

Università di Pisa
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia



Tesi finale

**“Analisi farmacogenetica dell’enzima TPMT in
pazienti in trattamento con azatioprina”**

Relatori:

Chiar.mo Prof. Mario Del Tacca

Chiar.mo Prof. Corrado Blandizzi

Candidato:

Dr. Giovanni Gori

Anno Accademico 2010

Settore disciplinare BIO14

Indice

Riassunto	pag. 3
1-Introduzione	pag. 5
2-Farmaci tiopurinici	pag. 9
2.1-Profilo farmacodinamico	pag. 9
2.2-Profilo farmacocinetico	pag. 12
2.3-Indicazioni terapeutiche e modalità di somministrazione	pag. 15
2.4-Profilo di tollerabilità	pag. 17
3-Malattie infiammatorie croniche intestinali	pag. 20
4-Malattie infiammatorie croniche reumatologiche	pag. 22
5-Tiopurina S-metiltransferasi (TPMT)	pag. 23
5.1-Polimorfismi del gene TPMT	pag. 25
5.2-Variazioni inter-etniche degli alleli TPMT	pag. 27
5.3-Correlazioni genotipo-fenotipo	pag. 29
5.4-Incongruenze genotipo-fenotipo	pag. 31
6-Parte Sperimentale	pag. 33
6.1-Razionale e obiettivo dello studio	pag. 33
6.2-Pazienti e metodi	pag. 33
6.3-Risultati	pag. 40
6.4-Discussione	pag. 49
6.5-Conclusioni	pag. 52
Bibliografia	pag. 53

Riassunto

Introduzione. La comparsa di eventi avversi e il fallimento terapeutico sono problemi che si manifestano spesso in corso di trattamento con azatioprina (AZA) in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche reumatologiche e gastroenterologiche. AZA subisce un metabolismo inattivante da parte dell'enzima tiopurina-metiltransferasi (TPMT), la cui attività è principalmente influenzata da quattro polimorfismi genici a singolo nucleotide.

Obiettivo. Lo studio oggetto della presente tesi è stato condotto con l'obiettivo di valutare la distribuzione del genotipo (studio dei polimorfismi genici) e del fenotipo (analisi dell'attività enzimatica) dell'enzima TPMT e la capacità di questi determinanti di predire tossicità ed efficacia di AZA in una coorte di pazienti gastroenterologici e reumatologici affetti da patologie infiammatorie croniche. **Metodi.** I genotipi TPMT *2,*3A,*3B,*3C sono stati analizzati con metodica PCR (*restriction fragment length polymorphism* o metodiche allele-specifiche), mentre l'attività enzimatica intraeritrocitaria di TPMT è stata valutata con saggi di *High Performance Liquid Chromatography* (conversione di 6-tioguanina in 6-metil-tioguanina, 6MTG). I dati clinici dei pazienti sono stati raccolti dalle cartelle cliniche delle Unità Operative di Reumatologia, Pediatria e Gastroenterologia Universitaria dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana. **Risultati.** Per la valutazione della prevalenza delle mutazioni, sono stati analizzati 223 pazienti che hanno mostrato i genotipi seguenti: omozigosi *1/*1 o *wild type* (WT) (n=208); omozigosi *3C/*3C (n=1), eterozigosi *1/*3A (n=11); eterozigosi *1/*3C (n=2) e eterozigosi *3A/*3C (n=1). Per la valutazione della capacità predittiva dell'assetto genetico di TPMT su efficacia e tollerabilità di AZA, sono stati valutati 104 pazienti affetti da malattia di Crohn (n=15), rettocolite ulcerosa (n=12), connettiviti sistemiche (n=35), vasculiti (n=28) e altre malattie autoimmuni (n=14). In 40 pazienti (38,5%), entro una mediana di 7 mesi (intervallo: 0,5-80), sono stati osservati uno o più degli eventi avversi seguenti: leucopenia

(10,6%), infezioni gravi (5,8%), tossicità epatica (13,5%), pancreatite (2,9%), sintomi gastrointestinali (8,7%) o sistemici (7,7%). Polimorfismi TPMT sono stati evidenziati in 4 pazienti: 3 eterozigoti TPMT*3A (2,9%) e 1 omozigote *3C/*3C (0,9%). Tra questi, 3 pazienti hanno sviluppato tossicità. AZA è risultata efficace in 89 pazienti (n=87 WT, n=2 *1/*3A) e inefficace in 4 (n=2 WT, n=1 *1/*3A, n=1 *3C/*3C). Il genotipo WT è risultato predittivo di successo terapeutico (RR 1,74; IC 0,65-4,65; p<0,04). L'attività TPMT mediana, analizzata in un sottogruppo di 27 pazienti (n=26 WT, n=1 *1/*3A), è risultata 54,2 nmol 6MTG/gHb/h (intervallo: 32,4-106,8). In accordo con un *cut-off* validato, è stata osservata una ridotta attività enzimatica in 3 pazienti WT e 1 eterozigote. I valori di attività TPMT nei rimanenti pazienti WT (n=23) sono risultati entro l'intervallo di normalità. Tra questi pazienti, 9/23 hanno sviluppato eventi avversi e 18/23 hanno manifestato un buon controllo di malattia. **Conclusioni.** La presenza di polimorfismi TPMT può predire la comparsa di tossicità correlata al trattamento con AZA. La presenza di un genotipo WT appare un buon predittore di efficacia terapeutica, ma non esclude la possibilità di sviluppare eventi avversi. La valutazione del fenotipo TPMT suggerisce che un controllo favorevole della malattia possa essere ottenuto nei pazienti con attività enzimatica normale. La valutazione combinata di genotipo e fenotipo TPMT può rappresentare un utile strumento farmacologico per la gestione clinica dei pazienti in trattamento con AZA.

1. Introduzione

La farmacogenomica rappresenta una delle prime applicazioni cliniche dell'era postgenomica. L'obiettivo principale di questa disciplina consiste nella personalizzazione della terapia farmacologica attraverso la scelta dei farmaci o la regolazione della dose basate su valutazioni dirette (es. genotipo) o indirette (es. fenotipo) dello specifico profilo genetico del singolo paziente. Lo sviluppo della farmacogenomica dovrebbe consentire il superamento delle attuali limitazioni della terapia farmacologica, quali la scelta della dose individuale su basi empiriche o l'utilizzazione di una dose standard di farmaco per tutti i pazienti indipendentemente dalle loro condizioni individuali (Swen et al., 2007; Huang e Temple, 2008)

Il concetto di una differenza interindividuale nella risposta ai farmaci determinata da fattori genetici è stato proposto nel 1909 da Garrod nel suo libro *The Inborn Errors of Metabolism*. Nel 1957 Motulsky suggerì che le differenze sia nelle risposte terapeutiche che nelle reazioni avverse ai farmaci potrebbero essere spiegate con l'ereditarietà (Motulsky, 1957). Nel 1959 Vogel coniò il termine "farmacogenetica" (Vogel, 1959). Il primo articolo che mostra come il polimorfismo genetico possa influenzare la concentrazione ematica di un farmaco, nella fattispecie l'isoniazide, risale al 1960 (Price Evans et al., 1960). Attualmente numerose evidenze sperimentali e cliniche dimostrano che l'effetto di un particolare farmaco viene influenzato da un certo numero di geni che codificano per enzimi metabolici, trasportatori, recettori, etc. (Givens e Watkins, 2003).

A causa della peculiarità del tratto genetico individuale, la maggior parte dei

pazienti trattati con determinati farmaci manifesta un miglioramento dello stato patologico senza sviluppare effetti avversi di particolare rilievo, mentre alcuni individui non rispondono in modo soddisfacente alla terapia farmacologica, oppure sviluppano tossicità gravi, tali da richiedere l'interruzione del trattamento (Del Tacca, 2002). Per un determinato gene possono esistere vari alleli in grado di codificare forme molecolari diverse della stessa proteina (varianti genetiche) o in grado di condizionare l'espressione di quantità diverse della stessa forma molecolare della stessa proteina (Relling e Giacomini, 2006).

Le varianti alleliche presenti in una popolazione con una frequenza uguale o superiore all'1% sono definite "polimorfismi". Due tipi principali di variazioni della sequenza nucleotidica del DNA sono state associate a variazioni del fenotipo: il polimorfismo a nucleotide singolo (SNP) e l'inserzione/delezione di sequenze nucleotidiche (ins/del), che è relativamente infrequente rispetto agli SNP (Relling e Giacomini, 2006). Solo una frazione degli SNP presenti in un genoma determina conseguenze clinicamente significative. Dei circa 20-80 milioni di SNP stimati per il genoma umano, si pensa che solo circa 300.000 alterino le sequenze esoniche dei geni. Tra gli SNP non-sinonimi, cioè quelli che causano la sostituzione di un aminoacido nella proteina codificata dal gene, solo una parte determinano una variazione del fenotipo e/o della proteina. Tra gli SNP che causano modificazioni nella regione conservata del gene, solo una piccola parte determina un'alterazione dell'attività del prodotto genico, e un numero ancora minore riesce a modificare i parametri farmacocinetici o la risposta clinica a un farmaco (Pandhi, 2006).

In altri termini, alcuni polimorfismi non sembrano provocare modificazioni evidenti del fenotipo, mentre altri alterano significativamente l'espressione e la funzione delle proteine e determinano la comparsa di fenotipi che possono influenzare la manifestazione di particolari patologie o condizionare la risposta ai farmaci, sia in termini di efficacia che di tollerabilità (Nakamura, 2008). L'interpretazione del significato di questi polimorfismi risulta quindi di primaria importanza per l'individualizzazione delle terapie farmacologiche (Del Tacca, 2002).

