatite imunológica tipo 2 é encontrada na Europa e tipicamente afeta mulheres jovens ou meninas.

Geralmente é progressiva e leva à doença hepática terminal se não tratada com imunossupressores. Em alguns pacientes, ela é detectada antes do início dos sintomas e da icterícia se os níveis séricos elevados de aminotransferase forem encontrados em um exame médico de rotina. Talvez as principais características da doença sejam as elevações acentuadas nos níveis séricos de gamaglobulina, especificamente nos níveis de imunoglobulina G, acompanhados por autoanticorpos direcionados a constituintes celulares que não são órgão-específicos.

A presença de autoanticorpos séricos representa a base para o diagnóstico dos dois tipos de HAI: a HAI tipo 1 é caracterizada pela detecção de anticorpos antinucleares (ANA), antimúsculo liso (SMA), antiactina e antirreceptores de asialoglicoproteína. A HAI tipo 2 é caracterizada pela detecção de anticorpos antimicrosômicos fígado/rim 1 (anti-LKM1) e anticorpos anticitosol hepático 1 e pela ausência de ANA ou SMA. Para se enquadrar nos critérios diagnósticos de hepatite autoimune, esses anticorpos devem estar presentes em titulações de pelo menos 1:80 em adultos e 1:20 em crianças. Os espécimes de biópsia hepática em pacientes com HAI exibem características típicas de hepatite crônica (42), (44, 45).

1.5.1 - Tratamento de HAI

A rápida resposta clínica a terapia de corticosteróide é típica da HAI em termos de resolução dos sintomas clínicos e melhoras nas elevações séricas de aminotransferases e bilirrubinas. Em casos típicos, a prednisona deve ser iniciada em um dose de 20 a 30 mg/dia. Uma resposta bioquímica com queda nos níveis séricos de aminotransferases até a normalidade ou próximo dos limites normais deve ocorrer entre 1 a 3 meses. Para prevenir efeitos colaterais de terapia de longo prazo com prednisona, a AZA, 50 a 100 mg, pode ser combinada com prednisona, iniciando na mesma ocasião ou adicionada posteriormente. No paciente típico, a prednisona pode ser descontinuada lentamente até um esquema

de manutenção de 5 a 10 mg/dia combinada com AZA, 50 a 150 mg/dia. Em alguns pacientes, a AZA isoladamente, em uma dose de 2 mg/kg de peso corporal/dia, pode ser usada em vez da prednisona como terapia de manutenção. Os efeitos colaterais de longo prazo da AZA (imunossupressão, supressão de medula óssea e risco de câncer) devem ser considerados^(23, 42, 44).

1.6 - Transplante renal

O transplante renal bem sucedido proporciona ao paciente uma melhor qualidade de vida. Os pacientes transplantados ficam livres das restrições de líquido e potássio. Além disso, quando comparado com a hemodiálise, o transplante renal também melhora a sobrevida a longo prazo de pacientes tanto diabéticos quanto não diabéticos.

Muitos fatores contribuíram para os extraordinários avanços observados nos transplantes no decorrer dos últimos anos, os progressos na tipagem tecidual e na reação cruzada e os melhores agentes imunossupressores, bem como o reconhecimento de que a rejeição e a infecção estão estritamente ligadas, exigindo a prescrição concomitante de agentes anti-infecciosos para tornar o esquema imunossupressor seguro⁽⁴²⁾.

1.6.1 - Imunossupressão pós-transplante renal

Durante mais de 25 anos, a imunossupressão em transplantados renais consistiu somente de AZA e corticóides, ficando conhecida como imunossupressão clássica. No final dos anos 70. O índice de sucesso dos transplantes renais era pouco maior que 50% no primeiro ano após o transplante. O surgimento de novos fármacos e novos protocolos permitiu o aumento da sobrevida desses pacientes e, no final dos anos 90, esse índice já era de 93% nos três primeiros anos após o transplante ⁽⁴⁶⁾.

1.6.2 - Corticóides

Os corticóides são largamente utilizados nas terapias imunossupressoras, em especial a prednisona, importantes não só no tratamento da rejeição aguda, mas também na manutenção do transplante. Esses medicamentos atuam como anti-inflamatórios e imunomoduladores, estabilizam as membranas lisossomais, diminuem a síntese de prostaglandinas e promovem a diminuição da liberação de histamina e bradicinina, reduzindo assim a permeabilidade capilar. Além disso, diminuem a atividade de monócitos e macrófagos e a quantidade de linfócitos T CD4+ circulantes. Outro efeito notável dos corticóides é a influência na transcrição de alguns genes produtores de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas, interferons e fatores de necrose tumorais⁽⁴⁷⁾.

Inicialmente, os corticóides eram administrados em doses altas, entre 2 e 4 mg/kg de peso, com grandes reações dose dependentes, sendo as principais a diabetogênese, a perda óssea, a retenção de líquidos com hipocalcemia e a hipertensão, além de psicose e glaucoma. No entanto, no início dos anos 80 foram realizados estudos que compararam a evolução do transplante em pacientes que usavam altas e baixas doses do fármaco. Conclui-se que a mortalidade e o número de episódios de rejeição eram similares em ambos os grupos, sendo que no grupo que tomava baixas doses havia significativa redução das reações adversas. Hoje em dia, a terapia é iniciada com doses de 2 mg/kg/dia, sendo reduzidas até 0,5 mg/kg/dia durante a manutenção ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

1.6.3 - Inibidores da Calcineurina

Os fármacos dessa classe, a ciclosporina e o tacrolimus, se ligam a proteínas intracelulares conhecidas como imunofilinas, inibindo a ativação dos linfócitos T. Em situações de normalidade, esses linfócitos entram em contato com o órgão recebido e a sinalização cálcio-dependente é iniciada, resultando na ativação da calcineurina fosfatase. A ativação dessa enzima resulta em liberação de interferons, fatores de necrose tumorais e citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas ⁽⁵¹⁾.

Os inibidores da calcineurina são metabolizados pelas enzimas do citocromo P4502A4 presentes no fígado e intestino. As primeiras formulações de ciclosporina apresentavam baixa absorção

gastrointestinal e grande variação de níveis plasmáticos entre pacientes. Estudos recentes com novas formulações indicam que o valor que melhor se correlaciona com a eficácia clínica da ciclosporina é a concentração plasmática obtida após duas horas de ingestão de dose ⁽⁵²⁾. Apesar dos primeiros trabalhos com a ciclosporina terem avaliado seu uso individual, foi na chamada tríplice terapia, em associação com a AZA e corticóides, que foram obtidos os melhores resultados em transplantados de rim ^(53, 54).

O uso da ciclosporina está relacionado a várias reações adversas, como nefrotoxicidade e hipertensão. A nefrotoxicidade é reversível após a suspensão do medicamento e é relativamente comum. Nos transplantados renais sob uso desse medicamento, essa reação deve ser especialmente observada ⁽⁵⁵⁾. Outro inibidor da calcineurina que surgiu posteriormente, o tacrolimus (FK506), foi introduzido com a promessa de melhora de resultados clínicos. Porém, o tacrolimus causava reações indesejadas semelhantes, como a nefrotoxicidade, quando comparado com pacientes que utilizavam a ciclosporina. Contudo, a ciclosporina ainda provocaria mais hipertensão do que o tacrolimus ^(56, 57).

Um estudo multicêntrico europeu comparou a taxa de rejeição nas primeiras semanas confirmada por biópsia em grupos que utilizavam dois diferentes inibidores da calcineurina, tacrolimus e ciclosporina. A rejeição aguda foi consideravelmente menor em 287 pacientes que usavam tacrolimus (19,6%) em relação à encontrada em 273 pacientes que usavam ciclosporina (37,3%). No entanto, não houve diferença entre os

grupos quando se avaliou a sobrevida dos pacientes e a incidência de efeitos adversos ao longo do tempo ⁽⁵⁸⁾.

1.6.4 - Ácido Micofenólico

O micofenolato mofetil (MMF) foi aprovado pelo FDA em 1995. Posteriormente, surgiu o micofenolato de sódio. Os dois medicamentos são metabolizados no fígado e convertidos em ácido micofenólico. Este composto inibe a enzima IMPDH, que apresenta alta atividade nos leucócitos, inibindo a PDNS, compostos essenciais para a síntese de DNA e RNA e proliferação celular. Enquanto os leucócitos só possuem essa rota para a produção das purinas, outras células são capazes de utilizar uma via alternativa; por esse motivo os linfócitos são mais afetados pelo bloqueio ⁽⁵⁹⁾.

Estudos avaliaram a eficácia clínica do MMF comparando com dois regimes terapêuticos, com 2 e 3 g/dia, e um terceiro grupo que utilizava AZA. A ocorrência de rejeição no grupo que tomava 3 g/dia de MMF foi de 15,8%, contra 19,7% no grupo que tomava 2g/dia e 35,5% no grupo que usava AZA. No entanto, um ano após o transplante não houve diferença significativa nas perdas do enxerto entre os grupos. A imunossupressão com doses maiores de MMF foi significativamente melhor, mas a alta incidência de reações adversas resultaram em padronização de 2 g/dia. As reações gastrointestinais, como dor abdominal e diarreia, foram os relatos mais frequentes ⁽⁶⁰⁾. Outras reações adversas, como herpes

simples, candidíase e infecções mais severas causadas por citomegalovírus também podem ser mais comuns em comparação a grupos que usam AZA ou placebo ⁽⁶¹⁻⁶³⁾.

Sollinger e cols. ⁽⁶⁴⁾ também demonstrou menor incidência de rejeição aguda nos grupos que usavam MMF 2 g/dia (31,1%) e 3 g/dia (31,3%) em relação aos que usavam AZA (47,6%) e, quando houve rejeição, estas foram mais brandas. Mas, novamente, após um ano do transplante, não houve diferenças significativas nas perdas dos enxertos e na sobrevivência entre os grupos, resultados também observados em outros trabalhos ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.

