

GABRIELA RONCONE GASTAL

**PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TIOPURINA  
METILTRANSFERASE (TPMT) NA POPULAÇÃO DE JOINVILLE**

DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA COMO REQUISITO  
FINAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E  
MEIO AMBIENTE, NA UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE.  
Orientador: Dr. Mauro de Souza Leite Pinho  
Co-orientador: Dr. Paulo Henrique Condeixa de França

JOINVILLE

2011

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Mauro de Souza Leite Pinho por ter me aceitado como sua orientanda, pelos ensinamentos, pela oportunidade de aprendizado e por todo apoio neste trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr. Paulo Henrique Condeixa de França e a Leslie Ecker Ferreira por todo auxílio, carinho e dedicação. Sem a ajuda de vocês dois e sem a paciência que tiveram em me ajudar em toda esta minha caminhada, meu trabalho não seria possível. Fica para sempre minha eterna gratidão e respeito, por serem dois profissionais excelentes, e em todo o meu percurso se mostraram incansáveis e sempre prontos a ajudar.

Agradeço a mestrandas Simone Moreira e a bolsista Caroline Furtado Noble pelo carinho, amizade e por todo o trabalho que tiveram para a execução desse projeto, pois sem elas esse trabalho não teria sido possível.

A todos os bolsistas, estagiários e alunos da Iniciação Científica que passaram pelo Laboratório nesse período fica meu agradecimento.

Agradecimento em especial a bolsista Thalita Girrani, que muito me ajudou no início do meu mestrado, mostrou sempre disponível e foi muito importante no desempenho do meu projeto.

Agradeço a Dra Ozenilda de Melo Carvalho, diretora do Hemocentro Regional de Joinville por ter permitido a coleta das amostras para esse trabalho e a todos os funcionários, pelo carinho e respeito com que me trataram.

Agradeço a todos os doadores de sangue do Hemocentro Regional de Joinville, que permitiram a inclusão nesse estudo.

Agradeço ao Professor Marco Moura pela ajuda na estatística desse projeto.

Agradeço a todos os meus colegas do mestrado, pela companhia nas aulas, pelos aprendizados, risadas e principalmente pela amizade que foi construída nesses dois anos.

Agradeço meu filho Matheus, por ter sido paciente e me ajudado muito nos momentos mais difíceis, em que tinha que abrir mão de brincadeiras e de atenção para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Agradeço a toda minha família, pelo carinho, dedicação e amor.

Enfim, muito obrigada a todos que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

**Resumo:** Os polimorfismos genéticos da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) representam um dos principais exemplos da importância da farmacogenética na individualização da terapia medicamentosa. A TPMT catalisa a S-metilação das drogas tiopurinas, como 6-Mercaptopurina (6-MP) e azatioprina, usadas para o tratamento de leucemias agudas, doenças auto-imunes, doença inflamatória intestinal e na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Embora sejam efetivas, as tiopurinas apresentam um índice terapêutico relativamente estreito e são capazes de causar toxicidade droga-induzida com risco de morte, especialmente mielossupressão. **Objetivos:** Avaliar a prevalência dos principais polimorfismos do gene *TPMT* na população de Joinville/SC. **Sujeitos e métodos:** A prevalência das variantes alélicas *TPMT*\*2 (238G>C), *TPMT*\*3A (460G>A e 719A>G), *TPMT*\*3B (460G>A) e *TPMT*\*3C (719A>G) foi investigada em população composta de 197 doadores de sangue utilizando-se enzimas de restrição (PCR-RFLP) e PCR alelo-específico. **Resultados:** Variantes do gene *TPMT* foram detectadas em 12 sujeitos (6,1%), todos dispostos em perfil heterozigoto (*TPMT*\*1/\*2 em dois sujeitos (1,01%), *TPMT*\*1/\*3A em seis (3,04%), *TPMT*\*1/\*3B em dois (1,01%), *TPMT*\*1/\*3C em um (0.5%) e *TPMT*\*3A/\*3C em um (0.5%)). O genótipo selvagem (*TPMT*\*1/\*1) foi encontrado em 93,9% dos indivíduos estudados. **Conclusões:** Genótipos não-*TPMT*\*1, relacionados à maior susceptibilidade à mielossupressão, foram identificados em 6,1% da amostra populacional estudada. A identificação prévia destes poderia contribuir para a prevenção da ocorrência de complicações associadas ao uso de tiopurinas.

## ABSTRACT

**Background:** Genetic polymorphisms of Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) represent the importance of pharmacogenetics regarding individualized drug therapy. TPMT catalyses the S-methylation of thiopurine drugs such as 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine, used to treat childhood leukemia, autoimmune diseases, inflammatory bowel disease and organ transplant recipients. Despite their effectiveness, thiopurines have a narrow therapeutic index and may cause life-threatening drug-induced toxicity such as myelosuppression. **Aim:** To assess the prevalence of *TPMT* gene polymorphism in the population of Joinville/SC. **Subjects and Methods:** The frequency of four allelic variants of the *TPMT* gene, *TPMT* \*2 (238G>C), *TPMT* \*3A (460G>A and 719A>G), *TPMT*\*3B (460G>A) and *TPMT* \*3C (719A>G) were analyzed in 197 blood donors of Joinville/SC, using restriction fragment length polymorphism (RFLP) and allele-specific PCR-based assays. **Results:** *TPMT* gene heterozygous variants were detected in 12 subjects (6,1%). *TPMT*\*1/\*2 in two subjects (1,01%), *TPMT*\*1/ \*3A in six (3,04%), *TPMT*\*1/\*3B in two (1,01%), *TPMT*\*1/\*3C in one (0,5%) and *TPMT*\*3A/\*3C in one (0,5%). The normal allele (*wild-type*) was found in 93,9% of the individuals studied. **Conclusion:** The prevalence of *non-TPMT*\*1 polymorphisms in 6,1% in the population sample analyzed in the present study suggests the potential role of this test in the prevention of myelosuppression by thiopurine drugs.

## LISTA DE ABREVIações

6-Me-Thio-IMP – S - metil-tioinosina 5'-monofosfato

6-MP - 6-mercaptopurina

6-MMP - 6-metilmercaptopurina

6-TGN- nucleotídeos da 6-tioguanina

6-TG – 6-tioguanina

Ala - Alanina

Arg – Arginina

AZA - Azatioprina

Cis - Cisteína

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos

dGS - deoxo-6-tioguanina 5' trifosfato

DNA - Ácido Desoxiribonucléico

EDTA - Etilenodiaminotetracetato

Fen - Fenilalanina

Gli - Glicina

Gln- Glutamina

Glu - Ácido Glutâmico

GMP - Guanosina Monofosfato

His - Histidina

HGPRT - Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC - intervalo de confiança

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IMPDH - Inosina Monofosfato Desidrogenase

LLA - Leucemia Linfocítica Aguda

Leu - Leucina

Lis - Lisina

Met - Metionina

MMP - Metilmercaptopurina

MUT - Mutado

ng - nanogramas

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PNDS- síntese *de novo* das purinas

Pro - Prolina

RFLP - Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism")

RNA - Ácido Ribonucléico

SAM - S-adenosil metionina

Ser - Serina

SNP - Polimorfismo de base única

TIMP - Tioinosina 5'-monofosfato

Tir - Tirosina

TG- Tioguanina

TGN – Nucleotídeos da Tioguanina

TGMP - Tioguanosina Monofosfato

TPMT - Tiopurina Metiltransferase

TXMP- tioxantina monofosfato

Tre - Treonina

Tri - Triptofano

TXMP - Tioxantina Monofosfato

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WT - *wild- type* (selvagem)

Val - Valina

VNTR - Repetição em tandem de número variável

XO - Xantina Oxidase

μl - microlitro

μg - micrograma

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ÍNDICE DE TABELAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 GERAL.....	14
2.2 ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 TIOPURINAS.....	15
3.2 TIOPURINA METILTRANSFERASE .....	20
3.3 POLIMORFISMOS DA TIOPURINA METILTRANSFERASE .....	24
3.4 CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO .....	30
3.5 PREVALÊNCIAS NO MUNDO .....	31
3.6 PREVALÊNCIAS NO BRASIL .....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 TIPOS DE ESTUDO .....	35
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	35
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4.4 PROVENIÊNCIAS DOS SUJEITOS E AMOSTRAS.....	35
4.5 ANÁLISES MOLECULARES .....	37
4.5.1 Extração e purificação do DNA Genômico Humano.....	37
4.5.2 Detecção das Mutações no Gene <i>TPMT</i> Empregando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
4.5.3 Eletroforese.....	42
5 DISCUSSÃO E RESULTADOS .....	43
6 CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS.....	60

APÊNDICES.....67  
ANEXOS .....72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das drogas tiopurinas .....	15
Figura 2 - Mecanismo de ação das drogas tiopurinas .....	18
Figura 3 - Estrutura das tiopurinas .....	19
Figura 4 - Distribuição populacional da atividade da TPMT. ....	21
Figura 5 - Variantes alélicas predominantes do <i>locus</i> TPMT .....	26
Figura 6 - Representação esquemática do polimorfismo G460A .....	39
Figura 7- Representação esquemática do polimorfismo A719G .....	40
Figura 8- Representação esquemática do polimorfismo G238C .....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais variantes alélicas do gene <i>TPMT</i> .....	27
Tabela 2- Distribuição da frequência de alelos <i>TPMT</i> (%) em várias populações (EFRATI, 2009) .....	32
Tabela 3 - Comparação entre os estudos brasileiros .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

As drogas tiopurinas, representadas atualmente pela tioguanina (TG), azatioprina (AZA) e 6-mercaptopurina (6-MP), são amplamente utilizadas para tratar pacientes com várias doenças, como: leucemias linfoblásticas agudas (LENNARD *et al*, 1990), hepatite auto-imune, *miastenia gravis*, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais, pacientes com órgãos transplantados, entre outras (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

Entretanto, existe uma grande variabilidade entre a eficácia e a toxicidade dessas drogas. Essa grande variabilidade tem sido associada, em alguns pacientes, a presença de um polimorfismo no gene da tiopurina metiltransferase (TPMT).

A tiopurina metiltransferase é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo da mercaptopurina (6-MP) e azatioprina. Weinshilboum & Sladek (1980) demonstraram a existência de um polimorfismo genético de caráter autossômico co-dominante para a TPMT em humanos. O metabolismo da 6-MP é intensamente afetado por esses polimorfismos, os quais podem provocar uma ampla variação entre a eficácia e a toxicidade dessas drogas, muitas vezes impossibilitando o seu uso e levando a uma resposta imprevisível.

O principal efeito colateral em pacientes portadores destes polimorfismos é uma mielossupressão grave, a qual, embora seja revertida com a suspensão da droga, pode acarretar problemas muito graves, levando ao surgimento de processos infecciosos ou de sangramentos espontâneos com risco iminente de morte (KRYNETSKI *et al*, 1999; McLEOD *et al*, 2000).

A presença destes polimorfismos ajuda a explicar porque a mesma dose desta medicação pode não exercer qualquer efeito terapêutico em alguns pacientes, enquanto outros apresentam remissão completa do quadro clínico ou então efeitos colaterais graves (OTTERNESS, 1997).

Trata-se este de um importante exemplo sobre a relevância da farmacogenética, a qual busca analisar as influências genéticas sobre as respostas aos medicamentos.

Três polimorfismos mais freqüentemente encontrados no gene *TPMT*, denominados como *TPMT\*2*, *\*3A* e *\*3C*, tem sido relacionados na literatura mundial como prováveis causas da imprevisibilidade de resultados acima relatadas (SALAVAGGIONE *et al*, 2005; WANG, L & WEINSHILBOUM, 2006).

Enquanto sucessivas publicações em diferentes países têm demonstrado uma razoável variabilidade da incidência destes polimorfismos, raros estudos têm sido realizados no Brasil a este respeito.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Avaliar a prevalência dos principais polimorfismos do gene da tiopurina metiltransferase (TPMT) na população de Joinville.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar na população da cidade de Joinville a prevalência das quatro principais variantes alélicas do gene *TPMT*, descritas respectivamente como: *TPMT\*2* (238G>C), *TPMT\*3A* (460G>A e 719A>G), *TPMT\*3B* (460G>A) e *TPMT\*3C* (719A>G).

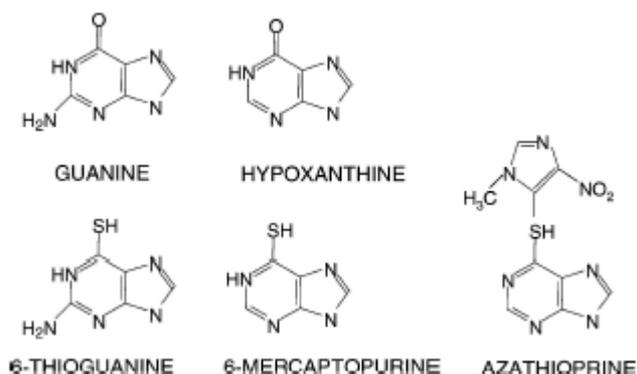
- Comparar esta prevalência com aquela referida na literatura para outras amostras populacionais.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 TIOPURINAS

As tiopurinas são substâncias utilizadas há mais de 45 anos na composição de medicamentos empregados para o tratamento de diversas doenças. Dentre estes, destacam-se a 6-mercaptopurina (6-MP) e a 6-tioguanina (6-TG), indicadas para o tratamento de leucemia aguda, e a azatioprina, amplamente utilizada como droga imunossupressora para tratamento de doenças inflamatórias intestinais, condições auto-imunes e seguimento de transplantes (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

Essas drogas foram originalmente sintetizadas por Gertrude Elion e George Hutchins, através da substituição do oxigênio por enxofre no carbono 6 da guanina (para produzir 6-TG) ou hipoxantina (para produzir 6-MP) (Figura 1) (COULTHARD & HOGARTH, 2005 apud ELION, 1967).