Un esempio clinicamente importante di polimorfismo genetico è rappresentato dal gene che codifica per tiopurina S-metiltransferasi (TPMT), l'enzima responsabile della trasformazione metabolica di farmaci antimetaboliti citotossici, utilizzati nella chemioterapia antitumorale e immunosoppressiva, quali azatioprina, 6-tioguanina e 6-mercaptopurina (Coulthard e Hall, 2001; Wang et al., 2011)

Il monitoraggio clinico e, in particolare, la valutazione genetica e fenotipica di alcuni determinanti molecolari del metabolismo dei farmaci (*“genomic biomarkers”*) si ispira alle indicazioni espresse dalla *Food and Drug Administration* nella *“Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels”*. In questo documento sono elencati i biomarcatori genetici attualmente disponibili, i farmaci interessati e le indicazioni cliniche per le quali può essere raccomandata l'esecuzione del test genetico, identificato, in base alle evidenze scientifiche, quale “necessario”, “raccomandato” -come nel caso della farmacogenetica di TPMT- o solamente “informativo” (FDA, 2011).

Recentemente, in occasione della *“Third European Science Foundation-University of Barcelona (ESF-UB) Conference in Biomedicine on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics”* tenutasi in Spagna, si è confermata l'utilità clinica di dieci test farmacogenetici (KRAS-cetuximab e panitumumab, EGFR-gefitinib, CYP2D6-tamoxifen, TPMT-azathioprine-6-mercaptopurine, VKORC1/CYP2C9-warfarin, CYP2C19-clopidogrel, HLA-B*5701-abacavir, HLA-B*5701-flucloxacillin, SLC01B1-statins and CYP3A5-tacrolimus), tra cui è annoverata anche la valutazione dei polimorfismi di TPMT nei pazienti in trattamento con farmaci tiopurinici (Becquemont et al., 2010)

Per quanto riguarda i pazienti candidati al trattamento con azatioprina o 6-mercaptopurina, nel periodo 2005-2010 sono state eseguite oltre 200 determinazioni dei polimorfismi del gene TPMT (genotipizzazione) ed oltre 80 dosaggi dell'attività enzimatica di TPMT (fenotipizzazione) in campioni di sangue di pazienti ricoverati in regime ordinario o di day hospital presso le Unità Operative di Reumatologia, Gastroenterologia Universitaria, Gastroenterologia Pediatrica dell'AUOP e l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa.

2-Farmaci tiopurinici

2.1- Profilo farmacodinamico

Da oltre quarantacinque anni i farmaci tiopurinici, comprendenti 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG) e azatioprina (AZA), sono utilizzati comunemente come farmaci immunosoppressori per il trattamento di patologie, quali neoplasie, malattie infiammatorie croniche intestinali, varie malattie autoimmuni, profilassi e trattamento del rigetto di organi trapiantati. 6-MP e 6-TG sono state sintetizzate dai Premi Nobel Gertrude Elion e George Hutchings (Chabner, 1988) per sostituzione del gruppo chetonico sul carbonio 6 dell'ipoxantina e della guanina, rispettivamente, con un atomo di zolfo (Figura 1).

AZA è un profarmaco della 6-MP e contiene un gruppo imidazolico connesso all'atomo di zolfo in posizione 6 dell'anello purinico (Khodabakhshi, 2001), (Figura 2). L'inosina, la guanosina e i loro analoghi sono convertiti in nucleotidi dopo l'azione di una purina nucleoside chinasi. Questo enzima fosforila il ribosio nucleosidico e ne determina il distacco dalla base. Quest'ultima può essere convertita nel corrispondente nucleotide dall'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT).

6-TG e 6-MP sono entrambe substrati dell'enzima HGPRT, che le converte rispettivamente nei ribonucleotidi 6-tioguanosina-5'-monofosfato (6-tioGMP) e 6-tioinosina-5'-monofosfato (6-tioIMP).

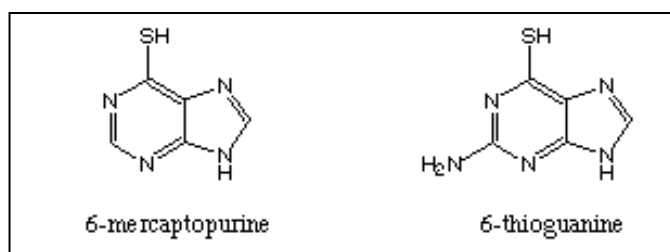


Figura 1. Formule di struttura di 6-mercaptopurina e 6-tioguanina

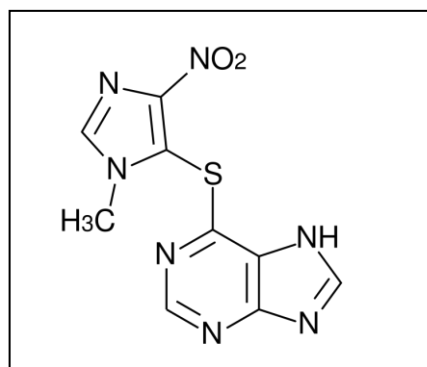


Figura 2. Formula di struttura di azatioprina

L'accumulo di 6-tioIMP può inibire numerose reazioni metaboliche quali la conversione dell'inosina-5'-monofosfato (IMP) ad adenosina-5'-monofosfato-succinato (AMPS) e poi ad adenosina-5'-monofosfato (AMP), e l'ossidazione dell'IMP a xantina-5'-monofosfato (XMP) a opera dell'inosilato deidrogenasi. Queste reazioni sono tappe cruciali della conversione dell'IMP a nucleotidi guaninici e adeninici (Carrico e Sartorelli, 1977).

Le concentrazioni di 6-tioGMP, che si raggiungono dopo somministrazione di 6-MP, sono sufficienti a causare una progressiva e irreversibile inibizione dell'inosinato deidrogenasi. Inoltre 6-tioGMP e 6-tioIMP possono causare inibizione a *feed-back* della prima tappa enzimatica coinvolta nella biosintesi *de novo* delle purine, ovvero la reazione tra glutammina e fosforibosilpirofosfato

(PRPP) a formare ribosilamina-5'-monofosfato. Attualmente non è stato stabilito con precisione il ruolo dell'incorporazione di 6-TG o 6-MP nel DNA cellulare nella determinazione degli effetti terapeutici e tossici di questi antimetaboliti. Alcuni studi indicano che una breve esposizione a 6-TG può causare un blocco nella sintesi di glicoproteine a livello della membrana cellulare. I derivati delle tioguanine causano riduzione della proliferazione cellulare, in modo particolare delle cellule in rapida proliferazione, tra le quali la popolazione linfocitaria. I linfociti T svolgono un ruolo importante nella fisiopatologia delle malattie autoimmuni. Un'attivazione ottimale dei linfociti T richiede l'applicazione di due stimoli contestuali. L'applicazione di un solo stimolo, in assenza di un segnale co-stimolatore secondario, può portare alla "morte cellulare programmata" o apoptosi. Il segnale co-stimolatore è rappresentato dal legame del recettore del linfocita T con la proteina di membrana CD28, la quale induce un aumento di attività del fattore di trascrizione nucleare NF-kB (Maltzman e Koretzsky, 2003). Una volta traslocato nel nucleo, NF-kB promuove la trascrizione del gene anti-apoptotico *Bcl-xl*. Pertanto in assenza del segnale secondario si verifica apoptosi. La stimolazione in vitro dei linfociti T umani, in presenza di AZA o 6-MP, determina un incremento percentuale delle cellule apoptotiche (Tiede et al., 2003). Inoltre 6-MP interagisce direttamente con *Rac1*, una proteina di piccole dimensioni che lega GTP, bloccando in tal modo l'*up-regulation* di *Bcl-xl* (Maltzman e Koretzsky, 2003).

E' stato osservato che pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali, in seguito a trattamento con AZA, mostrano un numero più elevato di cellule mononucleate apoptotiche rispetto ai controlli non trattati, indicando che

questo meccanismo potrebbe essere responsabile della risposta terapeutica della malattia al trattamento con derivati tioguaninici (Tiede et al., 2003).

Prendendo in considerazione il fatto che i derivati delle tioguanine svolgono azioni molteplici, le quali coinvolgono sistemi vitali per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, quali la biosintesi delle purine, le interconversioni nucleotidiche, la sintesi di DNA e RNA, la replicazione cromosomica e la sintesi di glicoproteine, non è possibile identificare un singolo evento biochimico responsabile della loro citotossicità (Mc Cormack e Johns, 1982).

2.2-Profilo farmacocinetico

Dopo somministrazione orale, l'assorbimento della 6-MP è incompleto e la sua biodisponibilità è ridotta dal metabolismo di primo passaggio. Dopo somministrazione per via endovenosa, l'emivita plasmatica del farmaco è relativamente breve (circa 50 minuti) a causa della marcata captazione cellulare, della rapida biotrasformazione epatica e dell'escrezione renale. Sono state identificate e caratterizzate due principali vie metaboliche responsabili della biotrasformazione inattivante della 6-MP: la prima comprende la metilazione dei gruppi sulfidrilici a opera dell'enzima TPMT, con successiva ossidazione dei derivati metilati; la seconda coinvolge l'enzima xantina ossidasi che ossida il farmaco ad acido tiourico, un metabolita inattivo (Seidman, 2003; de Boer, 2008) (Figura 3). L'assorbimento della 6-TG dopo somministrazione orale è incompleto e le concentrazioni del farmaco nel plasma sono estremamente variabili, potendo fluttuare anche di dieci volte o più. Concentrazioni plasmatiche massime vengono

raggiunte dopo 2-4 ore dalla somministrazione orale. Nelle urine compare il derivato S-metilato, 2-amino-6-metilpurina, prodotto nel fegato dall'azione enzimatica della TPMT, ma non si riscontra la 6-TG in forma immodificata. Rispetto alla 6-MP, a partire dalla 6-TG si formano quantità minori di acido tiourico, suggerendo che la deaminazione catalizzata dall'enzima guanasi non svolge un ruolo significativo nell'inattivazione metabolica della 6-TG.