1.6.5 - Uso da azatioprina no HCFMUSP

A AZA é comercializada no varejo na forma de comprimidos de 50 mg, sendo o Imuran[®] (Glaxo SmithKline) o grupo de referência. O medicamento genérico não é encontrado no varejo. No entanto, há medicamentos similares, como o Imunen[®] (Cristália) e o Imunussuprex[®] (Sigma Pharma). No ano de 2009, na divisão da farmácia do HCFMUSP, a AZA foi fornecida para 2423 pacientes de diversas clínicas. Entre elas estão a Gastroenterologia, Unidade de Transplante renal, Hematologia, Reumatologia, Neurologia e Dermatologia ⁽⁶³⁾.

Deve-se considerar que o Brasil possui o maior sistema público de transplantes do mundo e que em 2005 o Sistema Único de Saúde realizou 11.095 transplantes ⁽⁶⁸⁾, utilizando-se em média a dose de 150 mg/dia de

AZA. Estudos fármacos e toxicocinéticos de imunossupressores são de fundamental importância para garantir o sucesso terapêutico, a ausência de rejeição e evitar os efeitos tóxicos ⁽⁶⁹⁾.

Com relação à imunossupressão pós-transplante induzida, devido às doenças autoimunes e hematológicas pela administração de AZA, é importante reconhecer que o grau de conhecimento atual necessita ser aprimorado por meio de estudos farmacogenéticos da atividade enzimática da TPMT da monitorização terapêutica e estudos farmacoeconômicos.

1.7 - Custos para a genotipagem da TPMT

A necessidade de conhecimento ainda permanece em um grande número de instituições brasileiras, aumentando a incorporação tecnológica e o avanço da medicina. Entretanto os altos custos estimados, bem como os desperdícios gerados pelo uso ineficiente dos recursos necessários para produzir o resultado final, continuam sendo obstáculos para implementação de técnicas novas. Considerando o constante avanço científico relacionado à área da saúde, a exigência de gerenciamento desses recursos tem sido cada vez maior ^(70, 71).

O exame farmacogenético pode significar um grande benefício em termo de custos. Uma demonstração em custo efetividade ou custo eficácia pode ser uma direção válida para seu uso em laboratórios de rotina.

No tratamento com AZA em transplantados de rim do HC-FMUSP, são realizados exames semanalmente de rotina como: hemograma, creatinina, transaminases (TGO e TGP) e exame de urina tipo 1 durante o período pós-transplante em torno de 3 a 6 meses. Por esta razão, o exame feito para detectar os polimorfismos, no começo do tratamento, poderia substituir uma fração desses exames semanais, sendo assim benéficamente não somente na diminuição de gastos como principalmente na especificidade do diagnóstico. Outros estudos utilizam a genotipagem como suporte aos exames da atividade e dos metabólitos da TPMT^(63, 72).

2. - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Verificar a frequência dos polimorfismos da TPMT em população de doadores de sangue e em pacientes em tratamento com azatioprina no Departamento de Gastroenterologia e Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

2.2 - Objetivos Específicos

1. Padronização e validação do método utilizado na identificação dos polimorfismos.
2. Associar os polimorfismos com a dosagem de metabólitos da azatioprina (6-TGN e 6-MMP).

3 - CASUÍSTICA

População do Estudo: 215 voluntários recrutados no Hemocentro HC-FMUSP, 136 portadores de hepatite autoimune (HAI) e 115 transplantados renais (TXA) no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

3.1 - Critérios de inclusão

População controle: Doadores de sangue admitidos pelos critérios utilizados pela Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, de ambos os sexos, com idade entre 18 a 60 anos.

Pacientes: portadores de hepatite auto-imune e transplantados renais tratados com azatioprina admitidos pelos critérios utilizados no HC-FMUSP.

Após a explicação e obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do paciente e dos indivíduos controle, foi realizada a coleta de sangue em tubo contendo EDTA. O sangue foi centrifugado, separado em creme leucocitário e plasma e estocados em freezer a -70°C até a realização da extração de DNA.

Os doadores de sangue e os pacientes portadores das doenças foram submetidos a uma breve entrevista, com o objetivo de obter informações como sexo, idade, raça e descendência, presença de doenças e co-morbidades.

O projeto “Frequência dos polimorfismos no gene da TPMT em pacientes doadores de sangue e em pacientes em uso de Azatioprina no Brasil” foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP sob Nº 0316/09.

Considerando o avanço técnico-científico recente e suas aplicações na pesquisa em genética humana, este projeto foi realizado dentro das definições da resolução 340/04 de farmacogenética.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Processamento das amostras:

DNA genômico foi isolado de leucócitos com o *kit* QIAmp (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com instruções do fabricante. Foram adicionados 200 microlitros de creme leucocitário equilibrado em temperatura ambiente a um microtubo de 1,5 mililitros contendo 20 microlitros de proteinase K e 200 microlitros de buffer AL. Essa solução foi agitada em Vortex (Vortexgene, USA) por 15 segundos e incubada a 56° C por 10 minutos. Após breve centrifugação, foram adicionado 200 microlitros de etanol 100% à amostra, misturando-se por agitação. Novamente, após breve centrifugação, essa solução foi transferida para uma coluna contendo sílica e foi centrifugada por 1 min a 5.900 g (centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R, Alemanha). O tubo coletor foi descartado em local apropriado. A coluna contendo DNA genômico fixado foi transferida para um novo tubo coletor de 2mL, adicionando-se 500 microlitros de *buffer* AW1 e centrifugando a 5.900 g novamente por 1 min. Foram adicionados 500 microlitros de *buffer* AW2 e então centrifugados a 11.000 g por 3 min. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml estéril e foram adicionados 200 microlitros de *buffer* AE. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 5.900 g, também por 1 min. O resultado da extração de DNA das amostras foi analisado por eletroforese em gel de agarose e a quantificação das amostras foi realizada através de comparação da intensidade das bandas

com o marcador de peso molecular “DNA Low mass ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA) corados com brometo de etídio.

Para a dosagem dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP, as amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacutainer contendo EDTA e rapidamente centrifugadas a 1300 g durante 10 minutos a 4°C. Plasma foi decantado. Leucócitos e plaquetas da camada superior aos eritrócitos foram removidos. 400 uL de eritrócitos lavados foram transferidos para um tubo e 100 uL de solução DTT a 3 mg/ml foram adicionados. A totalidade foi desproteinizada e centrifugada a 13.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e injetado no sistema CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Detecção dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP foi realizada em 342 nm (UV-Vis) .

O cromatógrafo utilizado (*Shimadzu Co., Kioto, Japão*) é composto de: 1 desgaseificador (DGU-2 A), duas bombas (LC-10AD), controlador (SCL-10 A), forno de coluna (CTO-10 A), injetor automático (SIL-10A), detector de fluorescência (RF-535) e integrador (CR7A PLUS). Foi utilizada uma coluna de fase reversa Inertsil ODS-3 (partícula 5 um; 150 x 4,6 mm) da Alltech (*Associates, Inc, USA*). Para a continuação das dosagens dos metabólitos foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga Eppendorf, Centrífuga Eppendorf Refrigerada, Banho-Maria Seco (*Nova Ética*), contador hematológico (*Sysmex XT-2001*) e Modular (*Roche*). Todos esses procedimentos foram realizados no Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP (LIM-03 da Patologia Clínica FMUSP).

4.1 - Desenho de Iniciadores

Foi utilizado um conjunto de iniciadores que amplificassem seletivamente as regiões do gene TPMT*2 (exon 5), TPMT*3A (exon 7 e 10) , TPMT*3B (exon 7) e TPMT*3C (exon 10) utilizando-se iniciadores para amplificação de um segmento tanto para o PCR convencional quanto para o sequenciamento:

Iniciador direto 5' GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTG 3' }
 Iniciador reverso 5' TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC 3' } Exon 5

Fragmento constituído de 361 pb^(73, 74);

Iniciador direto 5' GGG ACG CTG CTC ATC TTC T' }
 Iniciador reverso 5' GCC TTA CAC CCA GGT CTC TG 3' } Exon 7

Fragmento constituído de 338 pb^(73, 74);

Iniciador direto 5' ATTTT TAGTAGAGACAGAGTTTCACCATCT 3' }
 Iniciador reverso 5' TCC TCA AAA ACA TGT CAG TGT G 3' } Exon 10

Fragmento constituído de 534 pb^(73, 74);

A sequência completa do gene da TPMT encontra-se no GeneBank (National Center of Biotechnology Information, [http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ gene/ 7172](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7172)) sob o código NC 0000006.

A reação foi realizada no termociclador *Mastercycler Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com os devidos reagentes e parâmetros para ciclagem^(73, 74):

1,2 U de *Taq platinum* (invitrogen, Carlsbad, EUA);

5 pmolar de iniciadores direto e reverso

5 pmolar de dNTP

1,5 mM de $MgCl_2$;

Tampão 1X;

80 a 100 ng de DNAg

Água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 50 uL

Condições de ciclagem:

95°C - 5 min. Pré aquecimento da enzima;

95° C – 30''

59° C (para o exon 5 e 7) e 55°C (para exon 10) – 30''

72° C – 40''

} 39 ciclos

Após o fim dos 39 ciclos, os produtos de PCR foram estocados a -20°C.