**Figura 1 - Estrutura das drogas tiopurinas**

(extraído de COULTHARD & HOGARTH, 2005)

As tiopurinas são drogas antimetabólicas, relacionando-se com componentes próprios das células. Elas interferem na disponibilidade de precursores dos nucleotídeos de purinas por competirem com eles na síntese do DNA ou RNA. Os seus efeitos citotóxicos são mais intensos na fase S do ciclo celular, ou seja, são ciclo-específico (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

Sua principal ação farmacológica deve-se à incorporação do metabólito ativo – o nucleotídeo da 6-tioguanina (6-TGN) – ao DNA das células. O 6-TGN possui estrutura análoga às bases púricas, adenina e hipoxantina (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

A 6-MP é análoga do nucleosídeo natural hipoxantina. Adicionalmente à tioguanina (6-TG), foram as primeiras moléculas análogas da purina que se mostraram eficazes como antineoplásicas. A azatioprina, uma molécula imunossupressora, exerce seu efeito *in vivo* após a conversão para 6-MP, sendo então o metabólito ativo da azatioprina também substrato para a enzima TPMT (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

As tiopurinas são administradas por via oral na forma de pró-fármaco e podem exercer seu efeito citotóxico por múltiplos caminhos. Elas requerem ativação pela hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) para exercer seu efeito citotóxico. A via da HGPRT é responsável pela formação dos derivados nucleotídeos de tioguanina que são incorporados ao DNA e ao RNA bloqueando a replicação celular (SAHASRANAMAN, 2008).

A 6-MP e a 6-TG são eliminadas através da biotransformação em metabólitos inativos. A 6-MP é catalisada pela Xantina Oxidase (XO) para ácido tiúrico, sendo este o primeiro metabólito identificado no plasma e na urina após sua administração. Outro caminho para biotransformação é a S-metilação da 6-MP para 6-

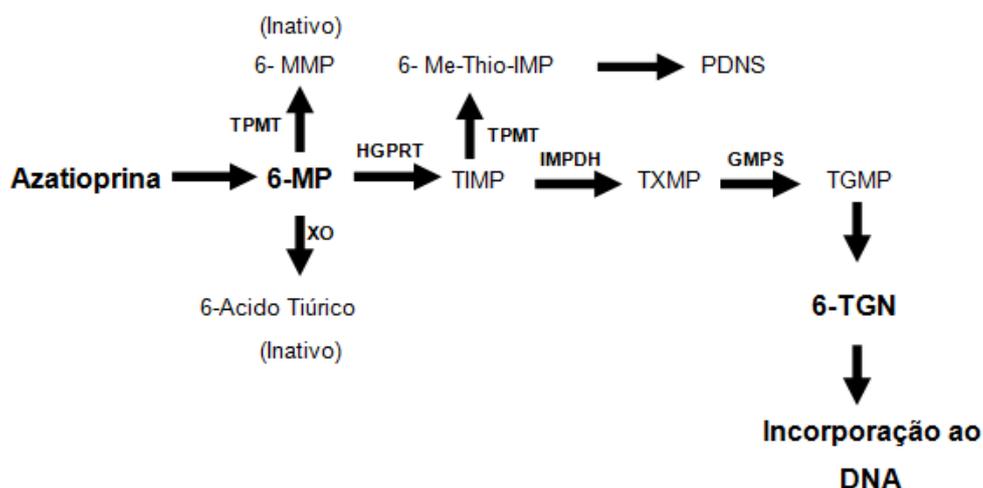
metilmercaptapurina (6-MMP) pela tiopurina metiltransferase (TPMT). A tiopurina metiltransferase inativa as tiopurinas através da metilação do grupo sulfidril na posição 6 usando S-adenosil-L-metionina como doador de metila. Devido à ausência de xantino oxidase a nível hematopoiético, a TPMT representa o principal caminho de inativação das tiopurinas nas células hematopoiéticas. Pacientes com deficiência adquirida da TPMT acumulam quantidades excessivas do ativo 6-TGN nas células sanguíneas quando tratados com doses convencionais da medicação (SAHASRANAMAN, 2008). A existência de um polimorfismo no gene *TPMT* é responsável pela grande diferença entre indivíduos observada na atividade enzimática da TPMT.

A metabolização da 6-MP para tioguanosina monofosfato (TGMP) é menos direta que para 6-TG, envolvendo duas enzimas adicionais – inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) e guanina monofosfato sintetase (GMP sintetase). Essa diferença é potencialmente importante porque o caminho intermediário da AZA/6-MP, tioinosina monofosfato (TIMP), pode agir como um substrato para TPMT, levando a produção de S-metil-tioinosina 5'-monofosfato (6-Me-Thio-IMP). 6-Me-Thio-IMP é um forte inibidor da síntese *de novo* das purinas (PNDS). A inibição da PNDS permite a obtenção da imunossupressão e bloqueio da proliferação de vários tipos de linfócitos. Desta forma, a significativa inibição do PNDS pela TIMP pode ser obtida *in vivo* depois da administração oral das tiopurinas e pode contribuir para efeito citotóxico da azatioprina e 6-MP (SAHASRANAMAN, 2008).

Como mostrado na figura 2, ambos 6-MP e azatioprina são convertidos para metabólitos ativos, 6-TG nucleotídeos (6-TGN), que são incorporados aos ácidos nucleicos celulares, resultando na inibição do nucleotídeo e síntese protéica, e inibição da proliferação de linfócitos. Estudos têm mostrado que o mecanismo de

ação da azatioprina e 6-MP pode incluir aumento da apoptose (ou morte celular programada) dos linfócitos T ativados (SAHASRANAMAN, 2008).

Tanto 6-MP como 6-TG são submetidos a intenso metabolismo antes de exercerem citotoxicidade após a incorporação ao DNA, como nucleotídeos da tioguanina (6-TGN), ou no caso da 6-MP pela inibição da síntese *de novo* das purinas (PNDS). Os nucleotídeos da tioguanina são então incorporados como bases nitrogenadas no DNA (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

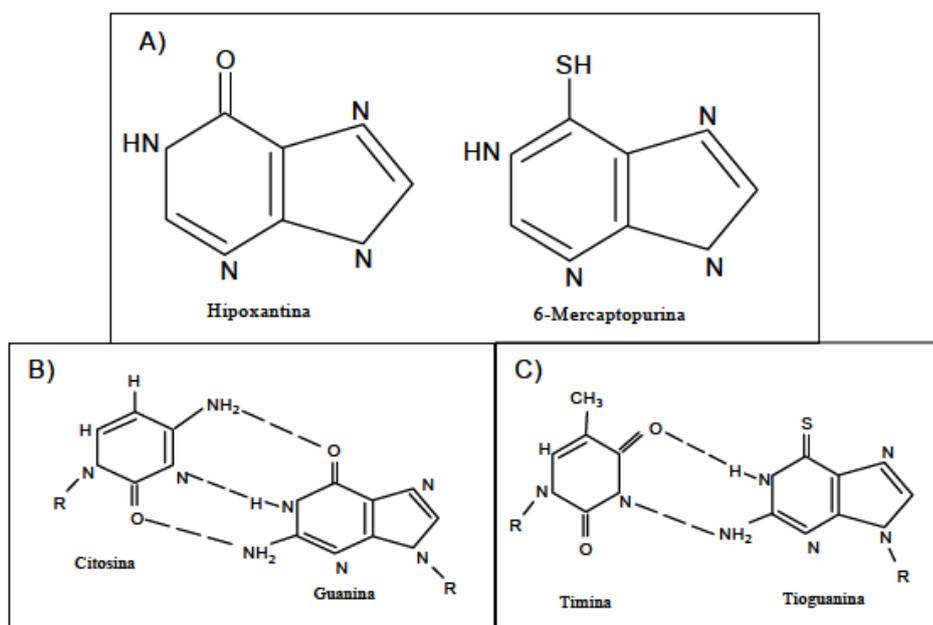


**Figura 2 - Mecanismo de ação das drogas tiopurinas**

**6-MP** – 6-Mercaptopurina; **TPMT** – tiopurina metiltransferase; **6-MMP**- 6-metilmercaptopurina; **XO**- xantino oxidase; **HGPRT** -hipoxantina-guanina fosforibosil transferase; **TIMP** – tioinosina 5'-monofosfato; **6-Me-Thio-IMP** – S-metil-tioinosina 5'-monofosfato; **PNDS** - síntese de novo purinas; **IMPDH** – inosina monofosfato desidrogenase; **TXMP** – tiioxantina monofosfato; **GMPS** – guanosina monofosfato sintetase; **TGMP** – tioguanosina monofosfato; **6-TGN** – nucleotídeos da tioguanina. (adaptado de COULTHARD & HOGARTH, 2005)

A incorporação dos metabólitos ativos da 6-MP ao DNA e RNA é considerada o principal mecanismo de ação das drogas tiopurinas. Os 6-TGN são incorporados ao DNA pareando-se incorretamente com a timina (Figura 3) Os 6-TGN incorporados ao DNA no lugar da guanina são reconhecidos pelo sistema de reparo das células

em divisão, levando à morte celular. Defeitos na via de reparo da célula são associados com resistência a 6-TGN. Além da incorporação dos nucleotídeos da 6-TGN ao DNA sintetizado, um importante mecanismo de ação da 6-MP é a inibição da síntese de novo das purinas (PNDS) realizada pelo metabólito 6-Me-Thio-IMP (COULTHARD & HOGARTH, 2005).



**Figura 3 - Estrutura das tiopurinas**

(A) Estrutura química da hipoxantina e da 6-MP

(B) Pareamento normal: citosina-guanina

(C) Pareamento anormal: timina-tioguanina

A presença de um átomo de enxofre no lugar do oxigênio na tioguanina, impede a formação de uma ponte de hidrogênio normal e leva ao pareamento anormal com a timina. Este pareamento anormal, é reconhecido pelo sistema de reparo da célula, não sendo no entanto capaz de corrigi-lo, induzindo a morte celular (Figura 3) (SILVA, 2008).

### 3.2 TIOPURINA METILTRANSFERASE

A tiopurina metiltransferase (TPMT) é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo das drogas tiopurínicas. É uma enzima citosólica que preferencialmente catalisa a S-metilação (inativação) das drogas tiopurinas, como mercaptopurina, azatioprina e tioguanina (YATES, 1997).

Diferenças individuais na resposta terapêutica dessas drogas e a presença de efeitos colaterais estão relacionadas a variações na atividade enzimática da enzima tiopurina metiltransferase (TPMT).

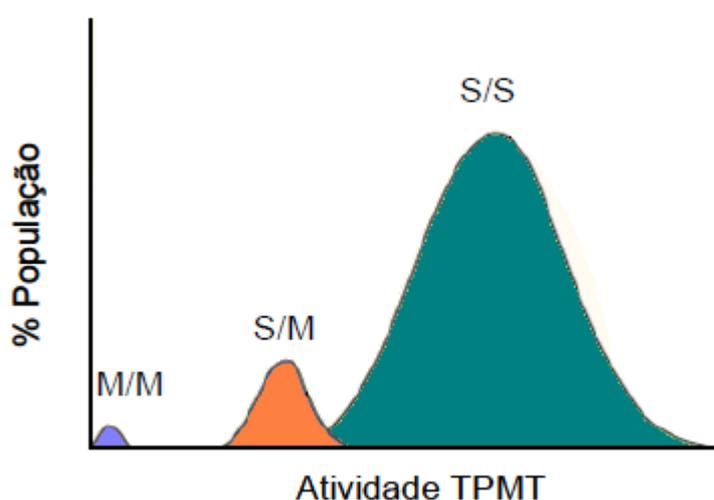
Quanto maior a atividade da TPMT, menor a formação de 6-TGN com a conseqüente redução do risco de toxicidade e aumento do risco de ineficácia. Quanto menor a atividade da TPMT, maior a formação de 6-TGN, resultando em maior eficácia, porém com risco aumentado de toxicidade (REIS, 2006).

Diversos estudos demonstraram que pacientes com atividade excepcionalmente baixa da TPMT têm grande risco de desenvolverem toxicidade hematológica, ou seja, pancitopenia grave e por vezes até fatal, devido ao acúmulo de metabólitos citotóxicos após tratamento com doses habituais de tiopurinas, enquanto pacientes com níveis maiores de atividades não apresentaram essa intercorrência (KRYNETSKI *et al*, 1999; McLEOD *et al*. 2000; YATES, 1997; OTTERNESS, 1997).

A relevância clínica da atividade enzimática da TPMT tem sido estudada extensivamente desde as primeiras investigações por Weinshilbom em 1980, o qual foi o primeiro a demonstrar a distribuição trimodal da atividade da tiopurina metiltransferase em células vermelhas. No estudo, com 298 pacientes, 88,6% dos indivíduos apresentaram atividade enzimática alta, cerca de 11% apresentaram

atividade intermediária e 0,3% dos indivíduos não apresentaram atividade detectável (COULTHARD & HOGARTH, 2005).

Esta distribuição é determinada por herança autossômica co-dominante de alelos codificando para alta (tipo selvagem, S) ou baixa (tipo mutante, M) atividade enzimática (Figura 4) (REIS, 2006).



**Figura 4 - Distribuição populacional da atividade da TPMT.**

Indivíduos que apresentam o genótipo homocigoto selvagem (S/S) possuem atividade enzimática alta em hemácias de sangue periférico. Indivíduos que apresentam genótipo heterocigoto (S/M), em que um dos alelos mutantes está presente, apresentam atividade enzimática intermediária. Indivíduos que apresentam dois alelos mutantes (M/M) apresentam atividade enzimática baixa ou indetectável. S, alelo selvagem. M, alelo mutante. (REIS, 2006)

Uma meta-análise publicada recentemente (HIGGS, 2010) avaliou o risco de mielossupressão em pacientes com atividade intermediária da TPMT, e constatou que o odds-ratio de pacientes com atividade intermediária em desenvolver leucopenia foi de 4,19 (95%IC: 3,20-5,48), sugerindo que indivíduos com intermediária ou ausência da enzima têm risco aumentado de desenvolver

mielossupressão droga-induzida quando comparado com indivíduos com atividade normal.

O principal efeito adverso da 6-MP é a mielotoxicidade, que se desenvolve gradualmente. Por isso, pode não haver trombocitopenia, granulocitopenia ou anemia durante várias semanas após o início do tratamento de manutenção. Quando as alterações hematológicas aparecem, a interrupção do tratamento está usualmente associada a uma rápida recuperação medular. Efeitos gastrointestinais, como anorexia, náuseas e vômitos são pouco freqüentes em crianças (LENNARD, 1990). Pode ocorrer hepatotoxicidade com aumento dos níveis de transaminases e icterícia colestática. Este quadro também costuma ser revertido com a suspensão da droga.

