

Continguts: www.acclc.cat/ivv_docs.php?any=2015*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php

Revisió

Anàlisi genètica de l'enzim tiopurina S-metiltransferasa (TPMT)

Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic
Secció de Genètica Molecular ¹

Bárbara Fernández Cidón, Mónica Carrattini, Beatriz Candás Estébanez, Raül Rigo Bonnin,
Pedro Alía Ramos, Ariadna Padró Miquel

Laboratori Clínic, IDIBELL—Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospital de Llobregat

¹Membres de la Secció de Genètica Molecular durant la preparació d'aquest document: P. Alía Ramos, A. Arbiol Roca, N. Baena Díez, B. Belosillo Paricio, B. Candás Estébanez, B. Fernández Cidón, M. Jiménez Navajas, A. Matilla Dueñas, C. Montoriol Sabaté, A. Padró Miquel (coordinadora)

2016 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

1. Introducció

Els fàrmacs anàlegs de les purines —azatioprina, mercaptopurina i tioguanina— són profàrmacs que s'inactiven a través de l'enzim tiopurina S-metiltransferasa (altrament anomenat TPMT, mercaptopurina metiltransferasa, tiopurina metiltransferasa o 6-tiopurina transmetilasa) (1). Majoritàriament, els pacients presenten una activitat normal d'aquest enzim, però en aproximadament un 11 % dels casos, aquesta activitat és intermèdia o fins i tot deficient (2). Els pacients que tenen una activitat reduïda o inexistent de TPMT i que es tracten amb les dosis estàndards dels fàrmacs anàlegs de purines tenen un elevat risc de patir reaccions adverses greus. Per aquest motiu, les fitxes tècniques d'aquests fàrmacs inclouen la necessitat d'informar de l'activitat de l'enzim abans de la prescripció, per tal d'ajustar la dosi o bé canviar d'estratègia terapèutica. El laboratori clínic pot mesurar l'activitat de l'enzim o bé estudiar les variants genètiques que conté el gen *TPMT* i que determinen l'activitat enzimàtica.

L'objectiu d'aquesta revisió és exposar els avantatges i inconvenients de cada estratègia.

2. Fàrmacs tiopurínics: mecanisme d'acció

Hi ha tres fàrmacs tiopurínics —anàlegs de purina— que s'usen clínicament: la **6-tioguanina**, l'**azatioprina** i la **6-mercaptopurina**.

Rutes metabòliques dels fàrmacs tiopurínics

Tal com es pot observar a la Figura 1, el pro-fàrmac azatioprina és ràpidament convertit, mitjançant una reacció no enzimàtica, a 6-mercaptopurina, la qual està sotmesa a tres vies de metabolització: la primera mitjançant l'enzim xantina oxidasa, pròpia de la metabolització de les purines, produeix el metabòlit inactiu àcid 6-tioúric. La segona de les vies de metabolització té lloc mitjançant el TPMT, el qual catalitza la producció del segon metabòlit inactiu, la 6-metilmercaptopurina. Finalment, la tercera via està catalitzada per l'enzim hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa, i genera 6-tioinosina monofosfat. Aquest té tres vies de metabolització. La primera, convertint-se en **nucleòtids de tioguanina** mitjançant els enzims inosina-5-monofosfat deshidrogenasa i guanina monofosfat sintetasa. La segona, metilant-se a **6-metilmercaptopurina ribonucleòtids** mitjançant TPMT. I la tercera, fosforilant-se a **6-tioinosina trifosfat** mitjançant l'enzim reversible inosina trifosfatasa. Aquests tres darrers metabòlits són actius (3).

Pel que fa a la 6-tioguanina, s'inactiva a través de TPMT, i es converteix directament en el metabòlit actiu mitjançant l'enzim hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa.