4.2 - ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*)

Foi utilizado um conjunto de iniciadores em um sistema *multiplex* que amplificassem seletivamente as regiões do gene TPMT*2 (exon 5), TPMT*3A (exon 7 e exon 10) TPMT*3B (exon 7) e TPMT*3C (exon 10). Para cada amostra, foram utilizados dois subconjuntos. Para aumentar a especificidade nos alelos mutados, foi inserido um nucleotídeo não complementar na penúltima base dos iniciadores. No primeiro subconjunto, foi aplicado (Figura 4):

Iniciador direto para o exon 5 (consenso)

5' ATC TGC TTT CCT GCA TGT TCT TTG AAA CCC 3'

Iniciador reverso para o exon 5 (selvagem)

5' CAC ACC AAC TAC ACT GTG TCC CCG GTC TCC 3'

Fragmento constituído de 194 pb ;

Iniciador reverso para o exon 7 (consenso)

5' AGG TCT CTG TAG TCA AAT CCT ATA CT 3'

Iniciador direto para o exon 7 (selvagem)

5' ATT TGA CAT GAT TTG GGA TAG AGG TG 3'

Fragmento constituído de 245 pb;

Iniciador direto para o exon 10 (consenso)

5' ATT TTT AGT AGA GAC AGA GTT TCA CCA TCT 3'

Iniciador reverso para o exon 10 (mutado)

5' TAT GTC TCA TTT ACT TTT CTG TAA GTA GTC 3'

Fragmento constituído de 325 bp ⁽⁷⁴⁾;

1º

subconjunto

No segundo subconjunto, utilizamos iniciadores para amplificação dos seguintes segmentos (Figura 4):

Iniciador direto para o exon 5 (consenso)

5' ATC TGC TTT CCT GCA TGT TCT TTG AAA CCC 3'

Iniciador reverso para o exon 5 (mutado)

5' CAC ACC AAC TAC ACT GTG TCC CCG GTC TCG 3'

Fragmento constituído de 194 bp;

Iniciador reverso para o exon 7 (consenso)

5' AGG TCT CTG TAG TCA AAT CCT ATA CT 3'

Iniciador direto para o exon 7 (mutado)

5' ATT TGA CAT GAT TTG GGA TAG AGG TA 3'

Fragmento constituído de 245 bp;

Iniciador direto para o exon 10 (consenso)

5' ATT TTT AGT AGA GAC AGA GTT TCA CCA TCT 3'

Iniciador reverso para o exon 10 (selvagem)

5' TAT GTC TCA TTT ACT TTT CTG TAA GTA GTT 3'

Fragmento constituído de 325 bp ^(41, 74) .

**2º
subconjunto**

Figura 4. (A) Diagrama esquemático dos iniciadores do gene da TPMT na ARMS-PCR. (B) Representação gráfica dos possíveis genótipos da TPMT em gel de agarose.

Legenda: R1: reação 1, R2: reação 2, M: marcador *DNA ladder* de 100 pb e C+: controle positivo. Adaptado e modificado de Roberts e cols.⁽⁷⁴⁾.

Para os dois subconjuntos, foi utilizado o controle positivo B2-microglobulina com os seguintes iniciadores:

direto 5' TGTAACACTTGGTGCCTGATATAGCTTGA 3'	} 1º e 2º subconjunto
reverso 5'CATCAGTATCTCAGCAGGTGCCACTAATCT 3'	

Fragmento constituído de 574 bp^(41, 74).

A reação foi feita no termociclador *Mastercycler Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com os devidos reagentes e parâmetros de ciclagem para cada subconjunto^(41, 74):

2 U de *Taq platinum* (invitrogen, Carlsbad, EUA);

10 pmolar de iniciadores direto e reverso

10 pmolar de dNTP

5 mM de MgCl₂;

Tampão 1X;

100 a 125 ng de DNAg

Água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 50 uL

Condições de ciclagem:

95°C - 5 min. Pré aquecimento da enzima;

95° C – 30''	} 30 ciclos
60° C – 30''	
72° C – 2'	

4.3 - Purificação do fragmento de PCR

Foi utilizado o *kit QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Valencia, CA). Foram adicionados ao produto de PCR 5 volumes da solução PB para cada volume de reação de PCR. Essa mistura foi colocada em uma coluna à base de sílica e foi centrifugada por 1 minuto a 11.000 g em temperatura ambiente. O que passou pela coluna foi descartado e a coluna foi novamente colocada no tubo coletor. Em seguida, foram aplicados 750 microlitros da solução PE no centro da coluna e essa mistura foi centrifugada a 11.000 g por 1 minuto. O que passou pela coluna novamente foi descartado e a coluna foi inserida em um microtubo de 1,5 ml estéril. Foram adicionados na coluna 50 microlitros de solução EB (*Elution Buffer*, 10mM Tris-Cl, pH 8.5). Essa mistura foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada a 11.000 g por 1 minuto. A solução EB deslocou o fragmento de PCR que está na coluna. A amostra então purificada foi armazenada em freezer a -20° C até o momento da reação de sequenciamento.

4.4 - Eletroforese

A eletroforese foi usada tanto para quantificação de DNA genômico como para resolver os fragmentos amplificados e purificados. Foram utilizados cuba de eletroforese horizontal 12,5 cm X 12 cm e gel de agarose 1,5 % (peso/volume) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) para o PCR

convencional e 2% para o PCR-ARMS, em tampão TBE 10 X (tris 108 gramas; 40 mL de EDTA 0,5 M e ácido bórico 55 gramas e H₂O em quantidade suficiente para 1000 mL). As corridas foram realizadas sob uma tensão de 10 V/cm. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (EtBr) e fotografado com uma câmera fotográfica Olympus C 4000 (Olympus, Tóquio, Japão) sob luz Ultra Violeta. O marcador de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad EUA) foi empregado para a avaliação e quantificação da extração do DNA genômico e do DNA purificado. Para a análise do fragmento de PCR convencional e PCR-ARMS, foram utilizados 100bp *DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

4.5 Sequenciamento

Cerca de 40 a 50 ng da amostra purificada foram submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando-se o *kit Big Dye sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems)*, 3,2 picomols de iniciador direto e reverso, 3 microlitros de *buffer Save money sequencing kit* e água *MilliQ* autoclavada em quantidade suficiente para 10 µl. A reação foi realizada no termociclador *Mastercycler Eppendorf* nas seguintes condições de ciclagem:

Após o término dos ciclos, as reações foram precipitadas com 20 µl de isopropanol 65% e submetidas à centrifugação por 1.500 g por 60 minutos à temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf* modelo 5804R. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 65% e centrifugado novamente nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o precipitado, seco a 55°C por aproximadamente 40 minutos no termociclador *Mastercycler Eppendorf*. Após a precipitação, as reações de sequenciamento devidamente secas foram ressuspendidas em 10 µl de *HI-DItm* Formamida (*Applied Biosystems*).

Amostras foram aplicadas no seqüenciador ABI 3100 (*Applied Biosystem, Foster City, CA*), seqüenciador automático utilizado em parceria com o Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, LEMB do Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo.

As seqüências obtidas foram comparadas e analisadas utilizando o programa *Bioedit Sequence Aligment Editor* ⁽⁷⁵⁾ e *Codoncode* (*Codoncode Corporation, versão 1.6.3*). O programa BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) também foi utilizado para pesquisa em banco de dados ⁽⁷⁶⁾.

4.6 - Análises estatísticas

As informações coletadas foram codificadas e digitadas em planilha de dados. As variáveis contínuas foram expressas como médias e desvio-padrões/medianas. Os dados nominais foram descritos por meio de frequências absolutas e relativas.

Foi utilizado o teste de Qui-quadrado para verificar associações dos grupos com relação ao sexo, idade, raças e genótipos. Para avaliar a associação dos genótipos e as variáveis dependentes como AZA, 6-TGN e 6-MMP nos grupos HAI e TXA, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que a amostra não obedeceu aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, necessários para a realização de testes paramétricos. A correlação entre a dose de AZA e seus metabólitos foi calculada através do coeficiente de Spearman. Os valores calculados para o **p** foram bicaudados, sendo considerado estatisticamente significativo **$p \leq 0,05$** . O programa de computador *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS®, EUA) foi utilizado nas análises estatísticas.

4.6.1 - Cálculo da equação de Hardy-Weinberg e frequência gênica

A equação do equilíbrio de Hardy e Weinberg foi estabelecida⁽⁷⁷⁾ obedecendo à seguinte distribuição:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Sendo que $p = A$ ou TPMT*1, $pq = Aa$ ou TPMT*2, *3A, *3C e $q = a$ ou TPMT*3A (único alelo homozigoto encontrado). O cálculo das frequências dos alelos foram realizados da seguinte forma:

$$p = AA + 1/2 Aa \text{ ou } p = \text{TPMT}^*1/^*1 + 1/2 \text{TPMT}^*1/^*2; ^*1/^*3A; ^*1/^*3C$$

$$q = aa + 1/2 Aa \text{ ou } q = \text{TPMT}^*3A/^*3A + 1/2 \text{TPMT}^*1/^*2; ^*1/^*3A; ^*1/^*3C$$

As análises envolvendo os genótipos e a concordância com o equilíbrio de Hardy e Weinberg foram realizadas em planilha Excel®, utilizando a função Qui-quadrado com 1 grau de liberdade. Se $p < 0,05$, não é consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5 - RESULTADOS

5.1 - Avaliação da extração de DNA genômico

Para a padronização da extração de DNA genômico, optou-se por utilizar um método comercial baseado em coluna de sílica gel. O kit escolhido foi o *QIAmp Blood kit* (Qiagen, Valencia, CA). A concentração média de DNA obtido por este método foi de 100 ng/uL, quantificado por espectrofotometria ou utilizando um padrão de massa (Low Mass Ladder – Invitrogen, Carlsbad, California).

Figura 5 - Extração de DNA genômico em gel de agarose 1,5%.

M: Marcador *Low mass DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

5.2 - Avaliação do ARMS-PCR

Para avaliar a detecção dos genótipos TPMT*1/*1, TPMT*1/*2, TPMT*1/*3A, TPMT*1/*3C e TPMT*3A/*3A foi realizada a amplificação pelo *multiplex* PCR-ARMS a partir dos DNAs genômicos extraídos dos cremes leucocitários de doadores e pacientes.

Na Figura 5, cada par de poços no gel representa 1 doador ou paciente. Como visto anteriormente, dois subconjuntos de iniciadores (4 pares de primers para cada subconjunto) e reagentes foram utilizados:

Poços ímpares → Subconjunto com iniciadores para identificar a posição no nucleotídeo TPMT 719 mutado (localizado no exon 10), TPMT 460 selvagem (localizado no exon 7), TPMT 238 selvagem (localizado no exon 5) e os iniciadores para $\beta 2$ – microglobulina foi utilizado como controle positivo da reação.