Diversos estudos demonstraram que a hepatotoxicidade parece estar relacionada com o acúmulo de metabólitos metilados como a MMP. Esses achados foram observados com maior freqüência em pacientes com alta atividade da TPMT (RELLING *et al.* 1999)

Em uma coorte de pacientes em terapia de manutenção de leucemia linfoblástica aguda (LLA) apresentando manifestações clínicas compatíveis com toxicidade por tiopurinas, foi observada correlação inversa entre a atividade da TPMT e os níveis intra-eritrocitários de 6-TGN. Os pacientes que apresentaram dois alelos mutantes (baixa atividade) foram os que necessitaram maiores reduções das doses administradas de tiopurinas. Entre os pacientes heterozigotos, 35% necessitaram redução da dose. Dos pacientes homozigotos selvagens apenas 7% necessitaram reduções (LENNARD, 1990).

No que se referem à eficácia, pacientes com pelo menos um alelo mutante (atividade intermediária) apresentaram melhores respostas a terapia com tiopurinas

e freqüência mais alta de remissão na manutenção em relação aos pacientes homozigotos selvagens (RELLING, 1999).

Crianças com ausência de atividade enzimática da TPMT acumulam níveis elevados de 6-TGN nos eritrócitos durante a terapia com mercaptopurina e apresentam severa mielossupressão. De modo contrário, com níveis elevados de atividade da TPMT, menor quantidade de 6-MP está disponível para a formação do metabólito citotóxico 6-TGN. Crianças com baixas concentrações de 6-TGN com doses padrão de 6-MP estão em risco aumentado de recaída. (LENNARD, 1990)

Atividade da TPMT medida ao diagnóstico mostra uma relação inversa da duração das citopenias após a retirada de 6-MP durante a quimioterapia. No tratamento das Leucemias Linfoblásticas Agudas no Reino Unido, 6-MP induzindo citotoxicidade é usado como um índice de resposta ao tratamento (LENNARD, 1997).

Uma importante conclusão, segundo trabalho de Coulthard (2002), foi que em células com nível elevado de atividade enzimática da TPMT, 6-MP parece exercer um efeito citotóxico, com pouca incorporação da TGN ao DNA, com risco de mutagênese reduzido pela incorporação da TGN. Isto pode ajudar a explicar que malignidades secundárias não estejam associadas com uso crônico de 6-MP ou azatioprina. Em células com baixa atividade enzimática, entretanto, níveis de TGN incorporados ao DNA são muito maiores para um dado nível de citotoxicidade. Esses resultados podem explicar uma recente observação que malignidades secundárias são aumentadas em pacientes com redução níveis de atividade de TPMT. A possível associação entre tratamento com tiopurinas e mutagênese ainda necessita de mais estudos para corroborar com esses achados clínicos.

### 3.3 POLIMORFISMOS DA TIOPURINA METILTRANSFERASE

Níveis de atividade da TPMT são controlados por um polimorfismo genético que é um importante fator responsável por diferenças individuais de toxicidade e eficácia terapêutica (OTTERNESS, 1997).

A existência desse polimorfismo no gene *TPMT* gera variantes alélicas cujo fenótipo mostra uma capacidade diminuída na S-metilação da azatioprina/ 6-MP, determinando um aumento dos metabólitos ativos (6-TGN), que levam a uma maior atividade farmacológica, mas também um maior risco de efeitos adversos (ALVAREZ, 2009).

Pacientes homocigotos para estes alelos, que resultam em baixa atividade enzimática, apresentam níveis elevados de 6-TGN quando tratados com doses padrão de tiopurinas, estando em risco aumentado de apresentar grave mielossupressão. Para evitar toxicidade, esses pacientes deveriam receber 1/10 a 1/15 da dose padrão das tiopurinas e mesmo assim deveriam ser monitorizados cuidadosamente (WEINSHILBOUM, 2006).

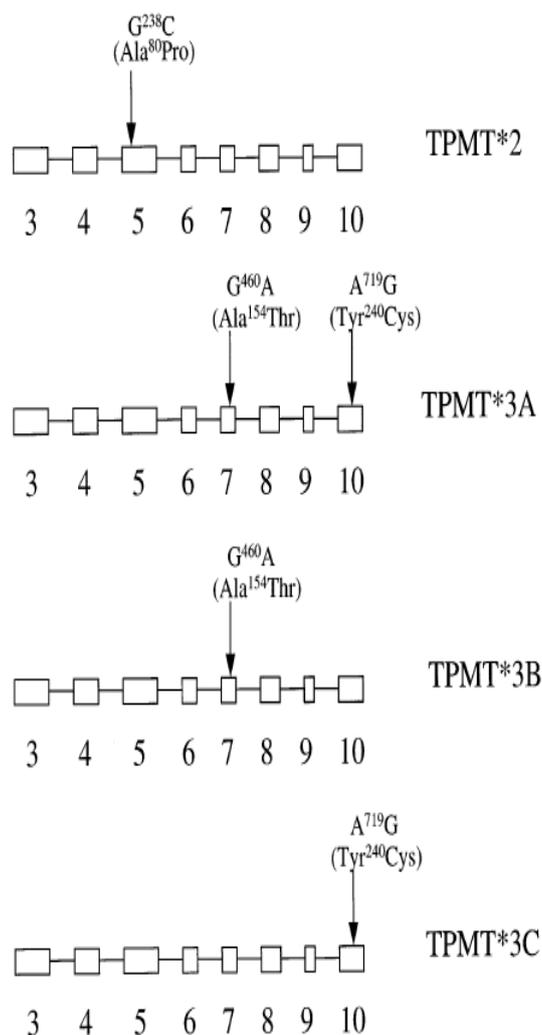
Relling (2011) publicou um guideline baseado em revisão da literatura sugerindo recomendações de dosagens das tiopurinas de acordo com o genótipo para o gene *TPMT*. Pacientes com genótipo homocigoto selvagem, podem receber doses padrão tiopurinas (6-MP (75mg/m<sup>2</sup>/dia ou 1,5mg/kg/dia) e azatioprina (2-3mg/kg/dia)). Pacientes com genótipo heterocigoto devem começar com doses reduzidas (30-70%) da dose-padrão. Os pacientes com genótipo homocigoto mutante devem receber 10% da dose padrão, ou no caso da azatioprina, deve ser considerada inclusive a sua suspensão.

Estudos populacionais e familiares demonstraram um polimorfismo genético de caráter autossômico co-dominante para a TPMT em humanos (WEINSHILBOUM & SLADEK, 1980). As bases moleculares para este polimorfismo genético foram bem estabelecidas com a identificação do gene *TPMT* no cromossomo 6p22.3. KRYNETSKI e colaboradores (1997) sequenciaram o gene e obtiveram um tamanho de 25Kb, com 10 exons e 9 introns. A proteína tem uma massa molecular de 28KDa e compreende 245 aminoácidos. Há ainda um pseudo-gene *TPMT* localizado no cromossomo 18 no genoma humano.

O alelo selvagem (*wild type*) foi designado como *TPMT\*1* e os indivíduos com alta atividade enzimática são homozigotos para este alelo (SZUMLANSKI *et al.*, 1996).

Mais de 20 polimorfismos genéticos (tabela 1) da TPMT foram associados a níveis diminuídos da atividade enzimática e/ou toxicidade induzida pelas drogas tiopurinas (SALAVAGGIONE *et al.*, 2005). Os alelos mutantes mais prevalentes são *TPMT\*2*, *\*3A* e *\*3C* (figura 5), compreendendo 80% a 95% dos alelos mutantes encontrados em caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos. O *TPMT\*3A* é o mais prevalente dos três alelos entre os caucasianos (TAI *et al.*, 1996; OTTERNESS *et al.*, 1997; YATES *et al.*, 1997).

Pacientes heterozigotos para os alelos *TPMT\*2*, *\*3A*, *\*3C* apresentam atividade enzimática intermediária e os indivíduos homozigotos apresentam deficiência da TPMT. (KRYNETSKI *et al.*, 1995; YATES *et al.*, 1997; COULTHARD *et al.*, 2000).



**Figura 5 - Variantes alélicas predominantes do *locus* TPMT**

(Coulthard, 1998)

As variações observadas na atividade da TPMT são conhecidas por ser resultado de polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP's).

Em um estudo realizado por Tai *et al* em 1997, com 283 amostras clínicas, 26 alelos foram identificados. *TPMT* \*3A foi identificado em 55% das variantes, *TPMT* \*3C (16%) e *TPMT* \*3B (6,5%). *TPMT*\*2A apresentou frequência menor que 3%.

Em outro estudo realizado por Yates em 1997, com 282 pessoas brancas, também demonstrou o *TPMT* \*3A como o alelo mais prevalente (82%), com *TPMT* \*2 e *TPMT* \*3C com frequência menor que 5%.

**Tabela 1 - Principais variantes alélicas do gene *TPMT*.**

Alelo <i>TPMT</i>	Mutações envolvidas	Aminoácidos substituídos
*1	<i>Wild-Type</i>	
*2	G238C	Ala80Pro
*3A	G460A	Ala154Tre
	A719G	Tir240Cis
*3B	G460A	Ala154Tre
*3C	A719G	Tir240Cis
*3D	G460A	Ala154Tre
	A719G	Tir240Cis
	G292T	Glu98Stop
*4	G19(-1)A	
*5	T146C	Leu49Ser
*6	A539T	Tir180Fen
*7	T681G	His227Gln
*8	G644A	Arg215His
*9	A356C	Lis119Tri
*10	G430C	Gli144Arg
*11	G395A	Cis132Tir
*12	C374T	Ser125Leu
*13	A83T	Glu28Val
*14	A1G	Met1Val
*15	Perda dos nucleotídeos 419-494 (exon 7)	Perda dos aminoácidos de 140 a 165
*16	G488A	Arg163His
*17	C142G	Gln42Glu
*18	C1211A	Gli71Arg
*19	A365C	Lis122Tri
*20	A712G	Lis238Gli
*21	C205G	Leu69val
*22	G488C	Arg163Pro

(adaptado de SALAVAGGIONE *et al.*, 2005)

O primeiro SNP a ser descrito foi o *TPMT*\*2, resultando em uma transversoão G238C, ou seja, levando a mudança de um único nucleotídeo, G para C, na posição 238 do gene, tendo como consequência a substituição de uma alanina por uma prolina no códon 80 (Ala80Pro) (KRYNETSKI, 1995; TAI, 1996).

A variante alélica *TPMT* \*3A possui dois SNPs que ocorrem simultaneamente, resultando em alterações na seqüência de aminoácidos codificados. Esse genótipo envolvem as mutações pontuais no exon 7 no nucleotídeo de posição 460 (G > A), levando a substituição de alanina por treonina no códon 154 (Ala154Thr), juntamente com uma mutação pontual no exon 10 no nucleotídeo de posição 719 (A>G), levando a substituição de tirosina por cistina no códon 240 (Tyr240Cys) (SZUMLANSKI, 1996; TAI, 1996).

O alelo *TPMT*\*3B inclui somente a mutação no códon 154 enquanto o polimorfismo *TPMT*\*3C inclui somente uma mutação no códon 240 (SZUMLANSKI, 1996).

A identificação dos demais alelos foi obtida através do seqüenciamento do gene *TPMT* em indivíduos com atividade enzimática baixa ou intermediária, ou que apresentavam alterações laboratoriais secundárias, como mielotoxicidade acentuada, nos quais não havia sido identificado nenhum dos alelos mutantes já descritos.

Pacientes com presença dos alelos *TPMT*\*3A e \*3B apresentam uma diminuição da atividade enzimática e, quando, são homozigotos para esses alelos, podem sofrer mielossupressão quando tratados com doses padrão das tiopurinas, pois, desta forma, exercem uma ação de overdose da medicação (LENNARD *et al*, 1990).

Os polimorfismos *TPMT*\*2 e \*3C não resultam em dramáticas diminuições nos níveis das proteínas, como os anteriores, mas também estão associados com diminuições nos seus níveis (TAI *et al*, 1997).

Com bases nas populações estudadas, *TPMT* \*3A e \*3C são as variantes alélicas predominantes, com *TPMT* \*2 contribuindo em menor extensão. Esses três alelos compõem mais de 95% dos casos de deficiência hereditária da TPMT em sujeitos caucasianos (Mc LEOD *et al*, 2000).

Uma limitação comum de todos os métodos de genotipagem é sua incapacidade de determinar diretamente os haplótipos. Especificamente, porque a variante alélica clinicamente mais relevante em caucasianos, *TPMT* \*3A, tem dois SNPs funcionalmente significantes separados por 8310 pb. É importante diferenciar o genótipo relativamente comum \*1/\*3A (aproximadamente 10% das amostras em caucasianos) – que é associado com atividade intermediária – do raro genótipo \*3B/\*3C que é associado com muito baixa atividade e severa toxicidade as drogas. Embora a situação anterior seja muito rara, as conseqüências do seu tratamento com doses padrão de tiopurinas podem ser devastadoras. Neste caso, o exemplo serve para colocar em foco a limitação de todos os métodos de genotipagem que são utilizados atualmente (WEINSHILBOUM, 2006).

Para avaliar este problema, métodos moleculares de haplotipagem estão sendo desenvolvidos para ser usados para distinguir entre os genótipos \*1/\*3A e \*3B/\*3C (Mc LEOD, 2000 apud WEINSHILBOUM, 2006).

Sendo mais de 95% das variantes alélicas representadas pelos polimorfismos \*2, \*3A, \*3B e \*3C, raros polimorfismos não serão detectados pela genotipagem que é direcionada a estas variantes conhecidas.

O diagnóstico molecular é uma estratégia importante para detectar, prospectivamente, as deficiências de TPMT e minimizar os riscos de toxicidade. Utilizando-se as tecnologias disponíveis, as análises genotípicas podem prever com sucesso o nível da atividade da TPMT em mais de 95% dos pacientes (COULTHARD et al., 2000; YATES et al., 1997; SCHAEFFELER et al., 2001; SCHAEFFELER et al., 2004).