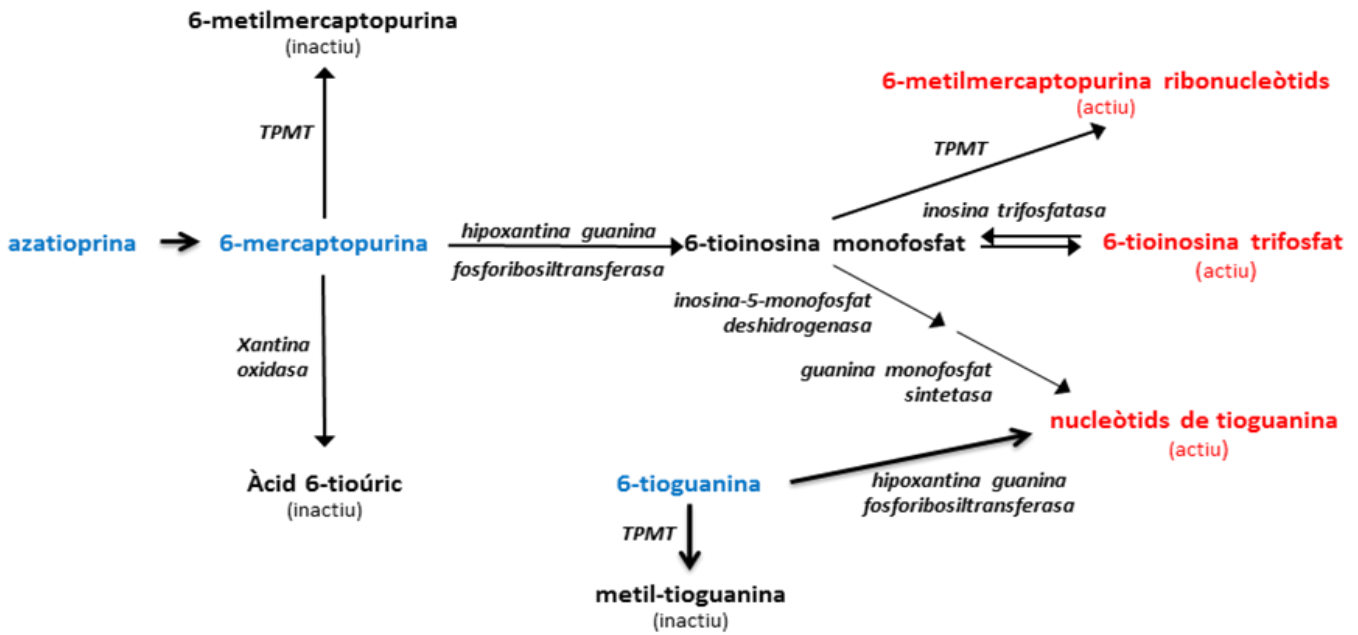


Figura 1. Via metabòlica on està implicat l'enzim tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) (3, 4). Els fàrmacs tiopurínics —azatioprina, 6-mercaptopurina i 6-tioguanina— estan marcats amb blau. Els metabòlits actius estan marcats en vermell.

Mecanismes d'acció

El mecanisme d'acció dels fàrmacs tiopurínics es basa en el bloqueig seqüencial de la síntesi de l'ADN, induint un efecte citotòxic tardà. Per una banda, a través dels seus metabòlits s'inhibeix la ruta enzimàtica necessària per la biosíntesi de les purines, que al seu torn són necessàries per a la síntesi de l'ADN i de l'ARN. Aquesta inhibició de la síntesi de nucleòtids púrics afavoreix que el cicle cel·lular quedi retingut a la fase S (5, 6, 7).

Per altra banda els fàrmacs tiopurínics donen lloc als nucleòtids de tioguanina, els quals s'incorporen a la cadena de l'ADN com a nucleòtids 6-metilguanina (6-mTG) en lloc de guanina. La retenció del cicle a la fase S afavoreix aquest fenomen. Un cop s'ha incorporat la 6-mTG a la cadena de l'ADN, les cèl·lules passen a l'estadi G2 on tornen a quedar retingudes. En aquest moment és quan es produeix la citotoxicitat tardana que es reverteix una vegada s'ha retirat la teràpia.

La introducció d'un nucleòtid de 6-mTG produeix una pèrdua de l'aparellament específic de la polimerasa. L'ADN polimerasa en trobar-se amb la 6-mTG introdueix nucleòtids de timina amb major eficiència que els nucleòtids de citosina. Aquest canvi no és reconegut pel sistema de reparació post-replicatiu MutS, i la mutació G>A acaba persistint allà on inicialment hi havia nucleòtids de guanina. Conseqüentment es produeixen molts errors al codi de l'ADN, fet que condueix a un efecte citotòxic tardà, i a la mort cel·lular (8, 9, 10).