Poços pares → Subconjunto com iniciadores para identificar a posição no nucleotídeo TPMT 719 selvagem (localizado no exon 10), TPMT 460 mutado (localizado no exon 7), TPMT 238 mutado (localizado no exon 5) e os iniciadores para $\beta 2$ – microglobulina foi utilizado como controle positivo da reação.

No último par de poços no gel foi realizado o controle negativo.

Figura 6 - PCR-ARMS em gel de agarose 2%.

O marcador de 100 pares de bases no 1º poço foi utilizado. P1 e P2 mostram o indivíduo com o genótipo selvagem $TPMT^{*1/*1}$. P3 e P4, P5 e P6, P7 e P8, correspondem aos indivíduos heterozigotos mutados $TPMT^{*1/*2}$, $TPMT^{*1/*3A}$ e $TPMT^{*1/*3C}$ respectivamente. P9 e P10 representam o genótipo homozigoto mutado $TPMT^{*3A/*3A}$. Poços 11 e 12 correspondem ao controle negativo. Setas coloridas indicam as bandas mutadas para os seus respectivos genótipos. Setas em preto indicam o tamanho de cada fragmento amplificado com a localização das substituições nucleotídicas

5.3 - Sequenciamento

Foram analisados os sequenciamentos referentes às regiões polimórficas encontrados nas amostras e demonstrados abaixo (Figura 6, Figura 7, Figura 8 e Figura 9).

Figura 7 - Eletroferogramas localizados no exon 5.

O genótipo **TPMT*1/*1** corresponde ao indivíduo selvagem e **TPMT*1/*2**, ao indivíduo **heterozigoto** mutado. Setas indicam onde ocorre a transversão de **G** para **C** no nucleotídeo **238** do gene da TPMT, demonstrando um pico sobreposto ao outro

Figura 8 - Eletroferogramas localizados no exon 7 e no exon 10.

O genótipo **TPMT*1/*1** corresponde ao indivíduo selvagem e **TPMT*1/*3A**, ao indivíduo **heterozigoto** mutado. Setas indicam onde ocorre a transição de **G** para **A** no nucleotídeo **460** e concomitantemente a transição de **A** para **G** no nucleotídeo **719** do gene da TPMT, demonstrando um pico sobreposto ao outro

Figura 9 - Eletroferogramas localizados no exon 10.

O genótipo **TPMT*1/*1** corresponde ao indivíduo selvagem e **TPMT*1/*3C**, ao indivíduo **heterozigoto** mutado. Setas indicam onde ocorre a transição de **A** para **G** no nucleotídeo **719** do gene da TPMT, demonstrando um pico sobreposto ao outro

Figura 10 - Eletroferogramas localizados no exon 7 e no exon 10.

O genótipo **TPMT*1/*1** corresponde ao indivíduo selvagem e **TPMT*3A/*3A**, ao indivíduo **homozigoto** mutado. Setas indicam onde ocorre a transição de **G** para **A** no nucleotídeo **460** e concomitantemente a transição de **A** para **G** no nucleotídeo **719** do gene da TPMT

5.4 - Comparação de custos das reações de genotipagem (*ARMS-PCR versus Sequenciamento de DNA*)

Os valores abaixo foram tomados nas referidas empresas no mês de novembro de 2010.

Tabela 2 - Valores por reação para cada teste de ARMS-PCR.

Materiais	TOTAL R\$	UNITÁRIO R\$
Kit Extração de DNA kit Blood mini kit 250 rx Qiagen	1657,14	6,62
Taq Gold 50U Lifetech	583,38	0,61
dNTP set 100mM Invitrogen	1113,60	0,8
Primers oligo liofilizado desalt 50 nmol Invitrogen	3,30/base	0,32
Agarose 500g -250 geis a 2% Invitrogen	1680	3,36
100 bp DNA ladder 50ug	459,36	0,80
low DNA mass ladder 50 rxn	450,08	0,80
Blue Juice 10x loading Buffer	153,12	0,20
Brometo de etídeo	232	0,93
Tampão Tris Borato EDTA TBE 10X invitrogen	136,4	0,9
Ponteiras(p10, p2000, p1000) e tubos (0.2ul, 200ul e 1.5ml) Axygen	280,00 cx com 50 racks 280,00 cx com 50 racks 280,00 cx com 50 racks 525,00 cx com 10000 U 266,00 cx com 10000 U 69 cx com 5000 U	4,00
Valor total por reação		19,34

Tabela 3 - Valores por reação para cada teste de sequenciamento.

Materiais	TOTAL R\$	UNITÁRIO R\$
Reação de PCR + extração	-	19,12
Kit Purificação Qiagen	R\$ 1.800,90	6,60
Agarose 500g - 250 geis a 1.5% Invitrogen	1680	4,22
Reação Sequenciamento (kit Big Dye sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems))	R\$ 23.712,63	31,59
Primers oligo liofilizado desalt 50 nmol Invitrogen	3,30/base	0,11
Polímero (pop6) e Formamida Hi-DI	1358,32	1,50
	280,00 cx com 50 racks	
	280,00 cx com 50 racks	
	280,00 cx com 50 racks	
Tips (p10, p2000, p1000) e tubos (0.2ul, 200ul e 1.5ml), placas (96 poços) Axygen	525,00 cx com 10000 U	10
	266,00 cx com 10000 U	
	69 cx com 5000 U	
Valor total por reação		73,14

5.4.1 - Custos de exames de rotina em pacientes HC-FMUSP

Valores de exames no laboratório central de rotina do HC em pacientes transplantados renais que utilizaram tanto o Sistema Único de Saúde, como o sistema particular no ano de 2011 .

Tabela 4 - Valores unitários e mensais dos testes realizados em rotina em transplantados renais no SUS e sistema particular do HC.

Exames	SUS			
	Valor Unitário(R\$)	1 mês(R\$)	3 meses(R\$)	6 meses(R\$)
Hemograma completo	4,11	16,44	49,32	98,64
AST	2,01	8,04	24,12	48,24
ALT	2,01	8,04	24,12	48,24
Creatinina	1,85	7,4	22,2	44,4
Urina tipo I	3,7	14,8	44,4	88,8
Total	-	54,72	164,16	328,32

Tabela SUS-Janeiro 2011⁽⁷⁸⁾

Exames	Particular			
	Valor Unitário(R\$)	1 mês	3 meses(R\$)	6 meses(R\$)
Hemograma completo	8	32	96	192
AST	6,64	26,56	79,68	159,36
ALT	6,64	26,56	79,68	159,36
Creatinina	3,56	14,24	42,72	85,44
Urina tipo I	7,44	29,76	89,28	178,56
Total	-	129,12	387,36	774,72

Valor Institucional do HC- Janeiro 2011

5.5 - Casos genotipados do Grupo Controle

Foram genotipados 215 doadores de sangue recrutados na Fundação Pró-sangue – Hemocentro de São Paulo, sendo 127 do sexo masculino e 88 do feminino, 59,1% e 40,9%, respectivamente (Tabela 5). A média de idade foi 34,69 anos $\pm 10,75$. Não houve significância estatística da relação dos genótipos e dos alelos com o sexo ($p=0,689$ e $p=0,52$).

O genótipo selvagem TPMT*1/*1 foi encontrado em 192/215 (89,3%). O genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*2 foi verificado em

3/215 (1,4%), doadores com o genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*3A corresponderam a 13/215 (6%) e, para o genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*3C, foram encontrados 6/215 (2,8%). No genótipo TPMT*3A/*3A, a frequência encontrada foi de 0,5% pois somente um doador para o genótipo foi analisado. Assim foi adquirida uma frequência de genótipos mutados no total de 23/215 (10,7%). No grupo controle, também foi estabelecida a relação de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram selecionados os genótipos TPMT*1(homozigoto selvagem); TPMT*1/*2, TPMT*1/*3A, TPMT*1/*3C (heterozigotos) e TPMT*3A/*3A (homozigoto variante) com suas respectivas frequências: 0,944; 0,052; 0,056. A variância encontrada foi de 0,06, com $p = 0,669$. A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição dos polimorfismos foi avaliada, dividindo-se a população estudada disponível (N= 215) em quatro grupos raciais: brancos, negros, amarelos e mestiços doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. O genótipo TPMT*1/*1 foi encontrado em 192 doadores correspondendo a 89,3% do grupo estudado, sendo 125 brancos (65,1%), 31 negros (16,1%), 34 mestiços (17,7%) e 2 amarelos (1%). Para o genótipo TPMT*1/*2, houve somente doadores classificados como brancos, que corresponderam a 3 (100%). Para o genótipo TPMT*1/*3A, os doadores corresponderam a 12 (92,3%) brancos e 1 (7,7%) negro. O genótipo TPMT*1/*3C foi encontrado em 1 (16,7%) branco, 1 (16,7%) negro e em 4 (66,7%) doadores mestiços. Para o genótipo TPMT*3A/*3A foi encontrado 1 (100%) branco. Não houve

significância estatística entre a raça e o genótipo ($p=0,254$). Mesmo obtendo-se o valor de $p=0,045$, a associação de raça e frequência alélica não foi significativa devido ao baixo valor amostral do alelo TPMT *2 na população estudada (Tabela 5).

Tabela 5 - Associação dos genótipos e alelos com sexo e raça em doadores de sangue.