### **3.4 CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO**

A atividade da TPMT é medida tipicamente em eritrócitos. Níveis de atividade da enzima TPMT no fígado de humanos, rins e linfócitos normais têm sido correlacionados com a atividade em eritrócitos (KRYNETSKI, 1995 apud SZUMLANSKY *et al*, 1992).

Nos caucasianos, a concordância geral genótipo-fenótipo gira em torno de 92-100%. Enquanto a correlação é muito alta nos selvagens homozigotos e nos mutantes homozigóticos (93-100%), é considerada muito baixa nos heterozigóticos, em torno de 53-100%, indicando que outros fatores que não somente genótipos da TPMT podem influenciar na atividade da enzima (KUZELICKI, 2009).

Existem limitações importantes no que diz respeito à fenotipagem da TPMT. A determinação da atividade enzimática pode não ser confiável em indivíduos que receberam transfusão de hemácias dentro de 2 a 3 meses antes da avaliação. (YATES *et al.*, 1997)

Atividade da TPMT pode ser influenciada por um número de drogas, quando co-administradas com as tiopurinas. Por exemplo, aspirina nas doses terapêuticas

pode levar a inibição da TPMT. Também as drogas sulfassalazina e olzalazina, são potentes inibidores da TPMT, resultando em interações medicamentosas.

Outro fator é a S-adenosilmetionina (SAM), que estabiliza a estrutura protéica da TPMT no seu sítio ativo, aumentando sua atividade. Metabólitos endógenos (folatos, metionina, ATP) e enzimas participantes da biossíntese da SAM podem influenciar na atividade da enzima indiretamente (KUZELICKI, 2009).

Fatores como o estágio da doença, uso de medicamentos e fatores ambientais podem ser moduladores da atividade da TPMT, podendo contribuir para uma classificação equivocada do fenótipo. Observou-se que a administração de tiopurinas, por si mesma, poderia alterar a atividade da TPMT nos eritrócitos, “induzindo” um aumento médio de 30% na atividade enzimática (McLEOD, 1995; LENNARD *et al.*, 1990). Essa atividade apresentaria diminuição proporcional após a interrupção da quimioterapia. Desta forma, falhas na adesão também poderiam ser causa de “diminuição” da atividade enzimática durante o tratamento (McLEOD, 1995).

### 3.5 PREVALÊNCIAS NO MUNDO

Vários estudos comprovam que *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* e *TPMT\*3C* são os mais prevalentes (80–95%) dos alelos polimórficos que causam significativa redução da atividade enzimática. *TPMT\*3B* é muito mais raro (Tabela 2), e a maioria das outras variantes tem sido esporadicamente detectadas (EFRATI, 2009).

Em caucasianos, *TPMT\*3A* é o mais comum alelo de baixa atividade, enquanto *TPMT\*3C* é o mais comum na população africana e asiática (EFRATI, 2009).

**Tabela 2- Distribuição da freqüência de alelos *TPMT* (%) em várias populações (EFRATI, 2009)**

Population	*2	*3A	*3B	*3C	No. of subjects	Haplotype frequency
Sardinians	1.74	0.58	0.39	0.77	259	3.48
Brazilian	2.2	1.5	0.2	1	204	4.9
Swedish	0.06	3.7	0.13	0.44	800	4.33
Polish	0.4	2.7	0	0.14	358	3.24
Slovenian	0	4.1	0.3	0.5	194	4.9
Argentine	0.7	3.1	0	0	147	3.8
French	0.7	3	0	0.4	304	4.1
Italian	0.49	3.88	0	0.97	103	5.34
Colombian	0.36	3.57	0	0	140	3.93
British	0.5	4.5	0	0.25	199	5.25
German	0.2	4.4	0	0.4	1214	5
Portuguese	1.1	2.4	0	0.7	310	4.2
American Caucasian	0.2	3.2	0	0.2	282	3.6
African American	0.4	0.8	0	2.4	248	3.6
Egyptian	0	0.3	0	1.3	200	1.6
Mozambican	0	0.2	0	3.8	250	4
Ghanaian	0	0	0	7.6	217	7.6
Chinese	0	0	0	1.33	225	1.33
West Asia	0	1	0	0	99	1
Uygur Chinese	0	0.3	0	1.6	160	1.9
Taiwanese	0	0	0	0.6	249	0.6
Japanese	0	0	0	0.8	192	0.8
Jews	0	0.73	0	0	531	0.73
Moslems	0	0.79	0	1.05	194	1.83
Druze	0	3.19	0	0.75	156	3.94

### 3.6 PREVALÊNCIAS NO BRASIL

Existem poucos estudos realizados no Brasil até o presente momento. Na literatura consultada, foram encontrados quatro estudos.

Pesquisadores de Minas Gerais determinaram a freqüência de seis variantes alélicas do gene *TPMT* em uma população de 202 indivíduos, com idade superior a

18 anos, que foram atendidos no Hospital das Clínicas - UFMG. A frequência alélica foi 2,2%, 1,5%, 0,2% e 1%, para os alelos *TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *\*3B* e *\*3C*, respectivamente. Nesta população brasileira não foram detectados os alelos *TPMT\*5* e *\*6* (BOSON *et al.*, 2003).

No trabalho de REIS (2003), realizado no Rio de Janeiro, no Instituto Nacional do Câncer (INCA), o polimorfismo da TPMT foi estudado em 306 brasileiros saudáveis, que foram classificados de acordo com o auto-relato étnico em descendentes de europeus ( $n=81$ ), descendentes de africanos ( $n=18$ ) ou miscigenados ( $n=204$ ).

Foi avaliada a atividade da enzima em todos os pacientes: 275 indivíduos (89,9%) tiveram atividade da enzima elevada, 30 (9,8%) atividade intermediária e 1 indivíduo (0,3%) teve atividade baixa.

Nesse mesmo estudo, foram estudados os três polimorfismos mais prevalentes (*TPMT\*2*, *TPMT\*3A* e *\*3C*) comparando 31 indivíduos com atividade enzimática baixa e intermediária com 45 indivíduos com atividade enzimática elevada. Nenhuma mutação foi encontrada no grupo com alta atividade enzimática. No grupo com baixa atividade enzimática duas mutações foram encontradas. Os alelos *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* e *\*3C* foram detectados em 87,1% dos indivíduos com baixa ou intermediária atividade.

A frequência dos alelos mutantes *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* e *TPMT\*3C* não difere entre indivíduos classificados como euro-descendentes em 0,76%, 2,03% e 2,54%, respectivamente e de 0,60%, 1,81% e 1,81% nos que declararam ser miscigenados. Não foram encontradas mutações nos que declararam ser afro-descendentes.

SILVA (2007) estimou a frequência das três principais variantes alélicas do gene *TPMT\*2*, *\*3A* e *\*3C* em uma população de crianças e adolescentes com

Leucemia Linfoblástica Aguda tratados no Hospital das Clínicas – UFMG e encontrou a frequência de alelos mutantes *TPMT\*3A* (3.9%), *\*3C* (0.9%), *\*2* (0.4%), e *\*3B* (0%).

FRAGA (2009) descreveu a distribuição das frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos *TPMT G238C*, *TPMT G460A* e *TPMT A719G* e *MTHFR C677T* e *MTHFR A1298C* em uma amostra composta por doadores de sangue da população do Rio de Janeiro. Três polimorfismos do gene *TPMT* foram determinados em 200 indivíduos e as frequências observadas para os alelos foram: *TPMT\*1* (96%), *TPMT\*2* (0%), *TPMT\*3A* (1,75%), *TPMT\*3B* (0,5%) e *TPMT\*3C* (1,75%).

Na tabela 3 podemos ver uma comparação entre os quatro estudos brasileiros publicados até o presente momento.

**Tabela 3 - Comparação entre os estudos brasileiros**

Alelos	Boson (2003)	Reis (2003)	Silva (2007)	Fraga (2009)
<i>TPMT*2</i>	2,2%	0,82%	0,4%	0%
<i>TPMT*3A</i>	1,5%	1,63%	3,9%	1,75%
<i>TPMT*3B</i>	0,2%	NR	0%	0,5%
<i>TPMT*3C</i>	1%	2,12%	0,9%	1,75%

NR – não realizado

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 TIPOS DE ESTUDO**

Trata-se de uma pesquisa descritivo-analítica, de corte transversal, não controlada.

### **4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univille (Ofício 136/2009).

### **4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para as análises estatísticas descritivas e o cálculo do tamanho amostral foi empregado o programa OpenEpi v.2.3.1.

### **4.4 PROVENIÊNCIAS DOS SUJEITOS E AMOSTRAS**

A população estudada consistiu de 197 doadores de sangue voluntários, recrutados no Hemocentro Regional de Joinville (HEMOSC), mediante autorização da médica responsável pelo Hemocentro de Joinville.

A amostra foi definida com base em uma população de Joinville de 497.331 habitantes (estimada pelo Censo IBGE 2009), com frequência estimada do fator em

estudo de 5%, limite de Confiança de 5% e efeito do desenho de 1. Os 197 casos foram suficientes para garantir um intervalo de confiança acima de 99%

Os sujeitos foram recrutados de forma aleatória, sendo incluídos no estudo os doadores que se apresentavam ao banco de sangue, em um período de 4 horas a cada sete dias, no período de fevereiro a abril de 2010.

De cada sujeito foram utilizados aproximadamente 5ml do residual do volume de sangue periférico utilizado na rotina das investigações hematológicas, ou seja, não houve necessidade de uma coleta específica de sangue para o presente estudo, evitando-se risco e desconforto adicionais ao doador. As amostras somente foram utilizadas mediante explicitação dos objetivos e autorização dos sujeitos via assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico (Apêndice A). As amostras foram recebidas em tubos com EDTA como anticoagulante e armazenadas a -20°C até o seu processamento.

Os participantes responderam a um questionário contendo questões quanto a parâmetros como idade, sexo e cor de pele (através de autodeclaração, em acordo com os critérios do IBGE) e outros dados demográficos. (Apêndice B)

Os critérios de exclusão foram doadores da mesma família e a negativa em permitir o uso para o estudo de sua amostra de sangue.

Após a coleta do sangue no Hemocentro Regional de Joinville, o material foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE (Saúde I). As amostras foram recebidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e congeladas a -20°C até o processamento.

## 4.5 ANÁLISES MOLECULARES

As técnicas moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular (Saúde I) da UNIVILLE.

Foi utilizado o DNA genômico obtido das amostras previamente obtidas com os participantes do estudo. Os genótipos da TPMT foram determinados mediante metodologias de PCR conforme Yates (1997) e Alvarez (2009).

### 4.5.1 Extração e purificação do DNA Genômico Humano

Os procedimentos de extração e purificação do DNA genômico foram aplicados às amostras de sangue periférico, coletadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , empregando o kit Qiamp DNA Blood Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha), procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante. (ANEXO 1).

### 4.5.2 Detecção das Mutações no Gene *TPMT* Empregando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para avaliar a frequência das quatro variantes alélicas do gene *TPMT*: \*2(238G>C), \*3A(460G>A e 719A>G), \*3B(460G>A) e \*3C(719A>G).

A definição dos *primers* utilizados para a determinação dos polimorfismos foi baseado em Yates (1997), mas durante sua execução constatou-se um erro no artigo relacionado ao primers P719, sendo então utilizados os *primers* definidos por Alvarez (2009).

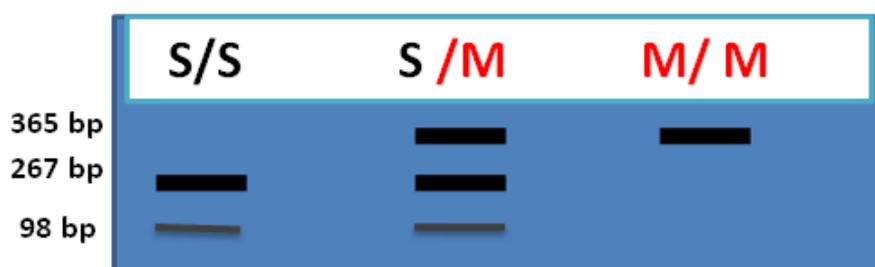
#### 4.5.2.1 DETECÇÃO DE G460A

O polimorfismo G460A foi investigado via utilização da ferramenta de análise RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), segundo Yates e colaboradores (1997). Os *primers* utilizados foram: P460F (5'-ATAACAGAGTGGGGAGGCTGC-3') e P460R (5'-CTAGAACCCAGAAAAAGTATAG-3'), amplificando um segmento de 365pb do exon 7 do gene *TPMT*.

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50  $\mu$ L, empregando-se 50-100ng DNA genômico, 1U *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 200 $\mu$ M dNTPs (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) e 10pmol de cada um dos *primers* (Integrated DNA Technologies, Eugene, EUA). As termociclagens foram realizadas conforme descrito por Yates *et al.* (1997), em aparelho LGC XP Cyclor (Bioer, Tokio, Japão), consistindo de uma fase inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos envolvendo 1 minuto a 94°C (desnaturação), 2 minutos a 55°C (pareamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). Ao término, realizou-se a extensão final dos *amplicons* a 72°C por 7 minutos.

Após confirmação via eletroforese em gel de agarose a 1%, os *amplicons* obtidos pela técnica de PCR, foram submetidos à digestão enzimática com a endonuclease *MwoI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação realizada foi utilizado 1U da enzima e 5 $\mu$ L do amplicon. O material foi incubado a 37°C por 1 hora.

Para os casos homozigotos selvagens, a enzima cliva em um único sítio de DNA, gerando dois fragmentos, um de 267pb e outro de 98pb. A presença da substituição de G460A elimina o sítio de corte, logo o material amplificado não é clivado (Alvarez, 2009) (figura 6).