Aplicacions

L'efecte citotòxic s'observa predominantment en les cèl·lules de ràpid creixement, com les del sistema immunològic. L'efecte inhibitori de la proliferació cel·lular dels leucòcits es fa servir per a la immunosupressió en pacients sotmesos a trasplantament d'òrgans. S'utilitza també en el tractament de diversos tipus de càncer, com la leucèmia limfoblàstica aguda, i en el tractament de malalties autoimmunitàries, com l'artritis reumatoide o la malaltia inflamatòria intestinal o malaltia de Crohn. Més concretament, encara que tots tres fàrmacs comparteixen la majoria d'efectes farmacològics, la mercaptopurina i

l'azatioprina s'empren en les malalties immunològiques no malignes, l'azatioprina s'usa en els tumors limfoides malignes, i la tioguanina per al tractament de les leucèmies mieloides (11).

3. Enzim tiopurina S-metiltransferasa

La tiopurina S-metiltransferasa (EC 2.1.1.67) és un enzim citosòlic present a la major part de teixits humans i que catalitza la S-metilació d'un grup de compostos coneguts com a sulfhidrils heterocíclics i aromàtics (12, 13). La seva funció biològica a l'organisme és desconeguda i encara no s'ha pogut identificar cap substrat endogen (14, 15). En canvi, la seva funció amb compostos exògens és ben coneguda: aquest enzim forma part de la cascada de metabolització de fàrmacs tiopurínics, i concretament catalitza la reacció de tiopurina a S-metil-tiopurina amb l'addició de S-adenosil-L-metionina i l'alliberament de S-adenosil-L-homocisteïna (Figura 2). Aquest darrer producte produeix una retroalimentació negativa de l'activitat enzimàtica.

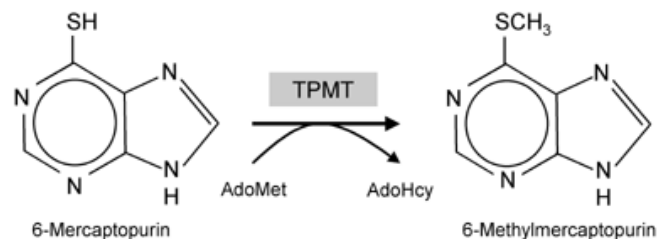


Figura 2. Reacció enzimàtica del TPMT, mitjançant la qual s'afegeix un grup metil a la tiopurina. El donador del grup metil és la S-adenosil-L-metionina (AdoMet), la qual es transforma en S-adenosil-L-homocisteïna (AdoHcy). Imatge extreta de http://www.medical-genetics.de/uploads/pics/TPMT_01.png

Tal com es pot observar a la Figura 1, l'enzim TPMT és imprescindible pel correcte metabolisme dels fàrmacs anàlegs de les purines. La major part de pacients presenten una activitat

normal de TPMT, però en aproximadament l'11 % l'activitat de TPMT és reduïda (intermèdia) i un 0,3 % la té baixa o quasi nul·la. El dèficit d'activitat de TPMT dona lloc a una acumulació del metabòlit actiu 6-mercaptopurina i una proporció major d'aquest es converteix en nucleòtids de tioguanina citotòxics, fet que incrementa el risc d'efectes adversos, especialment la toxicitat hematopètica per la mielosupressió, provocant leucopènia, neutropènia, anèmia, trombocitopènia, i en els casos més greus, pancitopènia. Encara que la toxicitat hematopètica pot tenir lloc en qualsevol pacient que es tracta amb aquest grup de fàrmacs tiopurítics, les persones amb deficiència de TPMT es troben amb un risc molt major de presentar aquesta complicació. Aquest dèficit està causat per diverses mutacions puntuals del gen TPMT (14).