AZA è disponibile sia per somministrazione orale che endovenosa. E' bene assorbita nel tratto gastrointestinale, con picco ematico osservabile a distanza di 1-2 ore dalla somministrazione. In seguito all'esposizione ad agenti nucleofili, quali glutatione, AZA viene scissa con meccanismo non-enzimatico a 6-MP (Figura 4). A questo punto i due farmaci seguono il medesimo metabolismo. Il farmaco e i suoi metaboliti sono eliminati prevalentemente nelle urine.

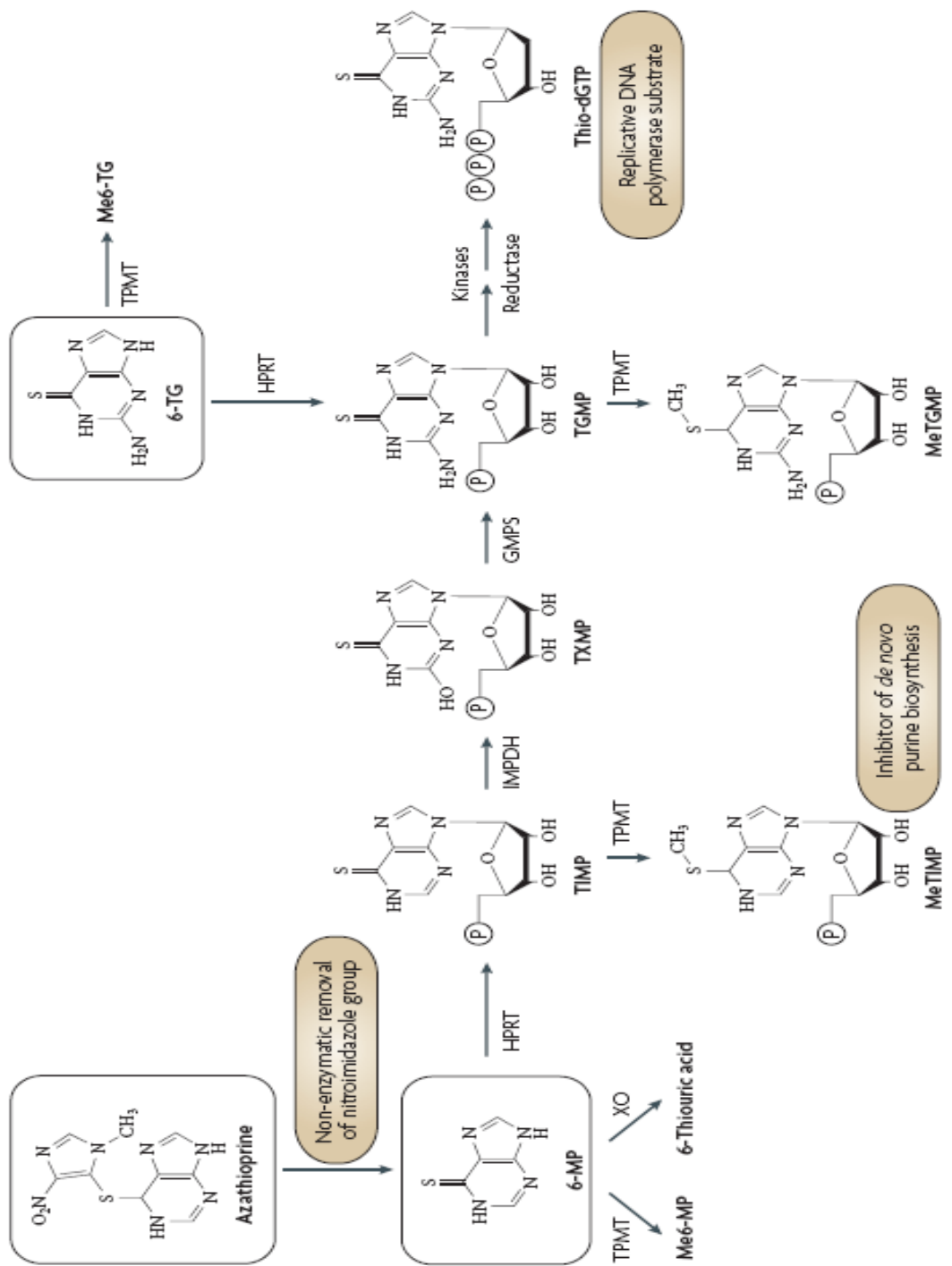


Figura 3. Metabolismo dei farmaci tiopurinici (Karran e Attard, 2008)

2.3-Indicazioni terapeutiche e modalità di somministrazione

Leucemia linfoblastica acuta. 6-MP è utilizzata nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta soprattutto nella fase di mantenimento della remissione (Bell et al., 2004; Karran e Attard, 2008). Non è invece efficace nel trattamento della leucemia linfocitica cronica, del linfoma di Hodgkin, di altri linfomi non-Hodgkin e di una vasta serie di carcinomi (Khodabakhshi, 2001). La dose quotidiana iniziale della 6-MP è di 2,5 mg/kg. I dosaggi di partenza variano di solito tra 100 e 200 mg al giorno. Quando si osserva un miglioramento del quadro ematologico e clinico si riduce la dose di 25 mg o di un suo multiplo e si continua la terapia di mantenimento alla dose di 1,5-2,5 mg/kg/die. Se non si osservano effetti benefici dopo 4 settimane di trattamento, la dose quotidiana può essere aumentata fino a un massimo di 5 mg/kg, fino a che non si osservano segni di tossicità.

La dose totale in grado di indurre depressione del midollo osseo in pazienti affetti da neoplasie maligne non ematologiche è pari a circa 45 mg/kg e può variare tra 18 e 106 mg/kg. Sono state descritte remissioni delle neoplasie midollari in più del 40% dei bambini affetti da leucemia acuta. Negli adulti i risultati sono meno incoraggianti (Corominas et al., 2003).

6-TG ha indicazioni terapeutiche simili a quelle elencate per 6-MP (Karran e Attard, 2008). La dose giornaliera media di 6-TG è di 2 mg/kg. Se non si osservano miglioramenti clinici dopo 4 settimane di terapia il dosaggio può essere aumentato con cautela fino a 3 mg/kg/die. Questo farmaco è stato utilizzato con successo nel trattamento della leucemia acuta ed è uno dei farmaci più efficaci nell'indurre la remissione della leucemia granulocitica acuta. Analogamente a quanto osservato

per la 6-MP, la 6-TG non è efficace nel trattamento dei tumori solidi (Markowitz, 2003).

Anti rigetto d'organo. AZA è stato uno dei primi farmaci utilizzati per prevenire il rigetto del trapianto di fegato (Murray et al., 1963; Thervet, 2008; Levy et al., 2006; Lee et al., 2008), rene (Bakr et al., 2008), cuore (Alibadi et al., 2007; Annemans et al., 2007) e polmone (Palmer et al., 2001; McNeil et al., 2006). La terapia profilattica viene solitamente iniziata con dosi giornaliere di 3 mg/kg.

Malattie infiammatorie croniche intestinali. 6-MP e AZA sono comunemente utilizzate nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali, quali la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa (Leong et al., 2008; Török et al., 2008). Questi farmaci hanno una provata efficacia per l'induzione e il mantenimento della remissione nei pazienti corticosteroido-resistenti o corticosteroido-dipendenti, per la guarigione delle fistole e per la prevenzione delle recidive post-operatorie nella malattia di Crohn (Shaye et al., 2007).

Malattie reumatologiche. AZA è utilizzata come disease modifying drug in molte condizioni patologiche di interesse reumatologico, quali le vasculiti sistemiche (Walter et al., 2008; Chen e Carlson, 2008), le malattie del connettivo, quali il lupus (Bertsias e Boumpas, 2008) e la sclerodermia (Scheja et al., 2007); trova inoltre indicazione nell'artrite psoriasica (Claudepierre e Bagot, 2008), nelle spondiliti (Juillerat et al., 2007), nella sindrome di Sjogren (Kaufman et al., 2008) e nell'artrite reumatoide (Malysheva et al., 2008), nella sindrome di Behçet (Akman-Demir G et al., 2011)

Malattie dermatologiche. AZA trova impiego anche in dermatologia per il trattamento di molte dermatosi infiammatorie quali il pemfigoide, il pemfigo (Firooz et al., 2008) e l'eczema atopico (Tan et al., 1997; Belloni et al., 2008).

2.4-Profilo di tollerabilità

I pazienti con patologie reumatologiche sembrano manifestare tossicità in circa il 20% dei casi. In accordo con i più recenti dati disponibili in letteratura, AZA risulta ben tollerata in una percentuale di pazienti compresa tra 60 e 70%. Il 15% circa dei pazienti trattati manifesta un grado di tollerabilità discreto, mentre nel 10% si osserva un grado minimo di tollerabilità. In ambito gastroenterologico, circa il 75% dei pazienti viene trattato con AZA senza che si manifestino eventi avversi tali da costringere all'interruzione del trattamento farmacologico (Sahasranaman et al., 2008).