**Figura 6 - Representação esquemática do polimorfismo G460A**

(S/S – Homozigoto Selvagem; S/M – Heterozigoto Mutante; M/M – Homozigoto Mutante)

#### 4.5.2.2 DETECÇÃO DE A719G

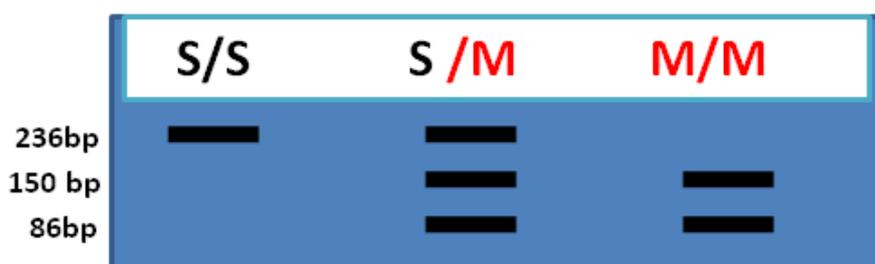
O polimorfismo A179G também foi investigado por RFLP, segundo Yates e colaboradores (1997). Em decorrência de inúmeros resultados insatisfatórios, constatou-se que o iniciador senso descrito por Yates e colaboradores estava escrito como anti-sense, um primer Forward errôneo. Após checagem via bioinformática, optou-se por utilizar o primer Forward do trabalho de Alvarez (2009).

Os *primers* utilizados foram: P719F (5'-AATCCCTGATGTCATTCTTCATAGTATTT-3') e P719R (5'-CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCTC-3'), amplificando um segmento de 236pb do exon 10 do gene *TPMT*.

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50 µL, empregando-se 50-100ng DNA genômico, 1U *Platinum Taq* DNA Polimerase

(Invitrogen, Carlsbad, EUA), 200 $\mu$ M dNTPs (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) e 10pmol de cada um dos *primers* (Integrated DNA Technologies, Eugene, EUA). As termociclagens foram realizadas conforme descrito por Yates *et al.* (1997), em aparelho LGC XP Cyler (Bioer, Tokio, Japão), consistindo de uma fase inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos envolvendo 1 minuto a 94°C (desnaturação), 2 minutos a 55°C (pareamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). Ao término, realizou-se a extensão final dos *amplicons* a 72°C por 7 minutos.

Após confirmação via eletroforese em gel de agarose a 1%, os *amplicons* obtidos pela técnica de PCR foram submetidos à digestão enzimática com a endonuclease *Accl* (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA), conforme instruções dos fabricantes.. Para cada reação realizada foi utilizado 1U da enzima e 5 $\mu$ L do *amplicon*. O material foi incubado a 60° C por 1 hora. A mutação A179G introduz um sítio de restrição para a endonuclease *Accl* e, portanto, a versão mutada será detectada pela observação de dois fragmentos (86 e 150pb), enquanto a variante selvagem permanecerá intacta (236pb)(figura 7) (Alvarez, 2009).

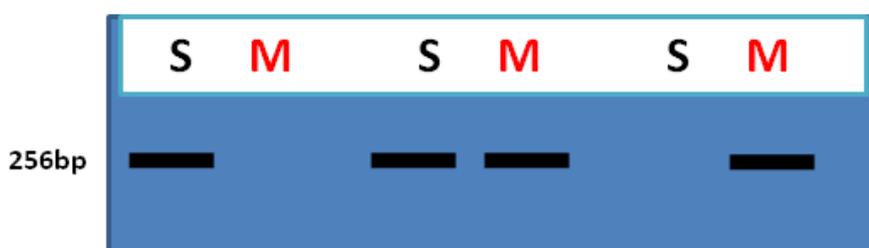


**Figura 7- Representação esquemática do polimorfismo A719G**

(S/S – Homozigoto Selvagem; S/M – Heterozigoto Mutante; M/M – Homozigoto Mutante)

#### 4.5.2.3 DETECÇÃO DE G238C

Para a investigação da transversão G238C foi realizado um PCR alelo específico, onde foram empregadas duas reações de amplificação, cada qual visando à detecção de uma das variantes. Os *primers* utilizados foram P2W (5'-GTATGATTTTAT GCAGGTTTG-3'), P2C(5'- TAAATAGGAACCATCGGACAC-3') e P2M (5'- GTATGATTTTATGCAGGTTTC-3'). As formas selvagens e mutantes foram detectadas com a utilização das combinações de *primers* P2W + P2C e P2M + P2C, respectivamente (figura 8), amplificando um segmento de 256 pares de bases (pb) do *exon 5* do gene *TPMT* (Yates *et al.*, 1997).



**Figura 8- Representação esquemática do polimorfismo G238C**

(S – Selvagem (combinação *primers* P2W + P2C); M – Mutante ( combinação *primers* P2M + P2C) )

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50  $\mu$ L, empregando-se 50-100ng DNA genômico, 1U *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 200 $\mu$ M dNTPs (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) e 10pmol de cada um dos *primers* (Integrated DNA Technologies, Eugene, EUA). As termociclagens foram realizadas conforme descrito

por Yates *et al.* (1997), em aparelho LGC XP Cyclor (Bioer, Tokio, Japão), consistindo de uma fase inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos envolvendo 1 minuto a 94°C (desnaturação), 2 minutos a 64°C (pareamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). Ao término, realizou-se a extensão final dos *amplicons* a 72°C por 7 minutos.

As amostras que apresentaram resultados compatíveis a presença do polimorfismo foram encaminhadas para seqüenciamento em laboratório/instituição colaboradora.

#### **4.5.3 Eletroforese**

Para a confirmação dos resultados, uma fração (10µL) de cada PCR e o volume completo (20µL) das digestões enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel 1,5% agarose contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo. A visualização se deu via exposição à luz ultravioleta, seguido de fotodigitalização (MiniBis, DNR Bioimage Systems, Jerusalém, Israel) e comparação com padrão comercial (Gene Ruler™ 100bp Ladder Fermentas, Burlington, Canadá) e respectivos perfis eletroforéticos esperados.

## **5 DISCUSSÃO E RESULTADOS**

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico que foi encaminhado para publicação em periódico científico – Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (anexo 2).

## PODEMOS PREVENIR A TOXICIDADE NA ADMINISTRAÇÃO DE TIOPURINAS?

### Análise da prevalência dos polimorfismos da TPMT em Joinville/SC

Gabriela Roncone Gastal<sup>1</sup>, Paulo Henrique Condeixa de França<sup>2</sup>, Leslie Ecker Ferreira<sup>2</sup>,  
Caroline Furtado Noble<sup>3</sup>, Simone Moreira<sup>4</sup>, Mauro Souza Leite Pinho<sup>2</sup>

Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente -  
Laboratório de Biologia Molecular

1. Médica Hematologista
2. Professor (a) do Departamento de Medicina da UNIVILLE e Laboratório de Biologia Molecular
3. Bolsista de Iniciação científica da UNIVILLE
4. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE

Palavras chaves: TPMT, polimorfismos genéticos, Tiopurina Metiltransferase

**Background:** Genetic polymorphisms of Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) represent the importance of pharmacogenetics regarding individualized drug therapy. TPMT catalyses the S-methylation of thiopurine drugs such as 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine, used to treat childhood leukemia, autoimmune diseases, inflammatory bowel disease and organ transplant recipients. Despite their effectiveness, thiopurines have a narrow therapeutic index and may cause life-threatening drug-induced toxicity such as myelosuppression. **Aim:** To assess the prevalence of TPMT gene polymorphism in the population of Joinville/SC. **Subjects and Methods:** The frequency of four allelic variants of the TPMT gene, TPMT \*2 (238G>C), TPMT \*3A (460G>A and 719A>G), TPMT\*3B (460G>A) and TPMT \*3C (719A>G) were analyzed in 197 blood donors of Joinville/SC, using restriction fragment length polymorphism (RFLP) and allele-specific PCR-based assays. **Results:** TPMT gene heterozygous variants were detected in 12 subjects (6,1%). TPMT\*1/\*2 in two subjects (1,01%), TPMT\*1/\*3A in six (3,04%), TPMT\*1/\*3B in two (1,01%), TPMT\*1/\*3C in one (0,5%) and TPMT\*3A/\*3C in one (0,5%). The normal allele (*wild-type*) was found in 93,9% of the individuals studied. **Conclusion:** The prevalence of *non-TPMT\*1* polymorphisms in 6,1% in the population sample analyzed in the present study suggests the potential role of this test in the prevention of myelosuppression by thiopurine drugs.

**Resumo:** Os polimorfismos genéticos da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) representam um dos principais exemplos da importância da farmacogenética na individualização da terapia medicamentosa. A TPMT catalisa a S-metilação das drogas tiopurinas, como 6-Mercaptopurina (6-MP) e azatioprina, usadas para o tratamento de leucemias agudas, doenças auto-imunes, doença inflamatória intestinal e na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Embora sejam efetivas, as tiopurinas apresentam um índice terapêutico relativamente estreito e são capazes de causar toxicidade droga-induzida com risco de morte, especialmente mielossupressão. **Objetivos:** Avaliar a prevalência dos principais polimorfismos do gene TPMT na população de Joinville/SC. **Sujeitos e métodos:** A prevalência das variantes alélicas TPMT\*2 (238G>C), TPMT\*3A (460G>A e 719A>G), TPMT\*3B (460G>A) e TPMT\*3C (719A>G) foi investigada em população composta de 197 doadores de sangue utilizando-se enzimas de restrição (PCR-RFLP) e PCR alelo-específico. **Resultados:** Variantes do gene TPMT foram detectadas em 12 sujeitos (6,1%), todos dispondo perfil heterozigoto (TPMT\*1/\*2 em dois sujeitos (1,01%), TPMT\*1/\*3A em seis (3,04%), TPMT\*1/\*3B em dois (1,01%), TPMT\*1/\*3C em um (0,5%) e TPMT\*3A/\*3C em um (0,5%)). O genótipo selvagem (TPMT\*1/\*1) foi encontrado em 93,9% dos indivíduos estudados. **Conclusões:** Genótipos não-TPMT\*1, relacionados à maior susceptibilidade à mielossupressão, foram identificados em 6,1% da amostra populacional estudada. A identificação prévia destes poderia contribuir para a prevenção da ocorrência de complicações associadas ao uso de tiopurinas.

Endereço para correspondência:  
Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE  
Cx. Postal 246, 89201-972 Joinville, SC, Brasil.  
+55-47-34619197;  
E-mail: gabigastal22@gmail.com

As drogas tiopurinas, como 6-Mercaptopurina (6-MP), 6-Tioguanina (6-TG) e azatioprina, são utilizadas com grande frequência para o tratamento de leucemias agudas, doenças inflamatórias intestinais, condições auto-imunes e seguimento de transplantes.<sup>1,2</sup> Entretanto, apresentam o inconveniente de provocar, em determinados pacientes, toxicidades hematológicas severas e potencialmente fatais, mesmo quando empregadas em doses padrão. Vários autores demonstraram que este componente de imprevisibilidade terapêutica está relacionado à função de uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo das tiopurinas, denominada como tiopurina metiltransferase (TPMT).<sup>3,4</sup>

Níveis séricos e de atividade enzimática da TPMT são controlados por um polimorfismo genético, sendo este considerado o principal fator responsável por diferenças individuais quanto a toxicidade e eficácia terapêutica.<sup>4</sup> Estudos populacionais e familiares têm demonstrado que indivíduos com baixa atividade enzimática apresentam grande risco para mielossupressão severa e potencialmente fatal quando tratados com doses padrão de 6-mercaptopurina ou azatioprina.<sup>3,4</sup>

Existem mais de 20 variantes alélicas publicadas para o gene *TPMT*. O alelo *TPMT\*1* corresponde ao alelo mais frequente (também descrito como selvagem), estando relacionado a uma alta atividade enzimática. Outros quatro alelos são frequentemente encontrados, sendo denominados como *TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *TPMT\*3B* e *TPMT\*3C*, correspondendo a acima de 95% dos casos confirmados relacionados à diminuição da atividade enzimática.<sup>5,6</sup> A variante alélica *TPMT\*2* corresponde a mudança de um único nucleotídeo (SNP) na posição 238 (G>C) do gene.<sup>7,8</sup> A variante alélica *TPMT\*3A* é composta por dois SNPs que ocorrem simultaneamente, resultando em alterações nos nucleotídeos nas posições 460 (G>A) e 719 (A>G).<sup>8,9</sup> Estes dois SNPs também podem ocorrer isoladamente,

resultando em outros dois alelos. O alelo *TPMT\*3B* inclui somente a alteração na posição 460 (G>A), enquanto o alelo *TPMT\*3C* refere-se exclusivamente a alteração na posição 719 (A>G).<sup>9</sup>

Diversos estudos têm sido realizados em vários países e regiões buscando determinar a prevalência populacional destes alelos, de forma a permitir uma melhor compreensão dos riscos da administração dos medicamentos contendo drogas tiopurinas. O objetivo do presente trabalho foi identificar a prevalência dos principais alelos do gene *TPMT* (\*2, \*3A, \*3B e \*3C) na população de Joinville/SC.

## **Material e Métodos**

**Material:** As amostras de sangue (aproximadamente 5 ml) de 197 doadores do Hemocentro Regional de Joinville foram obtidas entre fevereiro e abril de 2010, mediante consentimento livre e informado. Todos os indivíduos participantes residiam em Joinville/SC. A amostra foi definida com base em uma população correspondente a 497.331 habitantes (estimada pelo Censo IBGE 2000), com frequência estimada do fator em estudo de 5%, limite de confiança de 5% e efeito do desenho de 1. Os 197 casos foram suficientes para garantir um intervalo de confiança acima de 99%. Dados referentes à idade, sexo e cor da pele (auto-relato) foram coletados de todos os participantes do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville - Univille (Ofício 136/2009).