		Frequência genotípica					valor
		*1/*1	*1/*2	*1/*3A	*1/*3C	*3A/*3A	<i>p</i>
<hr/>							
Doadores de sangue (n=215)							
	n(%)						
	Feminino	80(41,7)	2(67,7)	4(30,8)	2(33,3)	-	0,689
	Masculino	112(58,3)	1(33,3)	9(69,2)	4(67,7)	1(100)	
Raça	n(%)						
	brancos	125(65,1)	3(100)	12(92,3)	1(16,7)	1(100)	0,254
	negros	31(16,1)	-	1(7,7)	1(16,7)	-	
	mestiços	34(17,7)	-	-	4(66,7)	-	
	amarelos	2(1)	-	-	-	-	
<hr/>							
		Frequência alélica				valor	<i>p</i>
		*1	*2	*3A	*3C		
<hr/>							
(n=430)							
	n(%)						
	Feminino	168(41,4)	2(67,7)	4(26,7)	2(33,3)	0,52	
	Masculino	238(58,6)	1(33,3)	11(73,3)	4(67,7)		
Raça	n(%)						
	brancos	266(65,5)	3(100)	14(93,3)	1(16,7)	0,045	
	negros	64(15,82)	-	1(6,7)	1(16,7)		
	mestiços	72(17,7)	-	-	4(66,6)		
	amarelos	4(0,98)	-	-	-		

5.6 - Casos Genotipados do Grupo de Hepatite autoimune

Foram genotipados 136, sendo 21 do sexo masculino e 115 do feminino, 15,4% e 84,6%, respectivamente (Tabela 6). A média de idade foi 38,87 anos $\pm$ 16,64. Não houve significância estatística entre os genótipos e alelos com o sexo ($p=0,843$ e $p=0,848$).

O genótipo selvagem TPMT*1/*1 foi encontrado em 124/136 (91,1%). O genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*2 foi verificado em 2/136 (1,5%), o genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*3A correspondeu a 8/136 (5,9%) e para o genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*3C foram encontrados 2/136 (1,5%). Assim, foi adquirida uma frequência de genótipos mutados no total de 12/136 (8,9%). Estiveram ausentes os genótipos homozigotos mutados.

A distribuição dos polimorfismos foi avaliada, dividindo-se a população estudada disponível (N= 136) em quatro grupos raciais: brancos, negros, amarelos e mestiços com hepatite auto-imune. O genótipo TPMT*1/*1 foi encontrado em 124/136 (91,1%) pacientes do grupo estudado, sendo 72 brancos (58,1%), 17 negros (13,7%), 33 mestiços (26,6%) e 2 amarelos (1,6%). Para o genótipo TPMT*1/*2, houve doadores classificados sendo 1 branco (50%) e 1 mestiço (50%).

Para o genótipo TPMT*1/*3A, os doadores corresponderam a 7 (87,5%) brancos e a 1 (12,5%) mestiços. O genótipo TPMT*1/*3C foi encontrado em 2 (100%) doadores mestiços. Não houve significância

estatística entre os genótipos e alelos com a raça ($p=0,428$ e $p=0,052$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação dos genótipos e alelos com sexo e raça no grupo HAI.

		Frequência genotípica				valor <i>p</i>
		*1/*1	*1/*2	*1/*3A	*1/*3C	
Grupo HAI (n=136)						
	n(%)					
	Feminino	104(83,9)	2(100)	7(87,5)	2(100)	0,843
	Masculino	20(16,1)	-	1(12,5)	-	
Raça	n(%)					
	brancos	72(58,1)	1(50)	7(87,5)	-	0,428
	negros	17(13,7)	-	-	2(100)	
	mestiços	33(26,6)	1(50)	1(12,5)	-	
	amarelos	2(1,6)	-	-	-	
		Frequência alélica				valor <i>p</i>
		*1	*2	*3A	*3C	
(n=272)						
	n(%)					
	Feminino	219(84,2)	2(100)	7(87,5)	2(100)	0,848
	Masculino	41(15,8)		1(12,5)		
Raça	n(%)					
	brancos	152(58,5)	1(50)	7(87,5)	-	0,052
	negros	34(13,1)	-	-	2(100)	
	mestiços	70(26,9)	1(50)	1(12,5)	-	
	amarelos	4(1,5)	-	-	-	

Foi avaliada a associação dos genótipos na população estudada (N= 136) aos metabólitos 6-TGN e 6-MMP dosados. Os pacientes ingeriam média de 1,49 mg/kg/dia $\pm 1,09$ de azatioprina e 129/136 pacientes ingeriram média de 10,80 mg/dia $\pm 4,28$ de prednisona, ambos por um período em média de 7,26 $\pm 5,82$ anos de tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das doses de AZA

dos pacientes com genótipo selvagem ($1,50 \text{ mg/kg/dia} \pm 1,14$) e os heterozigotos mutados ($1,37 \text{ mg/kg/dia} \pm 0,41$) ($p=0,924$). Para o genótipo selvagem $TPMT^*1/*1$ foi encontrada uma mediana de 263,50 (Q_1 - $Q_3=152,50$ -431,75) pmol de 6-TGN/ 8×10^8 RBC. Para os genótipos heterozigotos mutados agrupados ($TPMT^*1/*2$, $TPMT^*1/*3A$ e $TPMT^*1/*3C$), foi encontrada uma mediana de 711,50 (Q_1 - $Q_3=450,25$ -857,00) pmol de 6-TGN/ 8×10^8 RBC. Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de 6-TGN com a dose de AZA/peso ($p=0,314$); mas houve uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos genótipos selvagens com os mutados para o metabólito 6-TGN ($p<0,001$) (gráficos 3 e 4).

Gráfico 1 - Correlação dos níveis de 6-TGN com a dose de AZA/peso ($1,49 \text{ mg/kg/dia} \pm 1,09$) no grupo HAI ($p=0,314$).

Gráfico 2 - Associação das medianas dos níveis de 6-TGN com os genótipos selvagens e mutados no grupo HAI (**p<0,001).

Na associação do metabólito 6-MMP com o genótipo selvagem TPMT*1/*1 foi obtida uma mediana de 1703,50 (Q₁-Q₃=420,00-3765,50) pmol de 6-MMP/8x10⁸RBC. Para os genótipos heterozigotos mutados agrupados (TPMT*1/*2, TPMT*1/*3A e TPMT*1/*3C), foi encontrada uma mediana de 550,00 (Q₁-Q₃=60,00-902,00) pmol de 6-MMP/8x10⁸RBC. Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de 6-MMP com a dose de AZA/peso (p=0,659); mas houve uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos genótipos selvagens com os mutados para o metabólito 6-MMP (p=0,022) (gráficos 5 e 6).

Gráfico 3 - Correlação dos níveis de 6-MMP com a dose de AZA/peso (1,49 mg/kg/dia $\pm$ 1,09) no grupo HAI (p=0,659).

Gráfico 4 - Associação das medianas dos níveis de 6-MMP com os genótipos selvagens e mutados no grupo HAI (*p=0,022).

5.7 - Casos Genotipados do Grupo de Transplante renal

Foram genotipados 115, sendo 48 do sexo masculino e 67 do feminino, 41,7 e 58,3%, respectivamente (Tabela 7). A média de idade foi 47,22 anos $\pm$ 12,73. Não houve significância estatística entre os genótipos e alelos com o sexo ($p=0,514$ e $p=0,518$).

O genótipo selvagem TPMT*1/*1 foi encontrado em 108/115 (93,9%). O genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*2 foi verificado em 1/115 (0,9%); ao genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*3A corresponderam 3/115 (2,6%) e, para o genótipo heterozigoto mutado TPMT*1/*3C, foram encontrados 3/115 (2,6%). Estiveram ausentes os genótipos homozigotos mutados.

A distribuição dos polimorfismos foi avaliada, dividindo-se a população estudada disponível (N= 115) em quatro grupos raciais: brancos, negros, amarelos e mestiços transplantados renais. O genótipo TPMT*1/*1 foi encontrado em 108 pacientes, correspondendo a 93,9% do grupo estudado, sendo 79 brancos (73,1%), 5 negros (4,6%), 20 mestiços (18,5%) e 4 amarelos (3,7%). Para o genótipo TPMT*1/*2, houve somente doadores classificados como brancos, que corresponderam a 1 (100%). Para o genótipo TPMT*1/*3A, os doadores corresponderam a 3 (100%) brancos. O genótipo TPMT*1/*3C foi encontrado em 1 (33,3%) negro e em 2 (66,7%) pacientes mestiços. Não

houve significância estatística entre os genótipos e alelos com a raça ($p=0,212$ e $p=0,204$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação dos genótipos e alelos com sexo e raça no grupo TXA.

		Frequência genotípica				valor <i>p</i>
		*1/*1	*1/*2	*1/*3A	*1/*3C	
Grupo TXA (n=115)						
Raça	n(%)					
	Feminino	64(58,2)	-	2(66,7)	1(33,3)	0,514
	Masculino	44(41,8)	1(100)	1(33,3)	2(67,7)	
	n(%)					
	brancos	79(73,1)	1(100)	3(100)	-	0,212
	negros	5(4,6)	-	-	1(33,3)	
	mestiços	20(18,5)	-	-	2(66,7)	
	amarelos	4(3,7)	-	-	-	
		Frequência alélica				valor <i>p</i>
		*1	*2	*3A	*3C	
(n=230)						
Raça	Feminino	131(58,7)	-	2(67,7)	1(33,3)	0,518
	Masculino	92(41,3)	1(100)	1(33,3)	2(67,7)	
	n(%)					
	brancos	166(73,6)	1(100)	3(100)	-	0,204
	negros	11(4,9)	-	-	1(33,3)	
	mestiços	42(18)	-	-	2(66,7)	
	amarelos	8(3,5)	-	-	-	

Foi avaliada a associação dos genótipos na população estudada (N= 115) aos metabólitos 6-TGN e 6-MMP dosados. Os pacientes ingeriam média de $1,69 \pm 0,66$ mg/kg/dia de azatioprina e 112/115 pacientes ingeriram média de $6,82$ mg/dia $\pm 2,30$ de prednisona, ambos por um período em média de $11,93 \pm 8,99$ anos de tratamento. Não houve diferença estatisticamente significante entre as médias das doses de AZA dos pacientes com genótipo selvagem ($1,68 \pm 0,67$ mg/kg/dia) e

os heterozigotos mutados ($1,86 \text{ mg/kg/dia} \pm 0,37$) ($p=0,669$). Para o genótipo selvagem $TPMT^*1/*1$, foi encontrada uma mediana de 201,50 (Q_1 - $Q_3=60,00$ -406,50) pmol de 6-TGN/ 8×10^8 RBC. Para os genótipos heterozigotos mutados agrupados ($TPMT^*1/*2$, $TPMT^*1/*3A$ e $TPMT^*1/*3C$), foi encontrada uma mediana de 919,00 (Q_1 - $Q_3=412,00$ -1120,00) pmol de 6-TGN/ 8×10^8 RBC. Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de 6-TGN com a dose de AZA/peso ($p=0,992$); mas houve uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos genótipos selvagens com os mutados para o metabólito 6-TGN ($p=0,004$) (Gráficos 7 e 8).