Le tiopurine sono caratterizzate da due tipi di tossicità: dose-indipendente, o idiosincrasica, e dose dipendente. Gli eventi avversi idiosincrasici più frequentemente riscontrati in corso di trattamento con AZA sono rappresentati da nausea, febbre, rash cutanei e sintomi simil-influenzali (Gisbert et al., 2006; Fargher et al., 2007), mentre il riscontro di pancreatite risulta essere più raro (Bermejo et al., 2008).

Tra gli effetti avversi dose-dipendenti, l'epatotossicità è una complicanza relativamente poco comune, ma potenzialmente grave (Shaye et al., 2007). In un terzo dei pazienti si accompagna a ittero. Si può manifestare come incremento di transaminasi e sindrome simil-influenzale con fatica, nausea, cefalea, e spesso si

risolve con la sospensione del farmaco. Molti studi hanno suggerito un'associazione tra livelli intra-eritrocitari del metabolita 6MMP e alterazioni della funzionalità epatica in pazienti pediatrici (Cuffari et al., 1996; Dubinski et al., 2000), ma quest'ipotesi è stata recentemente confutata dai risultati di studi che sottolineano una scarsa sensibilità e specificità della valutazione dei livelli di 6MMP nella prevenzione della tossicità epatica (Shaye et al., 2007). In altri casi la tossicità epatica si manifesta con un quadro colestatico o con una sindrome vasculitica intraepatica (peliosi), di probabile genesi idiosincrasica.

Sebbene la frequenza di comparsa di tossicità ematologica sia piuttosto contenuta, essa rappresenta l'evento avverso più temibile in corso di terapia con farmaci 6-tiopurinici, potendo determinare anche *l'exitus* del paziente. Le casistiche più recenti indicano una prevalenza di mielotossicità che varia dall'1 al 5% (Coulthard e Hogart, 2005; Pierik et al., 2006; Gisbert e Gomollón, 2008), con maggiore frequenza di leucopenia, seguita da forme di trombocitopenia e anemia (Hindorf et al., 2006). I meccanismi alla base di questa forma di tossicità sembrano essere dose-dipendenti e si manifestano dopo mesi dall'inizio della terapia con AZA (solitamente entro 12 mesi), suggerendo quindi meccanismi di accumulo dei metaboliti tossici. La mielotossicità insorge soprattutto in pazienti con ridotta attività enzimatica di TPMT (Kurzawski et al., 2005). È stato proposto che livelli elevati di metaboliti attivi 6-tioguaninici ($> 450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ per globulo rosso - GR) siano responsabili dei quadri di immunosoppressione grave. Attualmente l'intervallo ottimale proposto è compreso tra 235 e 450 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ GR (Al Hadithy et al., 2005).

Negli ultimi anni sono state avanzate ipotesi sul potenziale oncogeno di AZA e sull'aumento del rischio di manifestazione di linfomi in pazienti affetti da malattia di Crohn in trattamento con il farmaco immunosoppressore (Elion, 1967; Kandiel et al., 2005). In realtà non esistono al momento evidenze scientifiche che sostengono queste ipotesi, poichè risultati di numerosi studi clinici randomizzati e controllati e di recenti metanalisi non hanno dimostrato alcun rapporto di causalità tra trattamento con AZA e aumento dell'incidenza di neoplasie (Present et al., 1989; Connell et al., 1993; Loftus et al., 2000; Lewis et al., 2001; Dayharsh et al., 2002; Sanderson et al., 2004; Masunaga et al., 2007).

3-Malattie infiammatorie croniche intestinali

La colite ulcerosa e il morbo di Crohn sono indicate sotto la comune denominazione di malattie infiammatorie croniche intestinali o IBD dall'acronimo inglese *inflammatory bowel diseases*. Queste malattie provocano una serie di sintomi gastrointestinali ed extra-intestinali, quali diarrea, emorragia rettale, spasmo addominale, perdita di peso, alterazioni cutanee e oculari e, nei pazienti pediatrici, anche ritardo della crescita e della maturazione sessuale, tali da influire pesantemente sul benessere dei pazienti, sulla loro qualità di vita e sulle loro capacità funzionali (Hanauer e Present, 2003; Ardizzone et al., 2008).

Le IBD sono patologie croniche non fatali a eziologia sconosciuta. A causa del loro decorso, talora refrattario ai più comuni trattamenti, richiedono una terapia con farmaci immunosoppressori in circa il 30-50% dei casi, mentre, in circa il 10% dei casi, si rende necessario il trattamento con i cosiddetti farmaci biologici (infliximab, adalimumab) (Behm e Bickston, 2008).

L'obiettivo principale del trattamento medico delle IBD è quello di indurre e mantenere la remissione della malattia il più a lungo possibile e di prevenirne le recidive. Gli strumenti terapeutici di comune impiego sono farmaci antinfiammatori (steroidi e derivati dell'acido acetilsalicilico) e immunosoppressori. Mesalazina e corticosteroidi rappresentano il presidio terapeutico di prima linea, ma la loro efficacia nel medio-lungo periodo è limitata da problematiche relative alla perdita della risposta terapeutica (per entrambi) e all'insorgenza di effetti avversi (per i corticosteroidi).

Gli immunosoppressori più utilizzati (6-mercaptopurina, azatioprina e metotressato) hanno dimostrato buona efficacia terapeutica soprattutto per quanto riguarda il mantenimento della remissione. Questi farmaci, utilizzati fino a qualche anno fa come farmaci di seconda linea dopo il fallimento della terapia anti-infiammatoria convenzionale, vengono attualmente impiegati fin dall'esordio nelle forme particolarmente gravi di malattia. In particolare, 6MP e AZA rappresentano farmaci di provata efficacia sia nell'induzione che nel mantenimento della remissione nei pazienti dipendenti e/o resistenti alla terapia con glucocorticoidi, così come nella guarigione delle fistole e nella prevenzione di recidive post-chirurgiche in pazienti affetti da malattia di Crohn (Pearson et al., 1995; Ardizzone et al., 1997; Sandborn, 1998).

Numerosi studi hanno evidenziato un'associazione tra concentrazioni intraeritrocitarie del metabolita attivo di AZA, 6-tioguanina (6TG), e risposta clinica in pazienti affetti da malattia di Crohn in fase attiva (Achkar et al., 2004; deBoer et al., 2007). In particolare, nei soggetti con concentrazioni di 6TG superiori a $230-260 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$ è stata riscontrata una remissione di malattia più stabile rispetto a pazienti con concentrazioni intraeritrocitarie minori di metabolita attivo (Cuffari et al., 2004).

4-Malattie infiammatorie croniche reumatologiche

Si ritiene che esista una predisposizione genetica allo sviluppo di queste malattie che determinerebbe una risposta immunitaria abnorme ad alcuni fattori ambientali, con l'innescò di reazioni infiammatorie rivolte verso componenti dell'organismo (autoimmunità) che tendono ad automantenersi.

Il lupus eritematoso sistemico è una malattia autoimmune che si manifesta con i segni di un interessamento multisistemico e un elevato titolo di anticorpi antiDNA in circolo (Zandman-Goddard e Shoenfeld, 2003). I più comuni segni e sintomi del lupus sono il rash cutaneo, dolori articolari, facile affaticabilità, febbre, perdita di capelli, anemia, nefriti, tendiniti, pleuriti, pericarditi, disturbi neurologici o psichiatrici. Le terapie attuali sono mirate all'immunosoppressione e alla riduzione dell'infiammazione (Rahman A e Isenberg DA, 2008). I farmaci più comunemente utilizzati sono: anti-infiammatori non steroidei, antimalarici (cloroquina), corticosteroidi e immunosoppressori (AZA, ciclofosfamide, metotrexate, ciclosporina, micofenolato mofetile) (<http://www.mayoclinic.com/health/lupus/DS0015>).

6MP e AZA sono impiegate nel mantenimento della remissione della malattia, spesso in associazione a metotressato nell'artrite reumatoide (Keysser et al., 1999). Come monoterapia o in associazione a metilprednisolone, AZA trova indicazione nel mantenimento della fase remissiva del lupus, delle nefriti lupiche (Mok, 2006; Grootsholten et al., 2007) e di altre connettiviti sistemiche, quali sclerodermia e vasculiti sistemiche (Paone et al., 2007; Nataraja et al., 2007; Langford CA, 2010).

5-Tiopurina S-metiltransferasi

Tiopurina S-metiltransferasi (S-adenosil-L-metionina tiopurina S-metiltransferasi, TPMT) è un enzima citosolico in grado di promuovere la S-metilazione di composti sulfidrilici aromatici ed eterociclici, compresi i farmaci 6-mercaptopurina, 6-tioguanina e azatioprina (Krynetski et al., 1995; Otterness et al., 1998) (Figura 4).