**Métodos:** As amostras de sangue foram recebidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante, sendo congeladas a -20°C até seu processamento, o qual incluiu as seguintes etapas:

a. *Extração e purificação do DNA genômico humano*: O kit "Qiamp Blood DNA Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi utilizado para esta finalidade, procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante.

b. *Identificação dos polimorfismos*: A detecção dos polimorfismos G460A, A719G e G238C foi realizada conforme as especificidades descritas a seguir:

- *Polimorfismo G460A* - Os *primers* utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram descritos por Yates *et al.* (1997) (P460F: 5'-ATAACAGAGTGGGGAGGCTGC-3' e P460R: 5'-CTAGAACCCAGAAAAAGTATAG-3'), sendo destinados à amplificação de um segmento de 365pb do exon 7 do gene *TPMT*. As reações foram realizadas em volume de 50µL, empregando-se 50-100ng DNA genômico, 1U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 200µM dNTPs (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) e 10pmol de cada *primer* (Integrated DNA Technologies, Eugene, EUA). A termociclagem foi realizada conforme descrito por Yates *et al.* (1997), em aparelho LGC XP Cyler (Bioer, Tokio, Japão), consistindo de uma fase inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos envolvendo 1 minuto a 94°C (desnaturação), 2 minutos a 55°C (pareamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). Ao término, realizou-se a extensão final dos *amplicons* a 72°C por 7 minutos.

Após confirmação via eletroforese em gel de agarose a 1%, os *amplicons* gerados foram digeridos durante uma hora, a 37°C, com 1U da endonuclease *MwoI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para o tipo selvagem, a enzima cliva o *amplicon* em um único sítio, gerando dois fragmentos, sendo o maior de 267pb e o menor de 98pb. A presença da substituição G460A elimina o sítio de reconhecimento, logo o segmento amplificado não é clivado.<sup>10</sup>

- *Polimorfismo A719G* - Excetuando os *primers*, a termociclagem e os insumos necessários à PCR correspondem àqueles destacados no item acima. Os *primers* utilizados foram descritos por Alvarez *et al.* (2009) (P719F: 5'-AATCCCTGATGTCATTCTTCATAGTATTT-3' e P719R: 5'-CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCTC-3'), visando a amplificação de um segmento de 236pb do exon 10 do gene *TPMT*.

Os *amplicons* obtidos foram submetidos à digestão durante uma hora, a 60°C, com 1U da endonuclease *Accl* (New England Biolabs), conforme instruções do fabricante. A mutação A179G introduz um sítio de reconhecimento para a enzima *Accl* e, portanto, o tipo mutante é detectado pela observação de dois fragmentos (86 e 150pb), enquanto o tipo selvagem permanece intacto (236pb).<sup>10</sup>

- *Polimorfismo G238C* - A investigação da transversão G238C foi realizada utilizando-se *primers* alelo específicos. Para cada sujeito foram realizadas, concomitantemente, duas PCRs, cada qual visando à detecção de uma das variantes. Os tipos selvagem e mutante foram detectados através das combinações de *primers* P2W (5'-GTATGATTTTATGCAGGTTTG-3') + P2C (5'-TAAATAGGAACCATCGGACAC-3') e P2M (5'-GTATGATTTTATGCAGGTTTC-3') + P2C, respectivamente.<sup>3</sup>

As reações foram executadas de forma similar ao descrito nos itens anteriores, observando-se a termociclagem definida por Yates *et al.* (1997): desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos envolvendo 1 minuto a 94°C (desnaturação), 2 minutos a 64°C (pareamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). A extensão final dos *amplicons* foi realizada a 72°C durante 7 minutos. O

segmento, quando amplificado, contém 256pb e localiza-se no exon 5 do gene *TPMT*.<sup>10</sup>

c. *Eletroforese* : Para a confirmação dos resultados, uma fração (10µL) de cada PCR e o volume completo (20µL) das digestões enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel 1,5% agarose contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo. A visualização se deu via exposição à luz ultravioleta, seguido de fotodigitalização (MiniBis, DNR Bioimage Systems, Jerusalém, Israel) e comparação com padrão comercial (Gene Ruler™ 100bp Ladder Fermentas, Burlington, Canadá) e respectivos perfis eletroforéticos esperados.

d. *Análise estatística*: Para as análises estatísticas descritivas e o cálculo do tamanho amostral foi empregado o programa OpenEpi v.2.3.1.

## Resultados

A população estudada foi composta de 67 indivíduos do sexo feminino (34%) e 130 (66%) do sexo masculino, com média de idade de 32 anos (19-62; DP 10,69).

Treze variantes alélicas não-*TPMT\*1* foram identificadas em 12 sujeitos (6,1%), sendo oito homens e quatro mulheres, todas com padrão heterozigoto.

### - Identificação do polimorfismo G460A

A figura 1A contém uma fração dos resultados referentes a amplificação de um segmento do gene *TPMT* empregando-se os *primers* P460F e P460R. A figura 1B apresenta o resultado da digestão dos *amplicons* com a endonuclease *MwoI*. As

colunas 14 e 15 correspondem a perfil eletroforético característico de sujeitos heterozigotos quanto ao polimorfismo G460A.

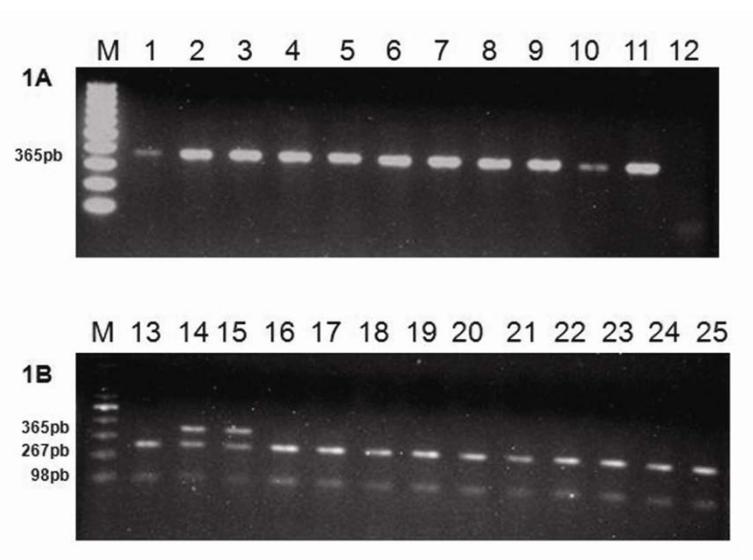


Figura 1 – Resultado representativo da PCR (1A) e da digestão enzimática (1B) visando a investigação do polimorfismo G460A no gene *TPMT*. M - Marcador de tamanho molecular (Gene Ruler™ 100bp Ladder); Colunas 1 a 10 e 13 a 25 - Amostras; 11- Controle positivo; 12 - Controle negativo

#### - Identificação do polimorfismo A719G

A figura 2A exemplifica os resultados obtidos referentes a amplificação de um segmento do gene *TPMT* empregando-se os *primers* P719F e P719R. A figura 2B apresenta o resultado da digestão dos *amplicons* com a endonuclease *Accl*. As colunas 20, 22 e 23 correspondem a perfil eletroforético característico de sujeitos heterozigotos quanto ao polimorfismo A719G.

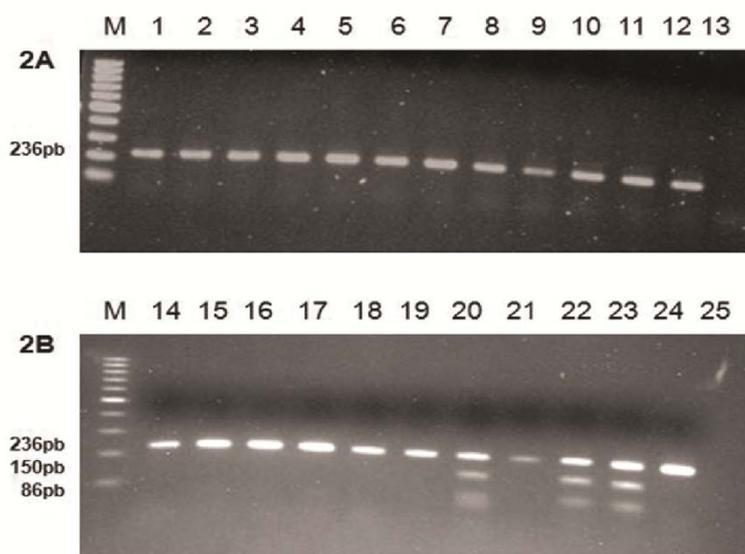


Figura 2 – Resultado representativo da PCR (2A) e da digestão enzimática (2B) visando a investigação do polimorfismo A719G no gene *TPMT*. M - Marcador de tamanho molecular (Gene Ruler™ 100bp Ladder); Colunas 1 a 11 e 14 a 23 - Amostras; 12 e 24- Controles positivo; 13 e 25 - Controles negativo

#### - Identificação do polimorfismos G238C

A figura 3 contém uma parcela dos resultados obtidos referentes a amplificação de um segmento do gene *TPMT* empregando-se os *primers* alelo específicos P2W e P2M associados ao P2C. As colunas ímpares correspondem à investigação do tipo selvagem e as colunas pares do tipo mutante. As colunas 8 e 9 correspondem a perfil eletroforético característico de indivíduo heterozigoto quanto ao polimorfismo G238C.

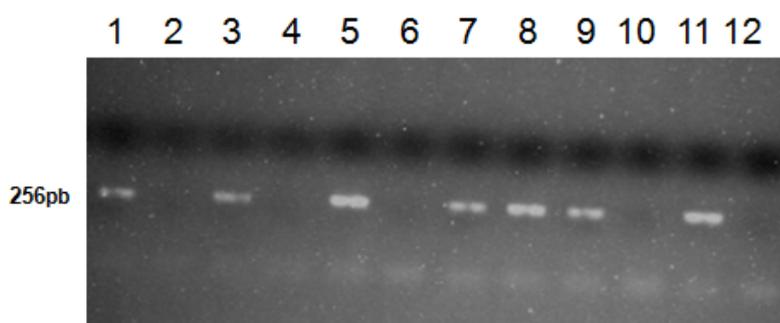


Figura 3 – Resultado representativo da PCR visando a investigação do polimorfismo G238C no gene *TPMT*: cada indivíduo é representado por um par de reações. Colunas 1 a 10 - Amostras; 11- Controle positivo; 12 - Controle negativo

Na tabela 1 são expostas as distribuições e as frequências dos alelos do gene *TPMT* na população de Joinville.

Tabela 1 - Alelos do gene *TPMT* encontrados na população de Joinville

<b>ALELO</b>	<b>NÚMERO DE ALELOS</b>	<b>FREQUÊNCIA % (IC)</b>
<b><i>TPMT*1</i></b>	381	96,7 (94,56-98,15)
<b><i>TPMT*2</i></b>	02	0,5 (0,084-1,66)
<b><i>TPMT*3A</i></b>	07	1,77 (0,78-3,48)
<b><i>TPMT*3B</i></b>	02	0,5 (0,084-1,66)
<b><i>TPMT*3C</i></b>	02	0,5 (0,084-1,66)
<b>TOTAL</b>	394	100

A tabela 2 contém a distribuição dos genótipos observados na população de Joinville.

Tabela 2 - Genótipos do gene *TPMT* encontrados na população de Joinville

<b>GENÓTIPO</b>	<b>n</b>	<b>FREQUÊNCIA % (IC)</b>
<b><i>TPMT*1/*1</i></b>	185	93,9 (89,87-96,66)
<b><i>TPMT*1/*2</i></b>	02	1,01 (0,17-3,31)
<b><i>TPMT*1/*3A</i></b>	06	3,04 (1,24-6,22)
<b><i>TPMT*1/*3B</i></b>	02	1,01 (0,17-3,31)
<b><i>TPMT*1/*3C</i></b>	01	0,50 (0,025-2,47)
<b><i>TPMT*3A/*3C</i></b>	01	0,50 (0,025-2,47)
<b>TOTAL</b>	197	100

## Discussão

As drogas tiopurinas, utilizadas para tratar várias doenças, são drogas antimetabólicas, relacionando-se com componentes próprios das células. Interferem na disponibilidade de precursores dos nucleotídeos de purinas por competirem com estes na síntese dos ácidos nucleicos. Sua principal ação farmacológica deve-se à incorporação do metabólito ativo – o nucleotídeo da 6-tioguanina (6-TGN) – ao DNA das células.<sup>2,11</sup>

A TPMT é uma enzima citosólica que preferencialmente catalisa a S-metilação (inativação) das drogas tiopurinas.<sup>3,7,11</sup> Os níveis de atividade da TPMT são controlados por um polimorfismo genético, ou seja, algumas variantes alélicas se caracterizam pela capacidade diminuída quanto a S-metilação das tiopurinas, determinando um aumento do metabólito ativo (6-TGN), e conseqüentemente, maior atividade farmacológica, aliado a um maior risco de efeitos adversos.<sup>10</sup> Pacientes apresentando deficiência da TPMT, ao receber doses padrão dessas medicações, podem apresentar severa toxicidade se as mesmas não forem ajustadas. Para evitar a toxicidade associada, os pacientes com baixa atividade enzimática devem receber 1/10 a 1/15 da dose padrão das tiopurinas e, ainda assim, devem ser monitorizados cuidadosamente.<sup>6</sup>

Embora a deficiência da TPMT também possa ser mensurada por sua atividade em eritrócitos, a determinação da atividade enzimática pode não ser confiável em indivíduos que receberam transfusão de hemácias dentro de dois a três meses antes da avaliação ou que estão em uso de outras medicações, como sulfassalazina e olsalazina.<sup>3,12</sup> Como a determinação do genótipo não se altera, a identificação genotípica assume relevância clínica, não sofrendo influência dos fatores citados.

Weinshilboum & Sladek, em 1980, demonstraram uma distribuição trimodal da atividade da TPMT em células vermelhas. Nesse estudo, com 298 pacientes, 88,6% dos indivíduos apresentaram atividade enzimática alta, cerca de 11% apresentaram atividade intermediária e 0,3% dos indivíduos não apresentaram atividade detectável.<sup>13</sup>

Uma meta-análise publicada recentemente avaliou o risco de mielossupressão e constatou que o *odds-ratio* associado ao desenvolvimento de leucopenia em pacientes com atividade intermediária da TPMT foi de 4,19, sugerindo que estes indivíduos têm risco aumentado de desenvolver mielossupressão droga-induzida quando comparado com aqueles com atividade normal.<sup>14</sup>

No presente estudo, a prevalência totalizada dos genótipos heterozigotos na população da cidade de Joinville foi de 6,1%. O genótipo *TPMT\*1/\*3A* apresentou maior prevalência (3,04%), seguido dos genótipos *TPMT\*1/\*2* (1,01%), *TPMT\*1/\*3B* (1,01%), *TPMT\*1/\*3C* (0,5%) e *TPMT\*3A/\*3C* (0,5%).