Hi ha un altre fàrmac emprat en quimioteràpia, el **cis-platí**, que provoca l'apoptosi cel·lular mitjançant l'alteració de la mitosi cel·lular. S'intercala a loci bàsics de l'ADN i interfereix en la seva estructura. Existeix certa controvèrsia sobre si la variabilitat interindividual de l'ototoxicitat que provoca aquest fàrmac en el 40-60 % dels pacients, podria estar relacionada amb variants genètiques dels gens TPMT i catecol O-metiltransferasa (COMT) (16, 17). Aquesta associació no s'ha pogut validar de forma definitiva, i de fet, Heigletner *et al.* van presentar una metaanàlisi on conclouen que la influència genètica en el desenvolupament de la pèrdua auditiva no és determinant (18). Per tot això, la fitxa tècnica del cis-platí només conté un avís conforme factors genètics com les variants en el gen TPMT podrien contribuir a l'ototoxicitat per cis-platí, tot i que aquesta associació no s'ha pogut replicar en diversos estudis científics, ni diverses poblacions (19).

4. Gen TPMT: variants al·lèliques i toxicitat

L'enzim tiopurina S-metiltransferasa està codificat pel gen TPMT (NM_000367.2) format per 27 kb i 9 exons. Està ubicat al cromosoma 6, al locus 6p22.3.

El dèficit de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim està causat per diverses mutacions al gen TPMT. Com que la seva activitat s'hereta com un tret monogènic co-dominant, hi ha tres graus de funcionalitat enzimàtica. Aproximadament el 89 % de la població caucàsica té una activitat enzimàtica elevada i no presenta cap d'aquestes variacions genètiques (són homozigots per l'al·lel natural (*wild type allele* en anglès), anomenat TPMT*1). Els individus heterozigots i per tant amb un al·lel no funcional (un 11 % dels individus aproximadament) tenen una activitat enzimàtica intermèdia. Finalment els individus homozigots mutats o amb heterozigosi combinada en els dos al·lells tenen una activitat molt baixa o quasi nul·la i representen un 0,3 % de la població (20).

La darrera actualització de la base de dades de variacions de seqüència del gen TPMT inclou fins a 38 variants al·lèliques diferents (21), la major part de les quals estan associades a una activitat disminuïda de l'enzim en estudis *in vitro*, però només unes quantes s'han pogut relacionar amb efectes clínics. L'al·lel normal (*wild type*) s'anomena **TPMT*1**, i és el més freqüent (96,1 % en població mediterrània). La variació de seqüència més prevalent al nostre entorn és la **TPMT*3A** (2,5 % dels individus) que inclou dues mutacions amb canvi de sentit (*missense* en anglès) al mateix al·lel, el canvi c.460G>A (p.Ala154Thr, rs1800460) a l'exó 7 anomenat **TPMT*3B** i el canvi c.719A>G (p.Tyr240Cys, rs1142345) a l'exó 10 anomenat **TPMT*3C**. Aquests dos SNPs també poden presentar-se per separat, però amb una freqüència molt menor: TPMT*3B (0,4 %) i TPMT*3C (0,5 %). **TPMT*2** és una variant que inclou també un canvi a la seqüència d'aminoàcids (p.Ala80Pro, c.238G>C, rs1800462) i produeix una reducció de l'activitat enzimàtica. Es troba amb una freqüència del 0,4 % en població mediterrània (22). També hi ha

descrites moltes altres variacions de seqüència amb freqüències molt menors (<0,02 % en població caucàsica).

Es considera que les variants al·lèliques *2, *3A, *3B, *3C i *4 no són funcionals i per tant donen lloc a un enzim amb activitat nul·la. En canvi, les variants al·lèliques *5, *6, *8, *9, *10, *11, *12, *13, *16, *17, *18 es creu que molt probablement causen una reducció de l'activitat enzimàtica, sense arribar a ser nul·la. Són tan poc freqüents, però, que els estudis no són encara definitius. L'efecte que produeixen les restants variants al·lèliques és desconegut o bé contradictori en les diverses publicacions que l'estudien (22).

Els individus que hereten dos al·lells no funcionals de l'enzim TPMT tractats amb dosis estàndard d'azatioprina, 6-mercaptopurina o 6-tioguanina, es troben amb un risc del 100 % de desenvolupar mielosupressió, hemorràgia, infecció i mort associada a una major concentració de nucleòtids de tioguanina als hematies.

Pel que fa als portadors d'un sol al·lel no funcional, entre el 40 i el 70 % toleren les dosis habituals. Aquesta millor tolerància a les tiopurines és atribuïda a una menor concentració de ribonucleòtids de 6-metilmercaptopurina, un dels tres metabòlits actius, causant conseqüentment menys efectes tòxics (23). Tot i això, els pacients heterozigots tenen un risc significativament més gran de toxicitat que els pacients amb els dos al·lells funcionals.