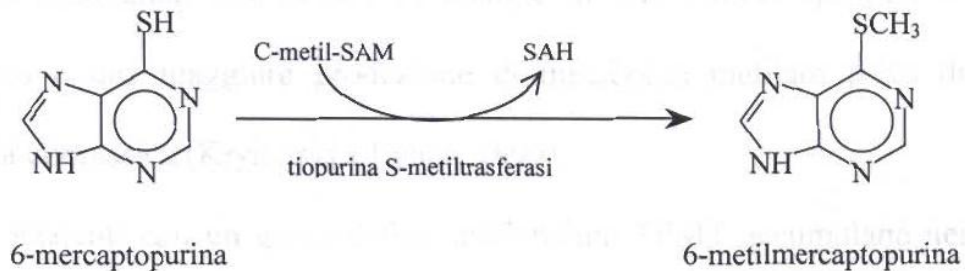


Figura 4: Reazione di biotrasformazione di 6-mercaptopurina in 6-metilmercaptopurina ad opera di tiopurina S-metiltrasferasi. SAM: S-adenosilmetionina, agente donatore di gruppo metilico (Daly, 2003)

L'attività dell'enzima TPMT è essenziale per il metabolismo dei farmaci tioguaninici e ne può influenzare sia l'attività terapeutica che la tossicità (Sahasranaman et al., 2008; Hawwa et al., 2008). L'attività di TPMT nei tessuti è influenzata da polimorfismi genetici, che determinano differenze individuali nella tossicità indotta dalle tiopurine e nella loro efficacia terapeutica. In particolare, i polimorfismi del gene che codifica per TPMT danno luogo a fenotipi con attività normale, intermedia o assente dell'enzima stesso (Otterness et al.,

1998). La tossicità a carico del midollo osseo e gli effetti anti-leucemici della 6-mercaptopurina sono condizionati da differenze individuali nell'accumulo cellulare di nucleotidi 6-tioguaninici (Lennard et al., 1990). L'accumulo cellulare di questi nucleotidi in forma attiva è inversamente proporzionale all'attività enzimatica di TPMT: un'elevata attività enzimatica determina l'attivazione di una minore quantità di farmaco e una maggiore produzione di metabolita metilato privo di attività citotossica (Krynetski e Evans, 1999).

Pazienti con un grave deficit dell'enzima TPMT accumulano nei tessuti concentrazioni molto elevate di metaboliti attivi dei farmaci tioguaninici (McLeod et al., 1993). Questi soggetti sviluppano una grave mielosoppressione se trattati con dosi standard di tiopurine, mentre la stessa dose può non essere sufficiente per trattare pazienti con livelli elevati di attività enzimatica (Otterness et al., 1998).

La natura ereditaria della deficienza di TPMT è stata identificata da Weinshilboun e Sladek nel 1980 durante uno studio sull'attività di questo enzima negli eritrociti (Weinshilboun e Sladek, 1980). Successivamente è stato dimostrato che circa il 90% degli individui possiede un'elevata attività enzimatica di TPMT, il 10% presenta un'attività intermedia, mentre lo 0,3% è caratterizzato da un'attività enzimatica bassa o non rilevabile. È stato inoltre osservato che i livelli di attività enzimatica TPMT negli eritrociti possono risultare aumentati nel corso di terapia cronica con tiopurine: in questi casi si riscontra circa il 25% di incremento alla fine della terapia (Lennard et al., 1990).

5.1-Polimorfismi del gene TPMT

L'enzima TPMT è codificato da un gene di 27 kb localizzato nel cromosoma umano 6p22.3 (Krynetski e Evans, 1999). Esso è composto da dieci esoni, otto dei quali codificano per la proteina matura di 28 kDa (McLeod et al., 2002). L'analisi della regione *promoter* ha rivelato un contenuto di GC del 71% e nessun elemento delle sequenze consenso per TATA box o CCAAT. Altre analisi hanno identificato la presenza di un numero variabile di regioni ripetute (VNTR) che influenzano i livelli di espressione dell'enzima (Coulthard e Hall, 2001). La variabilità dell'attività enzimatica di TPMT dipende da vari SNP (Figura 5).

Attualmente sono stati identificati 29 alleli del gene TPMT (Schaeffeler 2006; Tamm et al., 2008; Garat et al., 2008; Appell et al., 2010), comprendenti tre alleli (TPMT*2, TPMT*3A e TPMT*3C) che giustificano l'80-95% dei casi caratterizzati da attività enzimatica bassa o intermedia (Yates et al., 1997). L'allele normale, che codifica per una proteina dotata di elevata attività enzimatica, è stato denominato TPMT*1 (Otterness et al., 1998). Il primo SNP del gene TPMT a essere associato con una funzionalità alterata dell'enzima e una intolleranza ai farmaci 6-tiopurinici è stata la trasposizione G238C nella regione codificante per la sequenza aminoacidica della proteina (ORF, *open reading frame*) che provoca una sostituzione alanina → prolina (Ala-Pro) nel codone 80. Nel lievito, l'espressione eterologa di cDNA umano contenente questa mutazione ha evidenziato una riduzione dell'attività enzimatica rispetto alla proteina

normale, nonostante l'espressione di livelli normali di mRNA. Questo allele è stato denominato TPMT*2 (Coulthard et al., 1998).

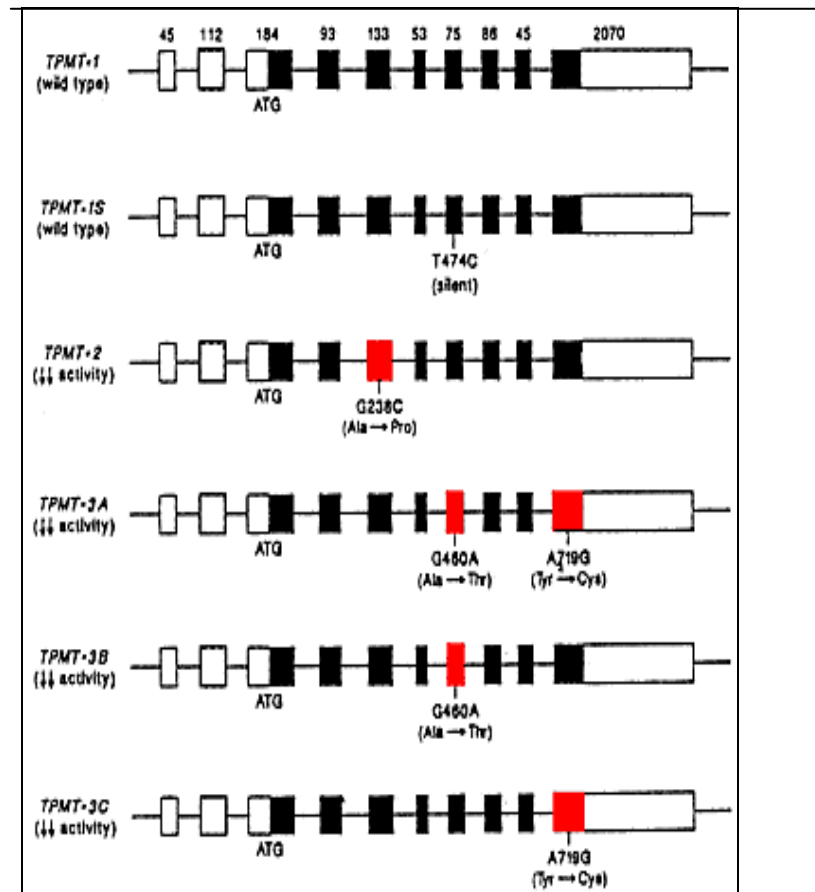


Figura 5. I principali alleli del gene TPMT

Il secondo allele mutante, denominato TPMT*3A, contiene due mutazioni costituite da una transizione nucleotidica (G460A nell'esonone VII e A719G nell'esonone X) nella regione ORF e dà luogo alle sostituzioni aminoacidiche alanina → treonina (Ala → Thr) nel codone 154 e tirosina → cisteina (Tyr → Cys) nel codone 240 (Tai et al., 1996; Loennechen et al., 1998). I pazienti con attività enzimatica intermedia sono risultati eterozigoti per tale allele (Coulthard e Hall, 2001). Sia per TPMT*2 che TPMT*3A è stata evidenziata una riduzione

significativa dell'emivita della proteina codificata (circa 15 minuti) in confronto all'enzima normale (circa 18 ore) (Tai et al., 1997).

L'allele che contiene solo il polimorfismo G460A è stato denominato TPMT*3B, e quello contenente solo il polimorfismo A719G viene indicato come TPMT*3C (Otterness et al., 1998; Loennechen et al., 1998). La costante di Michaelis-Menten (indice di capacità metabolica dell'enzima sul substrato) per la metilazione di 6-mercaptopurina risulta significativamente più elevata per la variante TPMT*3B rispetto alla proteina normale (Loennechen et al., 1998). Altri studi, basati sulla tecnica della *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), riguardanti l'allele TPMT*3C, hanno dimostrato che i pazienti con questo polimorfismo esprimono un enzima completamente inattivo (Yates et al., 1997).

Gli alleli mutanti TPMT*4-29 sono stati identificati durante studi di analisi genotipo-fenotipo, ma i meccanismi molecolari che sono alla base della bassa attività enzimatica delle rispettive proteine varianti non sono stati ancora pienamente valutati (McLeod et al., 2002; Ujiie et al., 2008; Appell et al., 2010).

5.2-Variazioni inter-etniche degli alleli di TPMT

I saggi per la diagnosi molecolare dei polimorfismi di TPMT sono stati messi a punto per lo studio dei seguenti alleli: TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B e TPMT*3C (Yates et al., 1997). Studi condotti su diverse popolazioni (caucasici, africani, afro-americani, cinesi, giapponesi e asiatici) hanno dimostrato che la frequenza e il tipo di alleli mutanti è differente tra le varie etnie (Yates et al.,

1997; Hon et al., 1999). Per esempio, gli Asiatici Sud-Occidentali (indiani e pachistani) (Ameyaw et al., 1999; McLeod et al., 1999) e Orientali (Coreani e Cinesi) (Kim et al., 2010; Liu et al., 2009) mostrano una frequenza più bassa di alleli mutanti che sono tutti di tipo TPMT*3C. Fra gli afro-americani, l'allele TPMT*3C è quello prevalente, ma sono stati identificati anche gli alleli mutanti TPMT*2 e TPMT*3A, probabilmente a causa dell'integrazione dei geni caucasici e afro-americani nella popolazione degli USA (Tabella III) (Hon et al., 1999).