Nesse estudo, foi identificado um indivíduo com genótipo heterozigoto composto (*TPMT\*3A/\*3C*). De acordo com dados encontrados na literatura, esse tipo de genótipo tem comportamento semelhante ao indivíduo homozigoto mutante, com risco de desenvolver grave mielossupressão após uso de drogas tiopurinas. Esse indivíduo deve ser monitorizado cuidadosamente, devendo usar doses bem reduzidas das drogas tiopurinas (10-15% dose) ou até mesmo evitar o uso dessas drogas.<sup>16</sup>

A variante alélica *TPMT\*3A* também foi a mais prevalente no estudo de Silva (2007), que estimou a frequência das três principais variantes alélicas do gene *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* e *TPMT\*3C* em uma população de crianças e adolescentes

com Leucemia Linfoblástica Aguda tratados no Hospital das Clínicas da UFMG (Tabela 4).<sup>17</sup> No entanto, outros três estudos realizados no Brasil obtiveram resultados divergentes, sendo os alelos *TPMT\*2* e *TPMT\*3C* os mais frequentes.<sup>18,19,20</sup> As diferenças apontadas na tabela 4 podem estar relacionadas à miscigenação racial que caracteriza a população brasileira.

Tabela 4 – Comparação das prevalências dos alelos não-*TPMT\*1* do gene *TPMT* observadas nos estudos realizados no Brasil

Autor	Localidade	Prevalência (%)				
		<i>TPMT*2</i>	<i>TPMT*3A</i>	<i>TPMT*3B</i>	<i>TPMT*3C</i>	TOTAL
Boson (2003)	Minas Gerais	2,2	1,5	0,2	1	4,9
Reis (2003)	Rio de Janeiro	0,82	1,63	0	2,12	4,57
Silva (2007)	Minas Gerais	0,4	3,9	0	0,9	5,2
Fraga (2009)	Rio de Janeiro	0	1,75	0,5	1,75	4
Este estudo	Joinville/ SC	0,5	1,77	0,5	0,5	3,27

O estudo do polimorfismo do gene *TPMT* na população de Joinville permitiu um maior conhecimento do perfil genético da população local. A detecção das deficiências da *TPMT* através da genotipagem permitirá adequar e individualizar a dose das tiopurinas, minimizando os riscos de toxicidade e mantendo a eficácia do tratamento. Considerando que pacientes portadores de variantes alélicas associadas à atividade reduzida da *TPMT* podem apresentar efeitos colaterais graves, muitas vezes fatais, quando em vigência de uso de drogas tiopurinas, o presente estudo poderá auxiliar na orientação quanto à adoção de protocolos de tratamento que considerem a prevalência local das variantes alélicas e possivelmente, a introdução do teste genético antes do início da terapia, contribuindo para uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica, com prováveis repercussões na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes.

Assim sendo, conclui-se que a identificação de uma prevalência global dos alelos não-*TPMT\*1*, associados à maior susceptibilidade à mielossupressão pelo uso de tiopurinas, equivalente a 6,1% da amostra populacional estudada, demonstra a relevância da análise genotípica realizada.

## BIBLIOGRAFIA

1. LENNARD L.; LILLEYMAN J.S.; LOON J.V.; WEINSHILBOUM R.M. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v.336, p. 225–9. 1990.
2. COULTHARD S.A.; HOGARTH L. The thiopurines: an update. **Invest new drugs**, v. 23, n. 6, p. 523- 532, 2005.
3. YATES CR.; KRYNETSKI E.Y.; LOENNECHEN T.; FESSING M.Y.; TAI H.L.; PUI C.H. *et al.* Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. **Ann Intern Med**, v.126, p. 608-614, 1997.
4. OTTERNESS D.; SZUMLANSKI C.; LENNARD L.; KLEMETSDAL B.; AARBAKKE J.; PARK-HAH J.O. *et al.* Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. **Clin. Pharmacol Ther**, 1997; 62: 60-73.
5. SALAVAGGIONE O.E.; WANG L.; WIEPERT M.; YEE V.C.; WEINSHILBOUM R.M. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. **Pharmacogenet genomics**, v.15, p. 801-815, 2005.
6. Wang, L.; Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. **Oncogene**, v. 25, p. 1629-1638, 2006.
7. KRYNETSKI E.Y.; SCHETZ J.D.; GALPIN A.J.; PUI C.H.; RELING M.V. A single point leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Science**, n. 92, p. 949-953, 1995.
8. Tai H-L.; KRYNETSKI E.Y.; YATES C.R.; EVANS W.E. *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**, v.58, p.694-702, 1996.
9. SZUMLANSKI C.; OTTERNESS D.; HER C.; LEE D.; BRANDRIFF B.; KESSELL D. *et al.* Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. **DNA Cell Biol**, v. 15, p.17-30. 1996.
  10. ALVAREZ L.L.; VENEGAS M.S.; LARRONDO L.M.; BECERRA N.B.; CASTRO A.L.; QUERA R.P. Polimorfismo del gen de la tiopurina S-metiltransferasa en donantes de sangre de un hospital universitario. **Rev Méd Chile**, v.137, p.185-192, 2009.
  11. SAHASRANAMAN S.; HOWARD D.; ROY S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. **Eur J Clin Pharmacol**, v.64, p.753-767, 2008.
  12. ZHOU, S. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. **Current Clinical Pharmacology**, v.1, p. 119-128, 2006.
  13. Weinshilboum R.M.; Sladek S.L. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenetic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. **Am J Hum Genet** v.32, p.651-662, 1980.
  14. HIGGS, J.E.; PAYNE K.; ROBERTS C.; NEWMAN W.G.. Are patient with intermediary TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? **Pharmacogenomics**, v. 11, p. 177-188, 2010
  15. EFRATI E.; ADLER L.; KRIVOY N. Distribution of TPMT risk alleles for thiopurine toxicity in the Israeli population. **Eur J Clin Pharmacol**, v.65, p.257–262, 2009.
  16. KURZAWSKI, M.; DZIEWANOWSKI, K.; CIECHANOWSKI, K.; DROZDZIK, M. Severe azathioprine-induced myelotoxicity in a kidney transplant patient with thiopurine S-methyltransferase deficient genotype (TPMT\*3A/\*3C). **Transplant International**, v.18, n.5, p. 623 – 625, 2005
  17. SILVA, M.R.; OLIVEIRA B.M.; VIANA M.B.; MURAO M.; ROMANHA A.J. Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) Gene Polymorphism in Brazilian

- children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Association with clinical and laboratory data. **The Drug Monit**, v.30, n.6. 2008
18. BOSON, W.L.; ROMANO-SILVA M.A.; CORREA H.; FALCAO R.P.; TEIXEIRA-VIDIGAL P.V.; DE MARCO L. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. **The Pharmacogenomics Journal**. v. 3, p. 178-182, 2003.
19. FRAGA A.O.; COUTINHO P.C.; HATAGIMA A. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort. Águas de Lindóia, SP, Brasil 2009.
20. REIS M.; SANTORO A.; SAUAREZ-KURTZ G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. **Pharmacogenetics**, v.13, p.371-373, 2003.

## 6 CONCLUSÕES

- A prevalência dos principais polimorfismos do gene da tiopurina metiltransferase (TPMT) na amostra estudada foi de 6,1%.

- Em relação aos quatro estudos publicados em populações brasileiras, observamos resultados coincidentes com apenas um destes, sendo esta diferença possivelmente relacionada às variações da miscigenação racial existente nas diversas regiões do Brasil, sugerindo a necessidade de replicação de estudos semelhantes em outras áreas geográficas.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ L.L.; VENEGAS M.S.; LARRONDO L.M.; BECERRA N.B.; CASTRO A.L.; QUERA R.P. Polimorfismo del gen de la tiopurina S-metiltransferasa en donantes de sangre de un hospital universitario. **Rev Méd Chile**, v.137, p.185-192, 2009.

ANSARI A.; ARENAS M.; GREENFIELD S.M.; MORRIS D.; LINDSAYS K.; GILSHENAN K.; SMITH S.; LEWIAS C.; MARINAKI A.; DULEY J.; SANDERSON J. Prospective of pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v.28, p. 973-983, 2008.

BLACK, A.J.; McLEOD H.L.; CAPPEL H.A.; POWRIE R.H.; MATOWE L.K.; PRITCHARD S.C.; COLLIE-DUGUID E.S.R.; REID D.M. Thiopurine Methyltransferase Genotype Predicts Therapy-Limiting Severe Toxicity from azathioprine. **Ann Internal Med**, v.129, p.716-718, 1998.

BOONSRIRAT, U.; ANGSUTHUM S.; VANNAPRASAHT S.; KONGPUNVIJIT J.; HIRANKARN N.; TASSANEEYAKUL W.; AVIHINGSANON Y. Azathioprine-induced fatal myelosuppression in systemic lúpus erythematosus patient carrying TPMT \*3C polymorphism. **Lupus**, v. 17, p. 132-134, 2008.

BOSON, W.L.; ROMANO-SILVA M.A.; CORREA H.; FALCAO R.P.; TEIXEIRA-VIDIGAL P.V.; DE MARCO L. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. **The Pharmacogenomics Journal**. v. 3, p. 178-182, 2003.

COULTHARD S.A.; HOWELL C.; ROBSON J.; HALL A.G. The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. **Blood**, v.92, p. 2856-62, 1998.

COULTHARD S.A.; RABELLO C.; ROBSON J.; HOWELL C.; MINTO L.; MIDDLETON P.G., *et al.* A comparison of molecular and enzyme-based assays for the detection of thiopurine methyltransferase mutations. **Br J Haematol**, v. 110, p. 599-604, 2000.

COULTHARD S.A.; HOGARTH L.A.; LITTLE M.; MATHESON E.C.; REDFERN C.P.F.; MINTO L.; HALL A.G. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. **Mol Pharmacol**, 62: 102-109, 2002.

COULTHARD S.A.; HOGARTH L. The thiopurines: an update. **Invest new drugs**, v. 23, n. 6, p. 523- 532, 2005.

De LA MOUREYERE C.S.V.; DEBUYSERE H.; MASTAIN B.; VINNER E.; MAREZ D.; SABBAGH N.; LO GUIDICE J.M.O. *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of the thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. **Br J Pharmacol** , v. 125, p. 879-887, 1998.

EFRATI E.; ADLER L.; KRIVVOY N. Distribution of TPMT risk alleles for thiopurine toxicity in the Israeli population. **Eur J Clin Pharmacol**, v.65, p.257–262, 2009.

EVANS W.E.; HON Y.Y.; BOMGAARS L.; COUTRE S.; KRYNETSKY E.Y.; RELLING M.V. *et al.* Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patient intolerant to mercaptopurina and azathiopurine. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, p. 2293-2301, 2001.

FRAGA A.O.; COUTINHO P.C.; HATAGIMA A. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort. Águas de Lindóia, SP, Brasil 2009.

FORD L.; KAMPANIS P.; BERG J. Thiopurine S-methyltransferase genotype-phenotype concordance: used as a quality assurance tool to help control the phenotype assay. **Annals of Clinical Biochemistry**, v 46, p. 152-154, 2009.

GISBERT, J.P.; NIÑO P.; RODRIGO L.; CARA C.; GUIJARRO L.G. Thiopurine Methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: Long Term follow-up Study of 394 patients. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, p.2769-2776, 2006.

HIGGS, J.E.; PAYNE K.; ROBERTS C.; NEWMAN W.G.. Are patient with intermediary TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? **Pharmacogenomics**, v. 11, p. 177-188, 2010

HONGENG S.; SASANAKUL W.; CHUANSUMRIT A. *et al.* Frequency of Thiopurine S-Methyltransferase Genetic Variation in Thai Children With Acute Leukemia. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 35, p.410–414, 2000.

IBGE. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Último acesso 16/09/2010.

KRYNETSKI E.Y.; SCHETZ J.D.; GALPIN A.J.; PUI C.H.; RELLING M.V. A single point leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Science**, n. 92, p. 949-953, 1995.

KRYNETSKI E.Y.; EVANS W.E. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: The thiopurine S-methyltransferase paradigm. **Pharm Res**, v. 16, p. 342-349, 1999.

KRYNETSKI E.Y.; EVANS W.E. Drug Metilation in cancer therapy: lessons from TPMT polymorphism. **Oncogene**, v. 22, p.7403-7413, 2003.

KURZAWSKI, M.; DZIEWANOWSKI, K.; CIECHANOWSKI, K.; DROZDZIK, M. Severe azathioprine-induced myelotoxicity in a kidney transplant patient with thiopurine S-methyltransferase deficient genotype (TPMT\*3A/\*3C). **Transplant International**, v.18, n.5, p. 623 – 625, 2005

KURZAWSKI M.; DZIEWANOWSKI K.; GAWRONSKA-SZKLARZ B.; DOMANSKI L.; DROZDZIK M. The impact of Thiopurine S-Methyltransferase Polymorphism on Azathioprine-Induced Myelotoxicity in Renal Transplants Recipients. **The Drug Monit**, v.27, n.4, p. 435-441, 2005.

KUZELICKI, N.K.; RASCAN I.M. Individualization of thioputine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. **Pharmacogenomics**, v. 10, p. 1309-1322, 2009.

LENNARD L.; VAN LOON J.A.; WEINSHILBOUM R.M. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: Relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. **Clin Pharmacol Ther**, p. 149-156,1989.

LENNARD L.; LILLEYMAN J.S.; LOON J.V.; WEINSHILBOUM R.M. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v.336, p. 225–9. 1990.

LENNARD L.; WELCH J.C.; LILLEYMAN J.S. Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity. **Br J Clin Pharmacol**, v.44, p.455-461, 1997.

LENNARD L. Clinical Implications of Thiopurine Methyltransferase – optimization of drug dosage and potencial druga interactions. **Ther Drug Monit**, v.20, p.527-531, 1998.

LENNARD L.; CHEW T.S.; LELLEYMAN J.S. Human Thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. **J. Clin Pharmacol**, v.52, p.539-546, 2001.