En més del 20 % dels pacients amb malaltia inflamatòria intestinal se suspèn la teràpia tiopurínica per causa de reaccions adverses greus com la leucopènia. Coenen *et al.* (24) van dur a terme un estudi prospectiu per determinar si l'anàlisi del genotip del gen TPMT abans del tractament (i la subseqüent selecció de la dosi), milloraria els efectes adversos dels pacients amb aquesta malaltia. Segons els autors, va haver-hi una disminució de 10 vegades en les reaccions adverses greus hematològiques en els pacients portadors de variants que van ser identificades i van rebre una reducció de la dosi, en comparació amb portadors de variants als quals no es va modificar la dosificació, sense diferències en l'eficàcia del tractament farmacològic.

La toxicitat associada a les variants al·lèliques és el que ha portat a plantejar l'avaluació prèvia dels pacients que necessiten tractament amb fàrmacs tiopurítics. El cribatge de l'activitat del TPMT té la finalitat d'identificar els pacients que estan en risc de mielosupressió severa quan són tractats amb dosis estàndard d'aquests medicaments.

5. Correlació entre genotip i fenotip

La utilitat del genotip en la determinació del dèficit de TPMT depèn de la seva correlació amb l'activitat d'aquest enzim. Hi ha una forta evidència científica que relaciona el genotip amb el fenotip. La dosificació en funció del genotip ha demostrat una reducció dels efectes adversos sense comprometre l'efecte terapèutic en diversos àmbits clínics (11). La majoria dels estudis realitzats en la població sana aporten dades de concordança del 98,4 % (25). Aquests percentatges disminueixen en els pacients amb activitats enzimàtiques intermèdies fins al 86 %. En un estudi de pacients afectats de malaltia inflamatòria intestinal amb activitats anormals de l'enzim TPMT, l'anàlisi genètica de les mutacions amb una prevalença superior a l'1 % va presentar una especificitat del 100 %, mentre que la sensibilitat estimada per la detecció de mutacions en heterozigosi i homozigosi (14) variava des del 70,3 % (IC 95 % = 54,5 % – 70,9 %) fins al 86,2 % (IC 95 % = 78,5 % – 96,3 %).

La disminució del nombre de casos amb dèficit de TPMT identificats pel genotip és a causa de la presència de portadors de mutacions amb una prevalença baixa que no són estudiades a l'anàlisi genètica. A més a més, els estudis de genètica molecular emprats en la detecció de mutacions en heterozigosi només

permeten conèixer la presència o absència d'aquestes variants, però no la seva localització al·lèlica. Per exemple un pacient portador de les mutacions *3B i *3C pot presentar un fenotip intermedi si ambdues mutacions es troben en CIS (al·lel *3A), o un dèficit complet de l'activitat enzimàtica si es troben en TRANS. Per poder determinar la localització al·lèlica d'aquestes variants s'ha de fer un estudi de lligament.

El darrers estudis intenten relacionar l'agressivitat del fenotip amb la presència de determinades mutacions puntuals. Lenard *et al.* (26) van publicar recentment un article en el qual es va realitzar l'estudi genètic a 1334 pacients afectats de leucèmia limfoblàstica en tractament amb derivats de tiopurina. Els pacients portadors de la mutació en heterozigosi *1/*3C van presentar un fenotip més agressiu amb una major incidència d'episodis en comparació amb altres individus heterozigots per altres genotips, *1/*3A, *1/*2, *1/*21, 1/*9*, *1/*32, *1/*33, *1/*34.

6. Estudis de laboratori, fenotip *versus* genotip

El laboratori clínic pot fer una estimació de l'activitat enzimàtica de la TPMT mitjançant dos estudis, quantificant alguns metabòlits de TPMT intraeritrocitari, o bé genotipant les variants més freqüents del gen.