Gráfico 5 - Correlação dos níveis de 6-TGN com a dose de AZA/peso ($1,69 \pm 0,66 \text{ mg/kg/dia}$) no grupo TXA ($p=0,992$).

Gráfico 6 - Associação das medianas dos níveis de 6-TGN com os genótipos selvagens e mutados no grupo TXA (**p=0,004).

Na associação do metabólito 6-MMP com o genótipo selvagem TPMT*1/*1 foi obtida uma mediana de 3999,50 (Q₁-Q₃=1327,50-10538,25) pmol de 6-MMP/8x10⁸RBC. Para os genótipos heterozigotos mutados agrupados (TPMT*1/*2, TPMT*1/*3A e TPMT*1/*3C), foi encontrada uma mediana de 2496,00 (Q₁-Q₃=1362,00-6467,00) pmol de 6-MMP/8x10⁸RBC. Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de 6-MMP com a dose de AZA/peso (p=0,701) e diferença entre as medianas dos genótipos selvagens com os mutados para o metabólito 6-MMP (p=0,632) (Gráficos 9 e 10).

Gráfico 7 - Correlação dos níveis de 6-MMP com a dose de AZA/peso ($1,69 \pm 0,66$ mg/kg/dia) no grupo TXA ($p=0,701$).

Gráfico 8 - Associação das medianas dos níveis de 6-MMP com os genótipos selvagens e mutados no grupo TXA ($p=0,632$).

6 - DISCUSSÃO

Polimorfismos genéticos da TPMT foram os primeiros e mais estudados da área de farmacogenética, mas ainda com muitas variações e frequentes intercorrências metabólicas a serem esclarecidas. Além disso, é sabido que os índices de concordância geral para a relação fenótipo-genótipo da TPMT são razoavelmente pertinentes. A distribuição de frequência resultante da atividade da TPMT em caucasianos é trimodal (normal, média e baixa atividade), e a atividade enzimática pode ser influenciada por raça, tratamento tiopurínico e possivelmente medicações concomitantes. Sabe-se que a atividade da TPMT é mais influenciada pela idade e sexo em crianças. Uma atividade maior foi observada em crianças do sexo masculino em comparação com crianças do sexo feminino e adultos de genótipo selvagem⁽⁷⁹⁾. Não houve associação entre sexo e idade com variantes alelos/genótipos e do tipo selvagem alelos/genótipos em todos os pacientes e controles em nosso estudo.

Sabemos, também, que pacientes com os genótipos homozigotos mutados e até mesmo genótipos heterozigotos desenvolvem níveis de 6-TGN em toxicidade. Esses níveis, quando tratados com doses padronizadas, poderão acarretar aos pacientes um risco maior de mielossupressão^(17, 33, 80-83). Do ponto de vista metabólico, está descrito na literatura que níveis de 6-TGN terapêuticos apresentaram intervalos lineares de 200 a 500 pmol/8x10⁸ RBC e 6-MMP de 60 a 5.700

pmol/8x10⁸ RBC^(16, 84-87), uma vez que esses trabalhos analisaram outras doenças em tratamento de AZA e não somente as contempladas em nosso estudo. Portanto, no presente estudo, nos pacientes com os genótipos TPMT*1/*1, as medianas foram encontradas dentro dos valores terapêuticos tanto para os níveis de 6-TGN como para os níveis de 6-MMP. Os valores das medianas de 6-TGN para os grupos HAI e TXA foram de: 263,50 e 201,50 pmol/8x10⁸ RBC, respectivamente. Entretanto, para os genótipos mutados, foram encontradas medianas de: 711,50 e 919,00 pmol/8x10⁸ RBC, respectivamente. Portanto, houve uma diferença significativa (HAI-p<0,001 e TXA-p=0,004) para os níveis de 6-TGN entre os pacientes selvagens e os mutados em ambos os grupos. Porém, não houve uma correlação entre os níveis dos metabólitos com a dose de AZA/peso (p=0,314 e p=0,992). Em contrapartida, não houve diferença com relação às médias das doses de AZA/peso entre os pacientes com genótipo selvagem e os pacientes mutados (p=0,924 e p=0,669). Contudo, nos pacientes mutados foram elevados os níveis de 6-TGN, podendo assim, causar uma suposta toxicidade (>500 pmol/8x10⁸ RBC). No trabalho de Heneghan e cols.⁽²³⁾ foi relatada em 26 pacientes com HAI a existência da correlação entre os níveis de 6-TGN e dose de AZA/peso. Mas no mesmo trabalho, não houve correlação em outros 26 pacientes com HAI que recebiam AZA e prednisona concomitantemente. Essa pode ser uma hipótese levantada pelo nosso estudo para a não ter ocorrência dessa correlação, já que quase todos os pacientes usavam prednisona. Outra hipótese seria que as análises dos metabólitos realizadas em

muitos pacientes foram em períodos diferentes de tratamento. A correlação entre os níveis de 6-TGN e a dose de AZA/peso já foi relatada também em outros estudos e os resultados demonstraram correlações fracas, $r=0,0009^{(24)}$, $r=0,12$ e $r^2=0,015^{(88)}$. A fraca correlação entre a dose de AZA/peso e os níveis de 6-TGN sustenta a necessidade da TDM no tratamento imunossupressor.

Os valores de 6-MMP nos pacientes TPMT*1/*1, para os grupos HAI e TXA foram de 1703,50 e 3999,50 pmol/ 8×10^8 RBC, respectivamente. Para os pacientes mutados, foram encontradas as medianas de 550,0 e 2496,0, respectivamente. Apesar da diferença significativa obtida no grupo HAI ($p=0,022$), as medianas para os níveis do metabólito 6-MMP em todos os pacientes, de ambos os grupos, encontraram-se dentro dos valores terapêuticos. Níveis mais baixos de 6-MMP servem para confirmar metilação intermediária ocorrente normalmente em indivíduos heterozigotos mutados⁽⁸⁹⁾. Na literatura, há trabalhos em que é reportado o aumento da TPMT com o passar dos anos do uso de AZA^(20, 90). Provavelmente, esse aumento deve-se ao fato de a enzima ser induzida pelo seu substrato, o que resulta em aumento dos níveis de 6-MMP e, possivelmente, ao da dose do medicamento⁽⁹¹⁾. Com base nesses estudos, uma hipótese para os níveis mais altos de 6-MMP no grupo TXA seria devido ao tempo de tratamento e a dose de AZA/peso ($p<0.001$) serem superiores ao do grupo HAI.

Poucos estudos têm sido realizados com o valor preditivo do genótipo TPMT na prevenção da toxicidade como mielossupressão e

hepatotoxicidade, e os resultados têm sido conflitantes^(17, 33, 80, 92). Mas alguns trabalhos sugerem a inclusão da genotipagem na rotina por existir um possível valor preditivo de toxicidade^(81, 93-95).

Em um recente estudo de Xin H.W. e cols.⁽⁹⁶⁾, 30/150 (20%) dos pacientes com transplante de rim foram obrigados a reduzir a dose de AZA ou a descontinuação do tratamento devido às reações adversas. O alelo mutante *3C foi encontrado em 7 pacientes (4,7%) em que encontraram-se atividade enzimáticas baixas. Entre os pacientes com o alelo mutante *3C, dois apresentaram mielotoxicidade e dois desenvolveram hepatotoxicidade. No estudo de Song D.K., e cols.⁽⁹⁷⁾, 8/122 (3,28%) pacientes eram heterozigotos para o alelo *3C e 4/122 pacientes desenvolveram mielotoxicidade. Apenas um paciente heterozigoto para o alelo *3C apresentou mielotoxicidade. Fabre M.A. e cols.⁽⁹⁸⁾, analisaram 172 pacientes que recebiam 1,5 mg/kg/dia inicial de AZA. Eles encontraram 12 pacientes mutados, 11/12 apresentavam o alelo *3A e um paciente com o alelo *3C. Entre estes, 58% necessitaram de uma redução pela mesma razão.

Existem outros três estudos brasileiros na literatura, em que foram avaliados os polimorfismos do gene da TPMT em diferentes populações: um dos trabalhos incluiu 306 indivíduos saudáveis e nos outros dois foram analisados pacientes de um hospital público, com diagnósticos distintos de hepatites autoimunes e pacientes submetidos a transplante renal. O alelo variante mais freqüente no estudo brasileiro mais recente foi o TPMT *3A⁽⁴¹⁾, que é também o mais frequentes entre os caucasianos

(99), (36), (37, 100-102). No estudo de Reis e cols.⁽³⁹⁾, o alelo mais frequente foi o TPMT *3C, que também é o mais freqüente em orientais, africanos ocidentais⁽¹⁰²⁾, no sudeste da Ásia⁽¹⁰³⁾, afro-americanos⁽¹⁰⁴⁾, chineses^(73, 103) e japoneses^(105, 106). Por outro lado, Boson e cols.⁽⁴⁰⁾ observaram uma freqüência maior do alelo TPMT *2. Uma possível explicação para resultados tão diferentes é que o Brasil tem uma das populações mais heterogêneas do mundo^(107, 108), como também em outros países sulamericanos vizinhos. Estudos mostram uma prevalência do alelo TPMT *3A em indivíduos da Argentina e do Chile^(109, 110), onde também foi declarada heterogeneidade. No presente estudo, o alelo mais frequente foi TPMT *3A e o genótipo *1/*3A tanto no grupo controle como no grupo HAI. No grupo TXA, obtivemos frequências iguais e predominantes dos alelos TPMT*3A e*3C e dos genótipos *1/*3A e *1/*3C.