Tabella III: Variazioni etniche negli alleli di TPMT (McLeod, 2002)

Gruppo Etnico	n	wt/wt%	wt/mut%	mut/mut%	TPMT*2%	TPMT*3A%	TPMT*3C%
Caucasici Inglesì	199	89.9	9.6	0.5	0.5	4.5	0.3
Caucasici Francesi	191	85.9	13.6	0.5	0.5	5.7	0.8
Caucasici Americani	-	92.5	7.4	0.14	0.2	3.2	0.2
Afro-Americani	-	90.7	9.2	0.2	0.4	0.8	2.4
Kenioti	101	89.1	10.9	0	0	0	5.4
Popoli del Ghana	217	85.3	14.4	0.5	0	0	7.6
Cinesi	192	95.3	4.7	0	0	0	2.3
Giapponesi	553	97.3	2.4	0.4	0	0	1.5
Tailandesi	75	89	11	0	0	0	5.3
Asiatici Sud- occidentali	99	98	2	0	0	1	0

5.3-Correlazioni genotipo-fenotipo

La relazione genotipo-fenotipo è stata studiata e definita più chiaramente per gli alleli TPMT*2, TPMT*3A e TPMT*3C in pazienti con leucemia e in volontari sani (Tabella IV). In questi individui, la variante TPMT*2 è quella meno comune fra i tre alleli, con una frequenza dello 0,2-0,5% nella popolazione caucasica. In questa popolazione l'allele più comune è TPMT*3A, con una frequenza di 3,2-5,7%, mentre l'allele TPMT*3C mostra una frequenza di 0,2-0,8% (Yates et al., 1997; Coulthard et al., 1998). Pazienti eterozigoti per questi alleli sono caratterizzati tutti da un'attività enzimatica intermedia, mentre i soggetti omozigoti mancano completamente di attività TPMT (Yates et al., 1997). Lo studio di Coulthard (1998) ha dimostrato che su 50 soggetti, tra bambini e adulti affetti da leucemia linfoblastica acuta e omozigoti per il genotipo normale, l'attività enzimatica è pari a 0,25 nU/mg in confronto a 0,1 nU/mg in cinque pazienti eterozigoti per l'allele TPMT*3A. Tuttavia un grado elevato di variabilità nell'attività enzimatica di TPMT è stato osservato sia nei pazienti omozigoti normali che nei soggetti eterozigoti (McLeod et al., 2002).

Tabella IV: Correlazioni genotipo-fenotipo

Genotipo TPMT	Fenotipo TPMT
TPMT*1-WildType	Omozigote TPMT-WT/TPMT-WT Attività enzimatica NORMALE o ELEVATA
TPMT*2-G238C (Ala-80-Pro)	Eterozigote TPMT-WT/TPMT-M Attività enzimatica INTERMEDIA
TPMT*3A-G460A + A719G (Ala- 154-Thr + Tyr-240-Cys)	
TPMT*3B-G460A (Ala- 154-Thr)	
TPMT*3C-A719G (Tyr- 240-Cys)	
	Omozigote TPMT-M/TPMT-M Attività enzimatica SCARSA o ASSENTE

5.4-Incongruenze genotipo-fenotipo

È interessante notare che, in aggiunta a un grado elevato di variabilità nell'attività di TPMT, sia nei soggetti omozigoti normali che in quelli eterozigoti, alcuni individui con genotipo eterozigote esibiscono un'attività enzimatica normale, mentre alcuni soggetti omozigoti normali mostrano un fenotipo caratterizzato da efficienza intermedia (McLeod et al., 2002). Alcune di queste discrepanze potrebbero essere dovute al fatto che gli SNP non sono i soli fattori coinvolti nella regolazione dell'attività enzimatica di TPMT. Infatti anche la presenza di polimorfismi nella regione *promoter*, le interazioni delle tioguanine con altri farmaci e l'ambiente possono contribuire ad aumentare significativamente il grado di variabilità dell'attività enzimatica (McLeod et al., 2002).

In uno studio è stata individuata una ripetizione polimorfica tandem (VNTR) in un'area ricca di nucleotidi GC nella regione a monte del sito di trascrizione del gene TPMT umano. Questa sequenza ripetitiva è costituita da 17-18 paia basi e può dare luogo a 5 alleli derivanti dalla presenza/assenza di 4-5 ripetizioni. Gli alleli VNTR più comuni riscontrati in soggetti caucasici mostrano 4-5 elementi ripetuti (alleli *V4 e *V5) (Spire et al., 1998). Studi successivi hanno dimostrato che le sequenze VNTR possono modulare l'attività di TPMT, anche se in misura minore rispetto agli effetti dei polimorfismi di singoli nucleotidi nella regione ORF (Spire et al., 1999).

Studi condotti da Yan (2000) hanno confermato la capacità delle regioni VNTR di modulare l'attività di TPMT. Sono stati descritti inoltre due alleli VNTR

aggiuntivi: *V3 e *V9. Tuttavia in questi studi non è stata confermata una relazione inversa fra l'attività di TPMT nei globuli rossi e la somma del numero di elementi ripetuti negli alleli VNTR, poiché il genotipo *V4/*V4 presenta un'attività più bassa del genotipo *V4/*V5. Più di recente è stato ipotizzato che un fattore potenzialmente in grado di promuovere una riduzione di attività dell'enzima TPMT sia il numero di elementi dominanti nella struttura interna del VNTR piuttosto che la somma del numero delle ripetizioni (Alves et al., 2001).

6-PARTE SPERIMENTALE

6.1-Razionale e obiettivo dello studio

Alla luce dei dati presenti nella letteratura scientifica, è evidente che la variabilità della risposta ad AZA, per quanto concerne efficacia e tossicità, sia in larga parte attribuibile alle variazioni individuali dell'attività dell'enzima TPMT. Tali variazioni funzionali possono essere predette dallo studio dei polimorfismi genici, che possono influenzare la funzionalità dell'enzima, e dallo studio diretto dell'attività enzimatica, che riflette lo stato funzionale effettivo dell'enzima al momento dell'analisi (Ansari et al., 2002; Campbell et al., 2002; Gearry et al., 2005).

Lo studio oggetto della presente tesi è stato condotto con l'obiettivo di valutare la distribuzione del genotipo (studio dei polimorfismi genici) e del fenotipo (analisi dell'attività enzimatica) dell'enzima TPMT e la capacità di questi determinanti di predire tossicità ed efficacia di AZA in una coorte di pazienti gastroenterologici e reumatologici affetti da patologie infiammatorie croniche.

6.2-Pazienti e metodi

Dal 2005 al 2010 sono stati esaminati i campioni ematici di 223 pazienti, provenienti dalle Unità Operative di Gastroenterologia Universitaria, Gastroenterologia Pediatrica e Reumatologia della AOUP.

Per ogni paziente è stato prelevato un campione di sangue venoso periferico da utilizzare per le analisi genotipiche. In un sottogruppo di pazienti (n=66) è stato inoltre prelevato un campione di sangue venoso periferico per le analisi

fenotipiche. I campioni di sangue sono stati conservati presso l'Unità Operativa Farmacologia Universitaria della AOUP.

I pazienti sono stati preventivamente informati sulle modalità di prelievo dei campioni biologici e sugli scopi dello studio e hanno rilasciato un consenso informato.

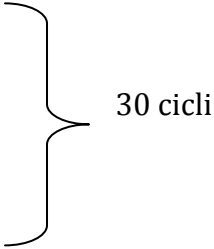
Valutazione clinica. I dati clinici dei pazienti sono stati raccolti dalle cartelle cliniche al momento della analisi geno-fenotipiche e dopo un follow up di 3 anni. Gli eventi avversi sono stati codificati e quantificati secondo i *Common Terminology Criteria for Adverse Events versione 3.0* (CTCAE 3.0). In particolare, sono stati considerati mielotossicità (leucopenia, anemia, trombocitopenia), tossicità epatica e pancreatica, sintomi gastrointestinali, febbre, lesioni cutanee, infezioni gravi non attribuibili alla malattia di base.

I criteri adottati per stabilire l'efficacia del trattamento con AZA sono stati diversi per ogni gruppo di malattia. In particolare, nel sottogruppo dei pazienti reumatologici (n=104) è stato valutato il grado di attività di malattia mediante gli indicatori aspecifici di infiammazione (VES e PCR), emocromo e fattori del complemento C2 e C3. Tali parametri sono stati valutati prima dell'inizio della terapia con AZA e nel follow-up a 3 anni, oppure al momento dell'interruzione del trattamento nei pazienti che hanno sospeso AZA (per motivi quali inefficacia, comparsa di eventi avversi o gravidanza). L'efficacia è stata identificata come remissione stabile della malattia e caratterizzata da normali valori di indici di flogosi, di attivazione complementare, di indici ematologici, oltre che dalla

valutazione clinica del paziente.

Sono stati considerati ai fini dell'analisi statistica la comparsa di tossicità, l'efficacia della terapia (remissione biochimica e clinica stabile) la dose media di AZA, la durata del trattamento, l'età, il sesso, l'assetto genetico e fenotipico di TPMT, la concomitanza di terapia corticosteroidica.