La determinació de l'activitat de l'enzim TPMT es basa en el mesurament de la concentració dels metabòlits actius (metil-tioguanina i metil-mercaptapurina) producte de l'acció de la TPMT en la degradació dels derivats de tiopurina (Figura 1) als eritròcits. L'etapa preanalítica és un pas clau en l'anàlisi de la mostra. És necessari un pretractament complex que suposa la separació, neteja i la lisi dels hematies. La concentració dels metabòlits es pot determinar mitjançant mètodes de radioimmunoanàlisi i cromatogràfics. Els mètodes basats en HPLC (acrònim de l'anglès *high performance liquid chromatography*) acoblats en tàndem a un espectròmetre de masses o a un detector d'ultraviolat (UV) són els més emprats per la seva elevada practicabilitat (27, 28). Els coeficients de regressió entre aquests mètodes són al voltant de 0,7.

Per altra banda, es recomana iniciar l'anàlisi genètica de les variants del gen TPMT per l'estudi dels al·lèls no funcionals més comuns, en funció de l'àrea geogràfica. Habitualment s'empra la PCR (acrònim de l'anglès *polymerase chain reaction*) a temps real amb discriminació al·lèlica, encara que no existeixen recomanacions en guies clíniques sobre quina és la millor estratègia diagnòstica (2). Al nostre entorn, les variants *2, *3A, *3B i *3C es presenten en la gran majoria dels pacients amb una activitat intermèdia o bé nul·la de l'enzim. No s'han descrit grans delecions o duplicacions en aquest gen associades a una disminució en l'activitat del TPMT. Coenen *et al.* (24) van publicar un article l'any 2015 on no es recomana la seqüenciació del gen TPMT. L'estudi va incloure 705 pacients caucàsics amb malaltia inflamatòria intestinal en tractament amb derivats de tiopurina. Es va determinar el genotip mitjançant l'ús de sondes TaqMan® (Applied Biosystems) i es va seqüenciar el gen complet de TPMT en 12 pacients que van presentar efectes adversos i no eren portadors de les mutacions més prevalents. Només en quatre d'ells es va detectar la variant TPMT*15 relacionada amb una disminució de l'activitat de TPMT. L'absència de variants en el gen TPMT en els pacients que van presentar efectes adversos s'explica per la variabilitat genotípica en altres gens que poden estar relacionats amb una disminució de l'activitat TPMT.

Inconvenients de l'estudi del fenotip i el genotip

La determinació del fenotip es considerava l'anàlisi de referència per a la detecció de dèficits de TPMT, però en els darrers anys les publicacions han deixat en evidència les limitacions d'aquest estudi, i l'anàlisi genètica ha demostrat (sola

o en combinació amb el fenotip) que permet millorar l'eficiència diagnòstica en el cribatge dels pacients amb una activitat anormal de l'enzim TPMT.

El fenotip es veu afectat per les transfusions de sang, pel tractament concomitant amb fàrmacs que inhibeixen l'activitat TPMT i per la falta d'estandardització dels procediments de mesura que impedeix la intercanviabilitat dels valors mesurats (14). El fet que no hi hagi calibradors traçables pren especial importància en un context on els valors discriminants són generalment de procedència bibliogràfica i d'àmbit universal. Destaca la manca de literatura científica abordant aquesta problemàtica.

L'activitat de l'enzim TPMT també pot estar influïda per factors exògens, incloent altres fàrmacs, com els diürètics o la pròpia azatioprina que pot induir l'activitat enzimàtica. La sulfasalazina i la mesalamina podrien tenir un efecte inhibitori (4).

Un altre dels seus desavantatges és l'augment de l'expressió de l'enzim TPMT en els eritròcits joves. Aquesta situació és comuna en pacients amb un augment de l'activitat eritropoietica que s'estan recuperant d'una pancitopènia secundària al tractament amb quimioteràpia o immunosupressors. La sobreestimació de l'activitat del TPMT en pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda o malaltia inflamatòria intestinal queda recollida en diverses publicacions (26, 27). L'error en la classificació d'aquests pacients pot suposar una dosificació inadequada del tractament amb un augment dels episodis secundaris a la mielotoxicitat dels derivats de la tiopurina.

Per una altra banda, el genotip també té els seus inconvenients. Com ja s'ha comentat anteriorment, l'anàlisi genètica no inclou les variants poc freqüents del gen TPMT i, tot i que encara està poc estudiat, també poden existir mutacions en altres gens que siguin les causants d'un dèficit en la síntesi de TPMT.

Què recomanen les guies internacionals ?