Dois artigos brasileiros^(39, 40) utilizaram PCR-RFLP para detecção dos polimorfismos, e o mais recente já utilizou o *multiplex* PCR-ARMS⁽⁴¹⁾. O estudo presente também utilizou o *multiplex* PCR-ARMS, que amplifica simultaneamente mais de um *locus*. Este ensaio é capaz de detectar as substituições de 238G>C, 460g>A e 719A>G e, portanto, pode facilmente distinguir entre os alelos TPMT * 2, TPMT * 3A, TPMT * 3B e TPMT * 3C. Há muita controvérsia e tem sido sugerido que alguns alelos TPMT * 3B foram os resultados dos erros do alelo TPMT * 3A, devido à digestão incompleta da endonuclease comumente utilizada em ensaios de PCR-RFLP. Caso que não acontece no PCR-ARMS porque não faz uso de enzimas de restrição.

Schutz e cols.⁽¹¹¹⁾ descreveram e demonstraram o método de *Light Cycler*-PCR em tempo real para a detecção de TPMT * 2, TPMT * 3, TPMT * 4, TPMT *5 e TPMT * 6. Este ensaio, bem como sequenciamento e *arrayed primer extension*⁽¹¹²⁾ e o MALDI-TOF *Mass Spectrometry*⁽¹¹³⁾ permitem uma triagem de amostras dos pacientes para uma série de variantes TPMT. No entanto, para muitos laboratórios de pesquisa, o custo alto dos reagentes e dos equipamentos limitariam à aplicação do presente ensaio. O *multiplex* PCR-ARMS que descrevemos oferece um método mais barato, preciso e que abrange os polimorfismos predominantes com relação à nossa heterogeneidade, sendo uma alternativa válida para a genotipagem dos alelos variantes. Em situações em que é importante a identificação de variantes raras, e potencialmente importantes, uma análise minuciosa seria mais adequada. Em nosso estudo, além da confiabilidade de 100% dos resultados entre a técnica de ARMS-PCR e o sequenciamento, foi demonstrado que o preço entre as duas metodologias são discrepantes, sendo o ARMS-PCR a técnica mais barata. Foi demonstrado também que a soma dos exames realizados entre o período de 1 a 6 meses na rotina de pacientes TXA, ou seja, hemograma, ALT, AST, creatinina e urina tipo 1 teve um preço superior ao teste de ARMS-PCR realizado dentro do nosso estudo.

A partir de todos esses fatos, o desenvolvimento de efeitos adversos para AZA é um evento multifatorial, causado por uma confluência de outros fatores e não somente pelas variantes existentes no gene da TPMT. Porém, é aconselhável a constante busca por outros genes

candidatos e outros marcadores que possam estar envolvidos na toxicidade causada pela AZA^(94, 114).

Portanto, a genotipagem da TPMT pode ser sugerida como um exame adicional na verificação da dosagem tanto nos efeitos terapêuticos, como também nos efeitos adversos que poderão causar aos pacientes.

7 - CONCLUSÃO

Foi verificada uma prevalência semelhante à literatura do genótipo *1/*3A nos indivíduos sadios, pacientes com hepatite autoimune e transplantados renais.

Os métodos utilizados ARMS-PCR e sequenciamento foram padronizados e validados, obtendo-se um resultado de 100% de relação entre eles.

Houve associação significativa do metabólito 6-TGN com os genótipos heterozigotos mutados (*1/*2, *1/*3A e *1/*3C), podendo contribuir com o ajuste da dosagem da azatioprina e causas adversas futuras.

8 - REFERÊNCIAS

1. Shah RR. Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 Aug 29;360(1460):1617-38.
2. WHO Drug Information. Geneva: World Health Organization; 2003.
3. Weinshilboum RM. Pharmacogenomics: catechol O-methyltransferase to thiopurine S-methyltransferase. *Cell Mol Neurobiol.* 2006 Jul-Aug;26(4-6):539-61.
4. Duley JA, Chocair PR, Florin TH. Observations on the use of allopurinol in combination with azathioprine or mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Dec;22(11-12):1161-2.
5. Chocair P, Duley J, Simmonds HA, Cameron JS, Ianhez L, Arap S, et al. Low-dose allopurinol plus azathioprine/cyclosporin/prednisolone, a novel immunosuppressive regimen. *Lancet.* 1993 Jul 10;342(8863):83-4.
6. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;43(4):329-39.
7. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, et al. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Feb;312(2):537-45.
8. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1133-45.
9. Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science.* 1989 Apr 7;244(4900):41-7.
10. Stocco G, Martellosi S, Barabino A, Decorti G, Bartoli F, Montico M, et al. Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Jan;13(1):57-64.
11. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, et al. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science.* 1996 Aug 23;273(5278):1109-11.

12. Inamochi H, Higashigawa M, Shimono Y, Nagata T, Cao DC, Mao XY, et al. Delayed cytotoxicity of 6-mercaptopurine is compatible with mitotic death caused by DNA damage due to incorporation of 6-thioguanine into DNA as 6-thioguanine nucleotide. *J Exp Clin Cancer Res*. 1999 Sep;18(3):417-24.
13. Allan PW, Bennett LL, Jr. 6-Methylthioguanilic acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochem Pharmacol*. 1971 Apr;20(4):847-52.
14. Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;42(4):266-72.
15. Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep;2(9):731-43.
16. Dewit O, Starkel P, Roblin X. Thiopurine metabolism monitoring: implications in inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest*. 2010 Nov;40(11):1037-47.
17. Smith MA, Marinaki AM, Arenas M, Shobowale-Bakre M, Lewis CM, Ansari A, et al. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 Aug 15;30(4):375-84.
18. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980 Sep;32(5):651-62.
19. Soria-Royer C, Legendre C, Mircheva J, Premel S, Beaune P, Kreis H. Thiopurine-methyl-transferase activity to assess azathioprine myelotoxicity in renal transplant recipients. *Lancet*. 1993 Jun 19;341(8860):1593-4.
20. Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation*. 1992 May;53(5):1051-6.
21. Chrzanowska M, Krzymanski M. Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine metabolites in renal transplantation recipients and patients with glomerulonephritis treated with azathioprine. *Ther Drug Monit*. 1999 Apr;21(2):231-7.

22. Thervet E, Anglicheau D, Toledano N, Houllier AM, Noel LH, Kreis H, et al. Long-term results of TMPT activity monitoring in azathioprine-treated renal allograft recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jan;12(1):170-6.
23. Heneghan MA, Allan ML, Bornstein JD, Muir AJ, Tendler DA. Utility of thiopurine methyltransferase genotyping and phenotyping, and measurement of azathioprine metabolites in the management of patients with autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2006 Oct;45(4):584-91.
24. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnott D, Theoret Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000 Apr;118(4):705-13.
25. Dubinsky MC, Reyes E, Ofman J, Chiou CF, Wade S, Sandborn WJ. A cost-effectiveness analysis of alternative disease management strategies in patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol*. 2005 Oct;100(10):2239-47.
26. Seidman EG. Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. *Rev Gastroenterol Disord*. 2003;3 Suppl 1:S30-8.
27. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1025-30.
28. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med*. 1998 Nov 1;129(9):716-8.
29. Stolk JN, Boerbooms AM, de Abreu RA, de Koning DG, van Beusekom HJ, Muller WH, et al. Reduced thiopurine methyltransferase activity and development of side effects of azathioprine treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998 Oct;41(10):1858-66.
30. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6444-9.

31. Rutherford K, Daggett V. Four human thiopurine s-methyltransferase alleles severely affect protein structure and dynamics. *J Mol Biol.* 2008 Jun 13;379(4):803-14.
32. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet.* 1996 Apr;58(4):694-702.
33. Derijks LJ, Wong DR. Pharmacogenetics of thiopurines in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des.* 2010;16(2):145-54.
34. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 14;92(4):949-53.
35. Loennechen T, Yates CR, Fessing MY, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Isolation of a human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) complementary DNA with a single nucleotide transition A719G (TPMT*3C) and its association with loss of TPMT protein and catalytic activity in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1998 Jul;64(1):46-51.
36. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med.* 1997 Apr 15;126(8):608-14.
37. McLeod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus - implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2002 Jan;3(1):89-98.
38. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Aug;64(8):753-67.
39. Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics.* 2003 Jun;13(6):371-3.
40. Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Falcao RP, Teixeira-Vidigal PV, De Marco L. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(3):178-82.
41. Silva MR, de Oliveira BM, Viana MB, Murao M, Romanha AJ. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene polymorphism in Brazilian

children with acute lymphoblastic leukemia: association with clinical and laboratory data. *Ther Drug Monit.* 2008 Dec;30(6):700-4.

42. Elsevier. *Cecil Medicine - Expert Consult.* 23^a Edição ed: GOLDMAN, LEE; 2009.

43. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC, et al. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol.* 2002 Sep;37(3):302-8.

44. Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2002 Aug;36(2):479-97.

45. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol.* 2004 Oct;41(4):677-83.

46. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 1999:1-21.

47. Adcock IM, Ito K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2000 Jun;55(3):256-66.

48. Morris PJ, Chan L, French ME, Ting A. Low dose oral prednisolone in renal transplantation. *Lancet.* 1982 Mar 6;1(8271):525-7.

49. Papadakis J, Brown CB, Cameron JS, Adu D, Bewick M, Donaghey R, et al. High versus "low" dose corticosteroids in recipients of cadaveric kidneys: prospective controlled trial. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983 Apr 2;286(6371):1097-100.

50. d'Apice AJ, Becker GJ, Kincaid-Smith P, Mathew TH, Ng J, Hardie IR, et al. A prospective randomized trial of low-dose versus high-dose steroids in cadaveric renal transplantation. *Transplantation.* 1984 Apr;37(4):373-7.

51. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem.* 2002 Jan;131(1):1-15.

52. Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, Roy A, Murphy G, Tan A, et al. Peak cyclosporine levels (Cmax) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of neoral and sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation.* 1999 Apr 27;67(8):1133-7.