Genotipizzazione. Il campione di sangue utilizzato per l'analisi genetica è stato conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. Il DNA genomico è stato estratto mediante kit commerciale (Nucleo Spin. M&N). Le regioni di DNA di interesse per la ricerca delle mutazioni TPMT (G238C, G460A e A719G) sono state amplificate per mezzo di un *termocycler polymerase chain reaction* (PCR) *express* (HYBAID) sulla base del seguente protocollo:

- denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti
 - denaturazione a 94°C per 1 minuto
 - *annealing* a 55°C per 2 minuti
 - estensione a 72°C per 1 minuto
 - estensione finale a 72°C per 10 minuti
- 
- 30 cicli

La mutazione G238C è stata esaminata mediante *primers* allele-specifici (Figura 6), mentre le mutazioni G460A e A719G (Figure 7-8) sono state analizzate tramite metodica *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) a seguito di digestione enzimatica degli amplificati rispettivamente con *MWOI* e *ACCI*. Questa metodica prevede che gli amplificati delle regioni di DNA contenenti i trascritti di interesse

siano sottoposti ad azione enzimatica, secondo le condizioni illustrate in Tabella V.

Tabella V: Applicazione della metodica di *restriction fragment length polymorphism*

Enzima	Sequenza bersaglio	Condizioni di digestione
<i>ACCI</i>	5'-GT/CTAC-3'	100 minuti a 37°C
<i>MWOI</i>	5'-GCATTAG/TTGC-3'	100 minuti a 60°C

Con questa procedura è possibile individuare la mutazione G460A in seguito a mancata digestione da parte dell'enzima *MWOI* e visualizzazione di un solo frammento di 365bp; in caso di assenza di mutazione, l'enzima taglia la sequenza in due prodotti di digestione di 267bp e 98bp. La mutazione A719G risulta presente in caso di avvenuta digestione da parte dell'enzima *ACCI* che produce due frammenti di 207bp e 86bp. L'assenza della mutazione è indicata invece dalla mancata digestione da parte dell'enzima e la presenza di un solo frammento di 293bp.

La visualizzazione mediante raggi UV dei segmenti di DNA amplificati e digeriti è stata eseguita su gel di agarosio al 2%. La combinazione delle mutazioni osservate ha permesso di identificare gli aplotipi TPMT*2, *3A, *3B e *3C (Figura 9).

Fenotipizzazione. Lisato di emazie. Il campione di sangue utilizzato per l'analisi fenotipica è stato utilizzato entro 24 ore dal prelievo in EDTA mediante centrifugazione (1400 G per 5 minuti), isolamento e lavaggio delle emazie con soluzione fisiologica. Una quota di eritrociti lavati è stata lisata in PBS 0,02 mM a

pH 7,4 e conservata a -80°C fino al momento dell'analisi.

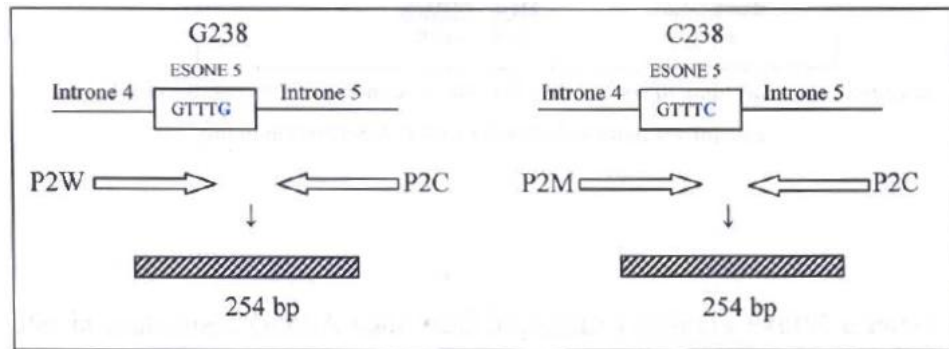


Figura 6. Rappresentazione schematica della reazione di amplificazione relativa al sito di mutazione G238C.

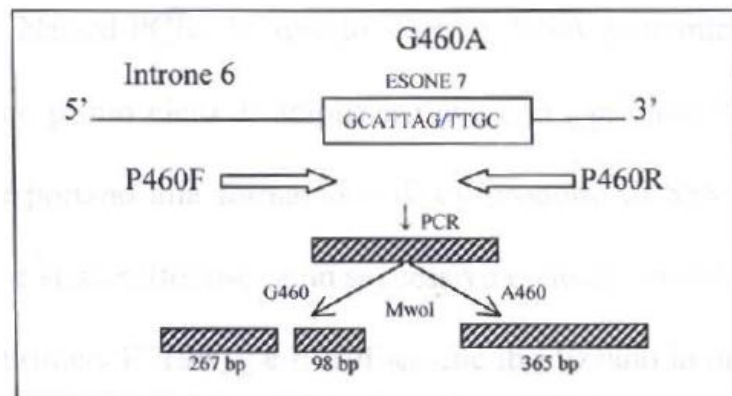


Figura 7. Rappresentazione schematica della reazione di amplificazione relativa al sito di mutazione G460A e relativa digestione enzimatica.

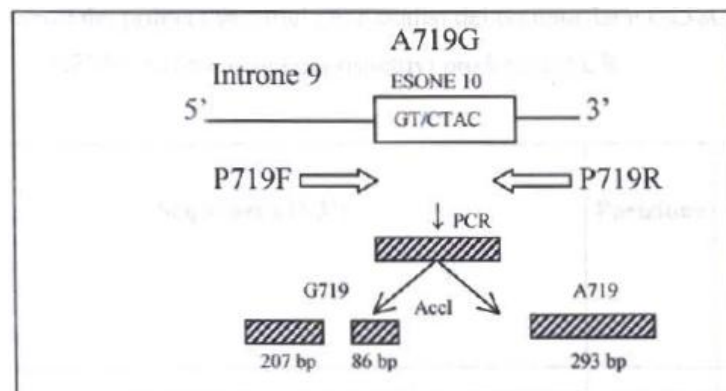


Figura 8. Rappresentazione schematica della reazione di amplificazione relativa al sito di mutazione A719G e relativa digestione enzimatica.

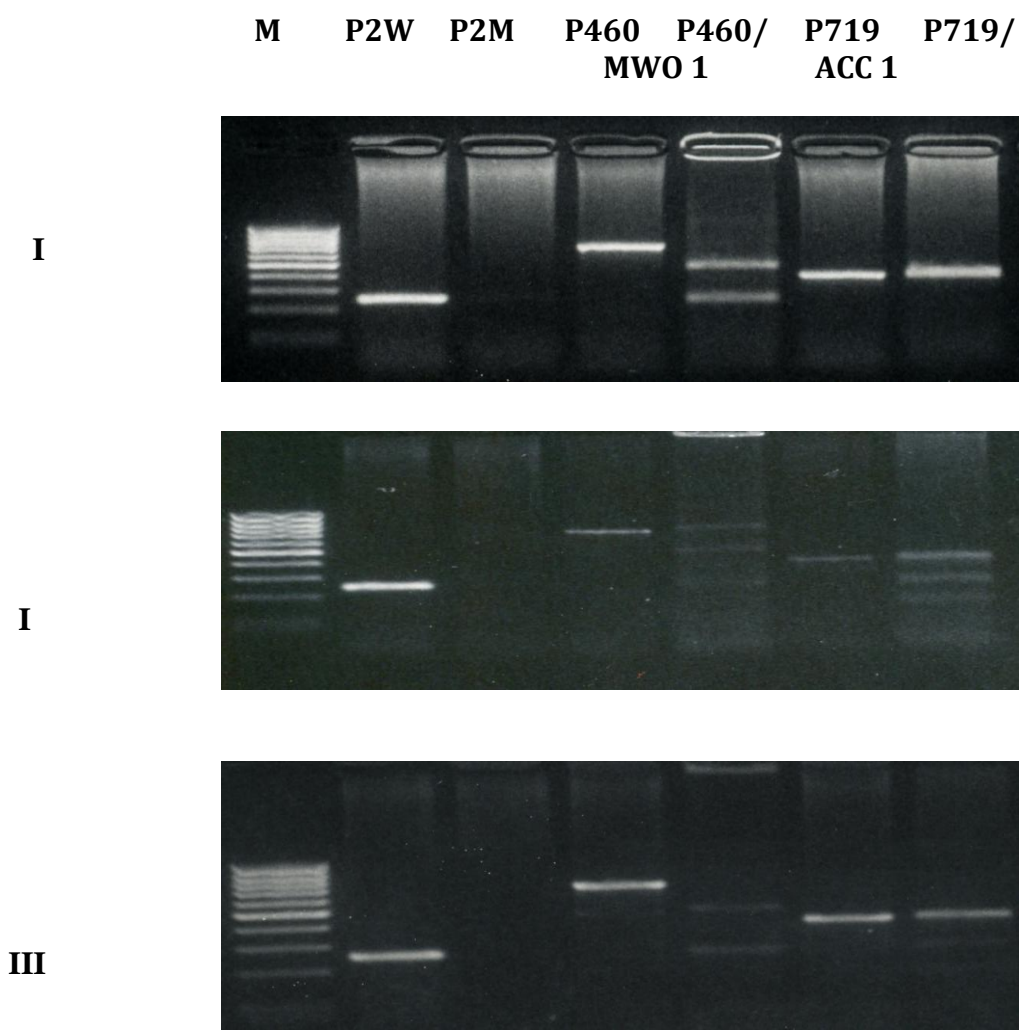


Figura 9. Esempi di prodotti genici amplificati e digeriti: **I:** omozigote WT *1/*1
II:eterozigote *1/*3A **III:**eterozigote *1/*3C

Incubazione e analisi con metodica High Performance Liquid Chromatography (HPLC). L'attività enzimatica dell'enzima TPMT, isolato da emazie, è stata valutata come risultato della conversione da parte di TPMT intraeritrocitaria del substrato 6-tioguanina (6TG) in 6-metil-tioguanina (6MTG), in presenza di un donatore di metili (S-adenosil-L-metionina, SAM). La reazione di incubazione è stata eseguita in presenza di uno standard di 0,44 nmol di 6MTG (80 ng) e uno standard bianco ottenuto aggiungendo soluzione fisiologica alla miscela di incubazione. Il valore del picco ottenuto è stato corretto per la concentrazione di emoglobina eritrocitaria secondo la metodica precedentemente proposta da Ford et al. (2003). L'unità di misura adottata è nmol/6MTG/gHb/h (quantità di 6MTG prodotta per ogni grammo di Hb per unità di tempo).