L'estudi del genotip i fenotip del TPMT hauria de realitzar-se prèviament a l'inici del tractament amb derivats de la tiopurina. Les recomanacions de dosificació segons les guies clíniques són les següents (11):

- Homozigots normals (genotip *1/*1): iniciar el tractament amb dosis normals i ajustar dosis segons les recomanacions de les guies clíniques en funció de la malaltia a tractar.
- Heterozigots (genotips *1/*2, *1/*3A, *1/*3B, *1/*3C, *1/*4): iniciar amb el 30-70 % de la dosis recomanada i incrementar-la en funció de la tolerància després de 2-4 setmanes.
- Homozigots mutats (genotips *3A/*3A, *2/*3A, *3C/*3A, *3C/*4, *3C/*2, *3A/*4): considerar un tractament alternatiu. Si és imprescindible emprar aquests fàrmacs, iniciar amb dosis dràsticament reduïdes (10 vegades menys concentrada i amb menor posologia). Cal fer una monitorització estricta del recompte de cèl·lules del sistema immunitari.

La revisió sistemàtica de les guies clíniques posa de relleu una gran variació en les recomanacions de les anàlisis de TPMT, però totes elles inclouen el genotip com a primer estudi, o recomanen la seva determinació conjuntament amb el fenotip. Burnett *et al.* va publicar l'any 2014 una revisió sistemàtica de les recomanacions contingudes en les guies clíniques referents a l'estudi del fenotip o genotip de TPMT publicades fins al moment (2). L'anàlisi del genotip està explícitament recomanada abans d'iniciar tractament amb tiopurines en les següents guies: la del CPIC (acrònim de l'anglès *Clinical Pharmacogenetics*

Implementation Consortium) recomana la determinació del fenotip en conjunció amb el genotip (11), la de la NACB (*National Academy for Clinical Biochemistry*) recomana únicament l'anàlisi genètica (30), la del COG (*Children's Oncology Group*) reconeix els avantatges del genotip en les transfusions de sang i recomana el fenotip únicament quan el genotip no és informatiu (31), la de la BAD (*British Association of Dermatologists*) recomana el genotip especialment en els pacients amb activitat fenotípica intermèdia i en les transfusions de sang (32) i la del NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) recomana també l'anàlisi genètica exclusivament (33).