McLEOD H.L.; RELLING M.V.; LIU Q.; PUI C.H.; EVANS W.E. Polymorphic Thiopurine Methyltransferase in erythrocytes Is Indicative of Activity in Leukemic Blasts From Children With Acute Lymphoblastic Leukemia **Blood**, v. 85, n. 7 (April I), p. 1897-1902, 1995.

McLEOD H.L.; KRYNESTSKI E.Y.; EVANS W.E. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, n.14, p.567-72, 2000.

NETO, M.P.; ALVES A.N.L.; FORTINI A.S.; BURATTINI M.N.; SUMITA N.M.; SROUGI M.; CHOCAIR P.R. Monitorização Terapêutica da Azatioprina:uma revisão. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 3, p. 161-167, 2008

OENDER, K.; LANSCHUETZER C.M.; LAIMER M. *et al.* Introducing a fast and simple PCR-RFLP analysis for the detection of mutant thiopurine S-methyltransferase alleles TPMT\*3A and TPMT\*3C. **JEAVD**, v. 20, p. 396-400, 2006.

OH K.T.; ANIS A.H.; BAE S.C. Pharmacoeconomic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism screening by polymerase chain reaction for treatment with azathioprine in Korea. **Rheumatology**, v. 43, p.156-163, 2003.

OTTERNESS D.; SZUMLANSKI C.; LENNARD L.; KLEMETSDAL B.; AARBAKKE J.; PARK-HAH J.O. *et al.* Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. **Clin. Pharmacol Ther**, v.62, p.60-73, 1997.

OTTERNESS D.; SZUMLANSKI, C.; WOOD T.; WEINSHILBOUM R. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. **J Clin. Invest.**, v.. 101, p.1036-1044, 1998.

REIS M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 577-86, 2006

REIS M.; SANTORO A.; SAUAREZ-KURTZ G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. **Pharmacogenetics**, v.13, p.371-373, 2003.

RELLING M.V.; HANCOCK M.L.; BOYETT J.M.; PUI C-H; EVANS W.E. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 93, n.9, p. 2817-23. 1999.

RELLING M.V.; HANCOCK M.L.; RIVERA G.K.; SANDLUND J.T.; RIBEIRO R.C.; KRYNETSKI E.Y.. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. **J Natl Cancer Inst**, v.91, p. 2001-8, 1999.

RELLING M.V.; GARDNER E.E.; SANDBORN W.J.; SCHMIEGELOW K.; PUI C-H; YEE S.W.; STEIN C. M.; CARRILLO M.; EVANS W.E.; KLEIN T.E. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.89, p.387-391, 2011.

ROBERTS L.R.; BARCLAY M.L.; GEARRY R.B.; KENNEDY M.A. A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutation. **Clin Chim Acta**. n.341, p. 49-53, 2004.

SAHASRANAMAN S.; HOWARD D.; ROY S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. **Eur J Clin Pharmacol**, v.64, p.753-767, 2008.

SALAVAGGIONE O.E.; WANG L.; WIEPERT M.; YEE V.C.; WEINSHILBOUM R.M. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. **Pharmacogenet genomics**, v.15, p. 801-815, 2005.

SASAKI T.; GOTO E.; KONNO Y.; HIRATSUKA M.; MIZUGAKI M. Three novel single nucleotide polymorphism of the human thiopurine S-methyltransferase gene in Japanese individuals. **Drug Metab Pharmacokin**, v. 4, p. 332-336, 2006.

SCHAEFFELER E.; LANG T.; ZANGER U.M.; EICHELBAUM M.; SCHWAB M. High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. **Clin Chem**, v.47, p. 548-555, 2001.

SCHAEFFELER E.; LANG T.; ZANGER U.M.; EICHELBAUM M.; SCHWAB M. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. **Pharmacogenetics**, v.14, p.407- 417, 2004.

SCHAEFFELER E.; EICHELBAUM M.; REINISCH W.; ZANGER U.; SCHWAB M. Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT\*20, \*21, \*22). Association with decreased enzyme function. **Hum mut**, v.921: p.1-8, 2006.

SILVA, M.R. Polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças com leucemia linfocítica aguda. Belo Horizonte, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais

SILVA, M.R.; OLIVEIRA B.M.; VIANA M.B.; MURAO M.; ROMANHA A.J. Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) Gene Polymorphism in Brazilian children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Association with clinical and laboratory data. **The Drug Monit**, v.30, n.6. 2008

SZUMLANSKI C.; OTTERNESS D.; HER C.; LEE D.; BRANDRIFF B.; KESSELL D. *et al.* Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. **DNA Cell Biol**, v. 15, p.17-30. 1996.

Tai H-L.; KRYNETSKI E.Y.; YATES C.R.; EVANS W.E. *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**, v.58, p.694-702, 1996.

Tai H-L.; KRYNETSKI E.Y.; SCHUETZ E.G.; YANISHEVSKI Y.; EVANS W.E. Enhanced proteolysis of thiopurine S- methyltransferase (TPMT) encoded by mutants alleles in humans (TPMT\*3A, TPMT\*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. **Pro Natl Acad Sci** v.94, p.6444-6449, 1997.

WANG, L.; WEINSHILBOUM R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. **Oncogene**, v. 25, p. 1629-1638, 2006.

WEINSHILBOUM R.M.; SLADEK S.L. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenetic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. **Am J Hum Genet** v.32, p.651-662, 1980.

WEINSHILBOUM R. Thiopurine Pharmacogenetics: clinical and molecular studies of Thiopurine Methyltransferase . **Drug Metabolism and Disposition**, v.29, n.4, part 2, p.601-605, 2001.

WUSK B.; KULLAK-UBLICK A. RAMMERT C. *et al.* Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms: efficient screening method for patients considering taking thiopurine drugs. **Eur J Clin Pharmacol**, v.60, p. 5-10, 2004.

YATES CR.; KRYNETSKI E.Y.; LOENNECHEN T.; FESSING M.Y.; TAI H.L.; PUI C.H. *et al.* Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. **Ann Intern Med**, v.126, p. 608-614, 1997.

ZHOU, S. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. **Current Clinical Pharmacology**, v.1, p. 119-128, 2006.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As medicações “azatioprina” e “mercaptopurina” são utilizadas para tratar diversas doenças, como alguns tipos de câncer, como as leucemias, e várias outras doenças. Entretanto, essas medicações nem sempre tem o resultado esperado nas pessoas, podendo inclusive piorar a sua saúde. Essas diferenças (melhora ou piora da doença após utilização do medicamento) foram correlacionadas com as formas alteradas de uma molécula (chamada Tiopurina metiltransferase, ou TPMT) que participa do metabolismo dessas medicações. As pessoas que apresentam uma TPMT alterada e usam essas medicações podem apresentar complicações, precisando interromper o uso.

Você esta sendo convidada (a) a participar de uma pesquisa que será realizada na UNIVILLE- Universidade da Região de Joinville – sobre **“Prevalência do polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) na População de Joinville”**, mediante conhecimento da sua proposta, riscos e benefícios. Este estudo objetiva verificar a possível existência de pequenas diferenças (chamadas “polimorfismos”) na composição do material genético (DNA) dessa enzima.

Portanto, será necessária sua autorização para:

- a) Utilizar a amostra de sangue já coletado pelo HEMOSC (para a realização dos exames necessários pelo mesmo) e que o restante da amostra seja utilizado para o estudo genético desta enzima. Foi esclarecido de que não será coletado sangue apenas para realização de pesquisa, que não será coletada maior quantidade de sangue do que a necessária para o exame de rotina.
- b) Os riscos e a ocorrência de dor, inchaço ou infecção no local da coleta são considerados mínimos, e são os inerentes da doação de sangue, não oferecendo risco adicional . A amostra será encaminhada ao Laboratório de Pesquisa em Saúde I da UNIVILLE onde será arquivada e analisada.

Na pesquisa atual somente serão investigadas os polimorfismos da tiopurina metiltransferase. Adicionalmente, pedimos sua autorização para armazenamento de

seus dados e amostra de DNA por cinco anos, para a investigação de outras regiões do seu genoma (conjunto de informações genéticas individuais) no futuro. De qualquer forma, nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, este material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso.

Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todos os participantes serão mantidos sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. É garantido seu direito de ser informado quanto ao resultado do exame, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide nomes e formas de contato ao final deste documento) antes, durante ou após a conclusão da sua participação.

Não haverá compensação (pagamento) financeira pela sua participação ou ressarcimento de despesas, uma vez que a coleta de sangue será realizada durante uma visita de acompanhamento médico rotineiro. Nenhum procedimento da pesquisa trará custos a você ou ao sistema de saúde.

**A participação em qualquer pesquisa é voluntária.** Você não será prejudicado(a), de forma alguma, ao longo do seu acompanhamento médico periódico normal caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento.

**Atenção:** em caso de dúvidas, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Campus Universitário Bom Retiro, Caixa Postal 246, CEP: 89201-971, Joinville SC.

*Eu, \_\_\_\_\_ (nome do paciente), após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de*

*minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação na pesquisa **“Prevalência do polimorfismo do gene da tiopurina Metiltransferase (TPMT) na população de Joinville”**.*

---

Assinatura do Participante

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Responsáveis pela pesquisa:

Gabriela Roncone Gastal

Instituição: Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE

Fones: (47) 34619197; (47) 88688878

a) E-mail: gabigastal@hotmail.com

**APÊNDICE B – REGISTRO DOS DADOS**

NI: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) F ( ) M

Cor/Raça: ( ) Branco

( ) Negro

( ) Pardo

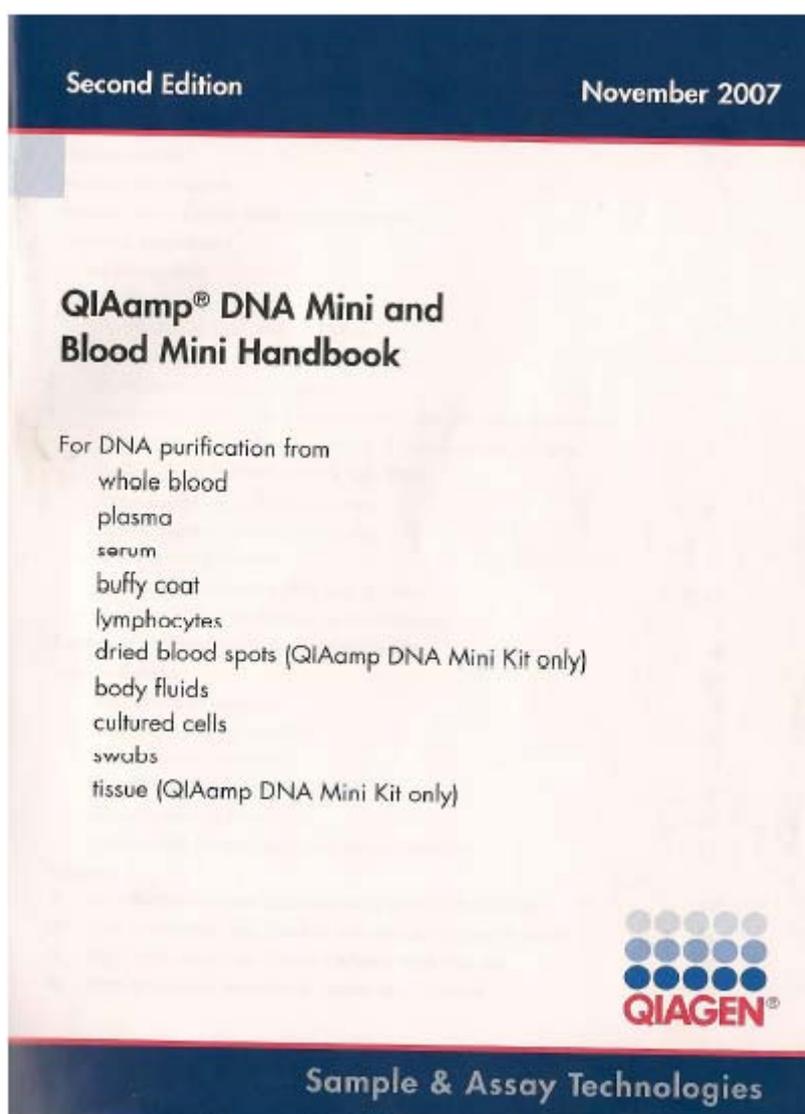
( ) Amarelo

( ) Indígena

Deseja saber o resultado do seu teste genético? ( ) S ( ) N

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Protocolo de Extração de DNA usando o kit QIAamp Qiagen



## Anexo 2. Carta de envio de artigo para revista científica

### REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) GABRIELA RONCONE GASTAL

Referente ao código de fluxo: 1338  
Categoria: Artigo Original

Informamos que recebemos o manuscrito **PODEMOS PREVENIR A TOXICIDADE NA ADMINISTRAÇÃO DE TIOPURINAS?** Análise da prevalência dos polimorfismos da TMPT em Joinville/SC será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de referência apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho a(o) Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Dados de Acesso  
Usuário: gabigastal  
Senha: gabi22

Atenciosamente,

Dr. Milton Artur Ruiz  
Editor

Av. Nossa Sra. de Copacabana, 1.059 sala 1.201 - Copacabana  
Rio de Janeiro - RJ - Brazil  
CEP 22060-001  
Tel/Fax: (21) 2521-6905  
email: brazilbloodjournal@yahoo.com.br

««« Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP »»»

### REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) GABRIELA RONCONE GASTAL

Referente ao código de fluxo: 1338  
Categoria: Artigo Original

Informamos que recebemos **A CORREÇÃO** do manuscrito **PODEMOS PREVENIR A TOXICIDADE NA ADMINISTRAÇÃO DE TIOPURINAS?** . O trabalho será reanalisado para possível publicação na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Por favor, para qualquer comunicação sobre o referido manuscrito, cite o número do código de fluxo apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

Atenciosamente,

Dr. Milton Artur Ruiz  
Editor

Av. Nossa Sra. de Copacabana, 1.059 sala 1.201 - Copacabana  
Rio de Janeiro - RJ - Brazil  
CEP 22060-001  
Tel/Fax: (21) 2521-6905  
email: brazilbloodjournal@yahoo.com.br

««« Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP »»»