53. Lindholm A, Albrechtsen D, Tufveson G, Karlberg I, Persson NH, Groth CG. A randomized trial of cyclosporine and prednisolone versus cyclosporine, azathioprine, and prednisolone in primary cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1992 Oct;54(4):624-31.
54. Hardie IR, Tiller DJ, Mahony JF, Miach PJ, Thomson NM, Thatcher GN, et al. Optimal combination of immunosuppressive agents for renal transplantation: first report of a multicentre, randomised trial comparing cyclosporine+prednisolone with cyclosporine+azathioprine and with triple therapy in cadaver renal transplantation. The Australian Collaborative Trials Committee. *Transplant Proc*. 1993 Feb;25(1 Pt 1):583-4.
55. Remuzzi G, Bertani T. Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. *Am J Kidney Dis*. 1989 Apr;13(4):261-72.
56. Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1457-9.
57. Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, Dias L, et al. Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? *Transplant Proc*. 2004 May;36(4):877-9.
58. Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet*. 2002 Mar 2;359(9308):741-6.
59. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant*. 1996 Feb;10(1 Pt 2):77-84.
60. Group. TTMMrTS. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1996;61(7):1029-37.
61. Bernabeu-Wittel M, Naranjo M, Cisneros JM, Canas E, Gentil MA, Algarra G, et al. Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;21(3):173-80.
62. Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant*. 2004 Oct;18(5):485-92.
63. Neto MP. Desenvolvimento de tecnologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta-eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais. . São Paulo: HC-FMUSP; 2010.

64. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995 Aug 15;60(3):225-32.
65. Remuzzi G, Lesti M, Gotti E, Ganeva M, Dimitrov BD, Ene-Iordache B, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation (MYSS): a randomised trial. *Lancet*. 2004 Aug 7-13;364(9433):503-12.
66. Shah S, Collett D, Johnson R, Thuraisingham RC, Raftery MJ, Rudge CJ, et al. Long-term graft outcome with mycophenolate mofetil and azathioprine: A paired kidney analysis. *Transplantation*. 2006 Dec 27;82(12):1634-9.
67. Schold JD, Kaplan B. AZA/tacrolimus is associated with similar outcomes as MMF/tacrolimus among renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009 Sep;9(9):2067-74.
68. Saúde. MdS-Pd. Disponível em [http:// portal. saude. gov. br/ portal/ aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=28107](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=28107) Acessado em 01/set/2006.
69. Gearry RB, Barclay ML, Roberts RL, Harraway J, Zhang M, Pike LS, et al. Thiopurine methyltransferase and 6-thioguanine nucleotide measurement: early experience of use in clinical practice. *Intern Med J*. 2005 Oct;35(10):580-5.
70. Secretaria de Ciência TeleEds. Programa Nacional de Gestão de Custos. Brasília -DF2006.
71. Marcelo Eidi Nita ACCC, Silvia Regina Secoli, Flavia Mori Sarti, Moacyr Roberto Cuce Nobre, Anna Maria Niccolai Costa, Suzane Kioko Ono Nita, Flair José Carrilho e colaboradores. Avaliação de tecnologias em saúde. 1 ed. Artmed, editor. São Paulo2010.
72. Chocair P. Comunicação dos exames realizados de rotina para pacientes com transplante no rim no HC-FMUSP via internet. pedrochocair@yahoo.com.br [mensagem pessoal] [citado 29 de abril de 2011]. E-mail para Paulo Dominguez Nasser (pdnasser@gmail.com).
73. Zhang JP, Zhou SF, Chen X, Huang M. Determination of intra-ethnic differences in the polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase in Chinese. *Clin Chim Acta*. 2006 Mar;365(1-2):337-41.
74. Roberts RL, Barclay ML, Gearry RB, Kennedy MA. A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of

common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutations. *Clin Chim Acta*. 2004 Mar;341(1-2):49-53.

75. Hall TA. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucl Acids Symp Ser* 1999;41: 95- 8

76. Altschul SF, GW, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool *J Mol Bio* 1990;5;215(3):403-10

77. Beinguelman B. Genética de populações humanas. on-line Disponível em <http://www.sbgorgbr2008>.

78. Saúde Md. Disponível em [http:// www. cisamusep. org. br/credenciamento2011/tabela_sus.pdf](http://www.cisamusep.org.br/credenciamento2011/tabela_sus.pdf) Acessado em Janeiro de 2011.

79. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, D'Antico S, Giaccone M, Avagnina A, et al. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics*. 2009 Nov;10(11):1753-65.

80. Loit E, Tricco AC, Tsouros S, Sears M, Ansari MT, Booth RA. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clin Biochem*. 2011 Mar 21.

81. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, et al. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Oct 15;28(8):973-83.

82. Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. Thiopurine methyltransferase activity and efficacy of azathioprine immunosuppression in transplant recipients. *Adv Exp Med Biol*. 1991;309A:61-4.

83. Ford L, Kampanis P, Berg J. Thiopurine S-methyltransferase genotype-phenotype concordance: used as a quality assurance tool to help control the phenotype assay. *Ann Clin Biochem*. 2009 Mar;46(Pt 2):152-4.

84. Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Boulieu R, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy. *Clin Chem*. 2005 Nov;51(11):2074-84.

85. Derijks LJ, van Helden RB, Hommes DW, Stokkers PC. Dosing azathioprine in thiopurine S-methyltransferase deficient inflammatory bowel disease patients. *Gut*. 2008 Jun;57(6):872.
86. Dervieux T, Boulieu R. Identification of 6-methylmercaptopurine derivative formed during acid hydrolysis of thiopurine nucleotides in erythrocytes, using liquid chromatography-mass spectrometry, infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance assay. *Clin Chem*. 1998 Dec;44(12):2511-5.
87. Alvarez Beltran M, Infante Pina D, Tormo Carnice R, Segarra Canton O, Redecillas Ferreiro S. [Optimising azathioprine treatment: determination of thiopurine methyltransferase activity and thiopurine metabolites]. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Feb;70(2):126-31.
88. Ooi CY, Bohane TD, Lee D, Naidoo D, Day AS. Thiopurine metabolite monitoring in paediatric inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Apr 15;25(8):941-7.
89. Evans WE. Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit*. 2004 Apr;26(2):186-91.
90. Dervieux T, Medard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, et al. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol*. 1999 Dec;48(6):793-800.
91. Gardiner SJ, Begg EJ, Barclay ML, Kirkpatrick CM. Genetic polymorphism and outcomes with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Adverse Drug React Toxicol Rev*. 2000 Dec;19(4):293-312.
92. Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, et al. Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2011 Jun 21;154(12):814-23, W-295-8.
93. Tamori A, Shinzaki M, Kosaka S, Hayashi T, Iwai S, Enomoto M, et al. Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism in Japanese patients with autoimmune liver diseases. *Liver Int*. 2007 Feb;27(1):95-100.
94. Zabala-Fernandez W, Barreiro-de Acosta M, Echarri A, Carpio D, Lorenzo A, Castro J, et al. A pharmacogenetics study of TPMT and ITPA genes detects a relationship with side effects and clinical response in patients with inflammatory bowel disease receiving azathioprine. *J Gastrointest Liver Dis*. 2011 Sep;20(3):247-53.

95. Dorababu P, Nagesh N, Linga VG, Gundeti S, Kutala VK, Reddanna P, et al. Epistatic interactions between thiopurine methyltransferase (TPMT) and inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) variations determine 6-mercaptopurine toxicity in Indian children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011 Oct 19.
96. Xin HW, Xiong H, Wu XC, Li Q, Xiong L, Yu AR. Relationships between thiopurine S-methyltransferase polymorphism and azathioprine-related adverse drug reactions in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009 Mar;65(3):249-55.
97. Song DK, Zhao J, Zhang LR. TPMT genotype and its clinical implication in renal transplant recipients with azathioprine treatment. *J Clin Pharm Ther*. 2006 Dec;31(6):627-35.
98. Fabre MA, Jones DC, Bunce M, Morris PJ, Friend PJ, Welsh KI, et al. The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms on azathioprine dose 1 year after renal transplantation. *Transpl Int*. 2004 Oct;17(9):531-9.
99. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger UM, Schwab M. Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT*20, *21, *22) - association with decreased enzyme function. *Hum Mutat*. 2006 Sep;27(9):976.
100. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*. 2006;57:119-37.
101. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 1997 Jul;62(1):60-73.
102. McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J, Indalo A, Ameyaw MM, Powrie RH, et al. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics*. 1999 Dec;9(6):773-6.
103. Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, et al. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*. 1999 Feb;9(1):37-42.
104. Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet*. 1999 Feb;8(2):371-6.

105. Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, Agatsuma Y, Mizugaki M. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat Res.* 2000 Mar 14;448(1):91-5.
106. Okada Y, Nakamura K, Kodama T, Ueki K, Tsukada Y, Maezawa A, et al. Thiopurine methyltransferase genotype and phenotype status in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Biol Pharm Bull.* 2005 Nov;28(11):2117-9.
107. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet.* 2001 Jan;68(1):281-6.
108. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ. Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Aug;70(2):165-74.
109. Larovere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, De Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem.* 2003 Jul;40(Pt 4):388-93.
110. Alvarez LL, Venegas SM, Larrondo LM, Becerra BN, Castro LA, Quera PR. [Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism in Chilean blood donors]. *Rev Med Chil.* 2009 Feb;137(2):185-92.
111. Schutz E, von Ahsen N, Oellerich M. Genotyping of eight thiopurine methyltransferase mutations: three-color multiplexing, "two-color/shared" anchor, and fluorescence-quenching hybridization probe assays based on thermodynamic nearest-neighbor probe design. *Clin Chem.* 2000 Nov;46(11):1728-37.
112. Lu Y, Kham SK, Tan PL, Quah TC, Heng CK, Yeoh AE. Arrayed primer extension: a robust and reliable genotyping platform for the diagnosis of single gene disorders: beta-thalassemia and thiopurine methyltransferase deficiency. *Genet Test.* 2005 Fall;9(3):212-9.
113. Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M. Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem.* 2008 Oct;54(10):1637-47.
114. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Mar;89(3):387-91.