7. Bibliografia

- (1) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/1/1/67.html> (Accés 2016-04-05).
- (2) HF Burnett, R Tanoshima, W Chandranipapongse, P Madadi, S Ito and WJ Ungar. Testing for thiopurine methyltransferase status for safe and effective thiopurine administration: a systematic review of clinical guidance documents. *Pharmacogenomics J* 2014;14:493-502.
- (3) R L Roberts, R B Geary, M L Barclay and M A Kennedy. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J* 2007;7:312–7.
- (4) Louis E, Belaiche J. Optimizing treatment with thioguanine derivatives in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:37-46.
- (5) Somerville L, Krynetski EY, Krynetskaia NF, Beger RD, Zhang W, Marhefka CA, *et al.* Structure and dynamics of thioguanine-modified duplex DNA. *J Biol Chem* 2003;278:1005–11.
- (6) Lepage GA. Basic biochemical effects and mechanism of action of 6-thioguanine. *Cancer Res* 1963;23:1202–6.
- (7) Krynetskaia NF, Krynetski EY, Evans WE. Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation into DNA. *Mol Pharmacol* 1999;56:841–8.
- (8) Wotring LL, Roti Roti JL. Thioguanine-induced S and G2 blocks and their significance to the mechanism of cytotoxicity. *Cancer Res* 1980;40:1458-62.
- (9) Nelson JA, Carpenter JW, Rose LM, Adamson DJ. Mechanisms of Action of 6-Thioguanine, 6-Mercaptopurine and 8-Azaguanine. *Cancer Res* 1975;35:2872-8.
- (10) Yuan B1, Wang Y. Mutagenic and Cytotoxic Properties of 6-Thioguanine, S6-Methylthioguanine, and Guanine-S6-sulfonic Acid. *J Biol Chem* 2008;283:23665-70.
- (11) Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:387-91.
- (12) The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43: D204-D212 (2015). <http://www.uniprot.org/uniprot/P51580> (Accés: 2016-04-07).
- (13) Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, *e. 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;58(4):694–702.
- (14) Lynne L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol* 2014;77:704–14.
- (15) Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol* 2010;63:288-95.
- (16) Yang JJ, Lim JY, Huang J, Bass J, Wu J, Wang C, Fang J, Stewart E, Harstead EH, E S, Robinson GW, Evans WE, Pappo A, Zuo J, Relling MV, Onar-Thomas A, Gajjar A, Stewart CF. The role of inherited TPMT and COMT genetic variation in cisplatin-induced ototoxicity in children with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94:252-9.
- (17) Ross CJ, Katzov-Eckert H, Dubé MP, Brooks B, Rassekh SR, Barhdadi A, Feroz-Zada Y, Visscher H, Brown AM, Rieder MJ, Rogers PC, Phillips MS, Carleton BC, Hayden MR; CPNDS Consortium. Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat Genet* 2009;41:1345-9.
- (18) Hagleitner MM, Coenen MJ, Patino-Garcia A, de Bont ES, Gonzalez-Neira A, Vos HI, van Leeuwen FN, Gelderblom H, Hoogerbrugge PM, Guchelaar HJ, Te Loo MW. Influence of genetic variants in TPMT and COMT associated with cisplatin induced hearing loss in patients with cancer: two new cohorts and a meta-analysis reveal significant heterogeneity between cohorts. *PLoS One* 2014;9(12):e115869.
- (19) U.S. Food and Drug Administration (FDA) label information for cisplatin and TPMT. PharmGKB Pharmacogenomics. Knowledge. Implementation. <https://www.pharmgkb.org/view/drug-label.do?id=PA166104853> (Accés: 2016-04-15).
- (20) Almoquera B, Vazquez L, Connolly JJ, Bradfield J, Sleiman P, Keating B, Hakonarson H. Imputation of TPMT defective alleles for the identification of patients with high-risk phenotypes. *Front Genet* 2014;5:96.
- (21) TPMT nomenclature committee. Linköping University. IMH-Insitutionene för medicin och hälsa. <http://www.imh.liu.se/tpmtalleles> (Accés: 2016-04-16).
- (22) Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Hicks JK, Schwab M, Klein TE; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93:324-5.
- (23) Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, Yang W, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85:164-72.
- (24) Coenen MJ, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, Derijks LJ, Vermeulen SH, Wong DR, Klungel OH, Verbeek AL, Hooymans PM, Peters WH, te Morsche RH, Newman WG, Scheffer H, Guchelaar HJ, Franke B. Identification of Patients With Variants in TPMT and Dose Reduction Reduces Hematologic Events During Thiopurine Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2015;149:907-17.
- (25) Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, Skidmore B, Sears M, Sy R, Karsh J. Assessment of Thiopurine S-Methyltransferase Activity in Patients Prescribed Thiopurines: A Systematic Review. *An Intern Med* 2011;154(12):814-23.
- (26) Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine dose intensity and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: the influence of thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. *Br J Haematol* 2015;169:228-40.
- (27) Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Bouliou R, Neri B, Seidman E. 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;51:2074-84.
- (28) Karim H, Appell ML, Fotoohi A. Comparison of three methods for measuring thiopurine methyltransferase activity in red blood cells and human leukemia cells. *J Chromatogr B* 2013;939:80-5.
- (29) Fong SC, Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Marinaki AM, Sanderson JD. Getting the best out of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Biomark Med* 2015;9:51–65.

-
- (30) Valdes R Jr., Payne DA, Linder MW. Clinical Practice Considerations. A: Laboratory Medicine Practice Guidelines: Laboratory Analysis and Application of Pharmacogenetics to Clinical Practice. Rockville: The National Academy of Clinical Biochemistry; 2010.
- (31) Children's Oncology Group (COG). AALL0232: High Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). A Phase III Group-Wide Study. Arcadia: Children's Oncology Group; 2008.
- (32) Meggitt SJ, Anstey AV, Mohd Mustapa MF, Reynolds NJ, Wakelin S. British Association of Dermatologists' guidelines for the safe and effective prescribing of azathioprine 2011. *Br J Dermatol* 2011;165:711–34.
- (33) National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia. Version 1.2012. Fort Washington: National Comprehensive Cancer Network; 2012.