Analisi statistica. I dati numerici non parametrici sono stati espressi come mediane (intervallo, min-max). Il confronto tra le mediane è stato eseguito per mezzo del test di Mann-Witney. Per lo studio degli eventi avversi in soggetti con o senza mutazioni è stato calcolato l'Odds Ratio (OR) e l'Intervallo di Confidenza al 95% (IC 95). I confronti tra gruppi di dati parametrici a distribuzione normale sono stati eseguiti con il t test di Student per dati non appaiati ed espressi come media±deviazione standard. La significatività statistica è stata considerata per valori di $p < 0,05$.

6.3-Risultati

Distribuzione e prevalenza. Per la descrizione della distribuzione del genotipo TPMT nella popolazione osservata sono stati valutati 223 pazienti. I risultati delle analisi condotte sono riassunti nella Tabella VI. All'interno del campione, sono stati analizzati 66 fenotipi. Sulla base delle frequenze di distribuzione dell'attività TPMT descritte in ampie popolazioni presenti in letteratura (Ford et al., 2003) è stata calcolata la frequenza attesa nella popolazione in studio e identificato un cut-off di 46 nmol 6MTG/gHb/h per differenziare una attività enzimatica ridotta da una normale-elevata. L'attività enzimatica è risultata ridotta nel 10,6 % dei pazienti, normale-elevata nel 89,4 %. Dei 7 pazienti con genotipo mutato per i quali sono stati disponibili dati di fenotipizzazione, 4 (n=4 TPMT *1/*3A) hanno mostrato attività ridotta, mentre 3 (n=3 TPMT *1/*3A; n= 1 TPMT *1/*3C) attività normale.

Tabella VI: Frequenze di distribuzione dei genotipi TPMT nella popolazione in studio.

	n	%
Pazienti genotipizzati	223	-
Omozigoti Wild Type *1/*1	208	93,3
Omozigoti *3C/*3C	1	0,4
Eterozigoti doppi *1/*3A	11	5,0
Eterozigoti doppi *1/*3C	2	0,9
Eterozigoti composti *3A/*3C	1	0,4

Capacità di genotipo e fenotipo di predire efficacia e tollerabilità di AZA. Per la valutazione della capacità predittiva dell'assetto genetico TPMT su efficacia e tollerabilità di AZA, sono stati valutati 104 pazienti (M=32, F=72), con età mediana di 40 anni (17-76). I pazienti erano affetti dalle seguenti patologie: malattia di Crohn (n=15), rettocolite ulcerosa (n=12), connettiviti sistemiche (n=35), vasculiti (n=28), altre malattie autoimmunitarie non altrimenti classificabili (n=14).

La dose mediana di AZA somministrata è stata di 1,4 mg/Kg (0,5-2,5). Lo schema posologico mediano è risultato diverso nei pazienti gastroenterologici rispetto a quelli reumatologici, con dosaggi rispettivamente di 1,75 (0,66-2,5) e 1,27 (0,5-2,0) mg/Kg (**Figura 10**).

Al momento della prima osservazione, il tempo mediano di trattamento era stato di 21 mesi (0,5-150). Non è emersa alcuna differenza significativa nelle due tipologie di pazienti per quanto concerne la durata del trattamento (**Figura 11**).

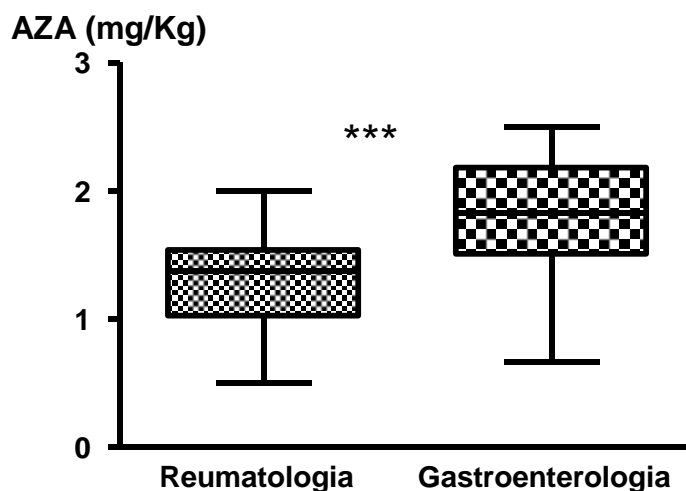


Figura 10. Valori mediani della dose di AZA somministrata ai pazienti reumatologici e gastroenterologici.

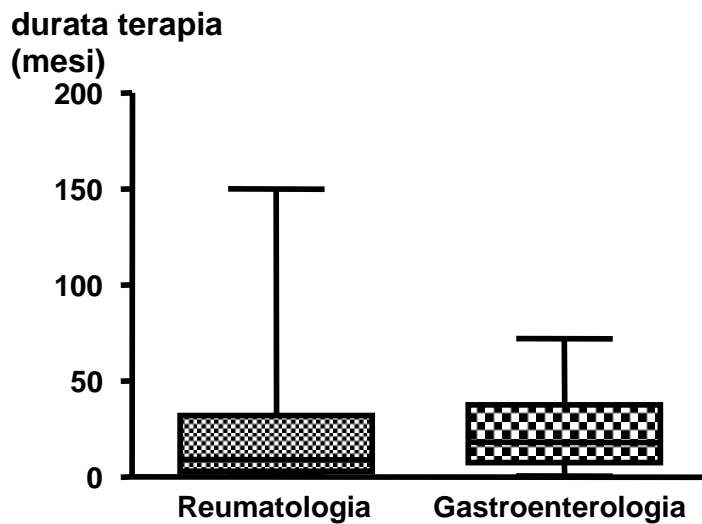


Figura 11. Valori mediani della durata della terapia con AZA in pazienti reumatologici e gastroenterologici.

Quaranta pazienti hanno sviluppato eventi avversi riferibili al trattamento con AZA (38,5%). Il tempo mediano di comparsa di tossicità è stato di 7 mesi (0,5-80) e la dose mediana di AZA somministrata è stata di 1,5 mg/Kg (0,5-2,5). Il tipo e la frequenza degli eventi avversi per le due classi di pazienti (gastroenterologici e reumatologici) sono mostrate nei **grafici I, II, III e IV**.

La frequenza e le caratteristiche temporali di comparsa degli eventi avversi sono mostrati in **Tabella VII**.

Tabella VII: Frequenza e tempo di comparsa degli eventi avversi

<i>Evento avverso</i>	<i>n°</i>	<i>%</i>	<i>Tempo di comparsa (mesi)</i>	
			<i>Mediana (min-max)</i>	
Tossicità midollare	12	11,5	16,5	(1-72)
Infezione opportunistica	7	6,7	18	(5-80)
Tossicità epatica	12	11,5	7	(1-72)
Pancreatite	3	2,9	0,5	(0,5-8)
Sintomi gastrointestinali	9	8,7	3	(1-32)
Sintomi sistemici	8	7,7	1,5	(1-7)

La frequenza del grado di tossicità è risultata distribuita come illustrato in

Tabella VIII.

Tabella VIII: Frequenza e grado di tossicità

<i>Grado</i>	<i>Frequenza (n)</i>	<i>Frequenza %</i>
1	17	42,5
2	13	32,5
3	10	25
4	0	0

Sono stati identificati polimorfismi TPMT in 4 pazienti: 3 eterozigoti TPMT*1/*3A (2,9%) e 1 omozigote *3C/*3C (0,9%). Tre di questi pazienti hanno manifestato tossicità in seguito a trattamento con AZA.

Il trattamento con AZA è stato efficace in 89 (n=87 wild type, n=2 *1/*3A) ed inefficace in 4 pazienti (n=2 wild type, n=1 *1/*3A, n=1 *3C/*3C). Il genotipo wild type è apparso predittivo di successo terapeutico (RR 1,74; CI 0,65-4,65; p<0,04). L'attività enzimatica mediana di TPMT, analizzata in un sottogruppo di 27 pazienti (n=26 wild type, n=1 *1/*3A) è risultata 54.2 nmol 6MTG/gHb/h (intervallo 32,4-106,8). In 3 pazienti wild type e in 1 eterozigote è stata rilevata un'attività enzimatica ridotta. Nei rimanenti soggetti in studio (n=23) sono stati osservati valori di attività TPMT normali. Tra questi pazienti, 9/23 hanno sviluppato tossicità e 18/23 hanno mostrato un buon controllo della malattia. La distribuzione dei valori di attività enzimatica è mostrata in **Figura 13**.

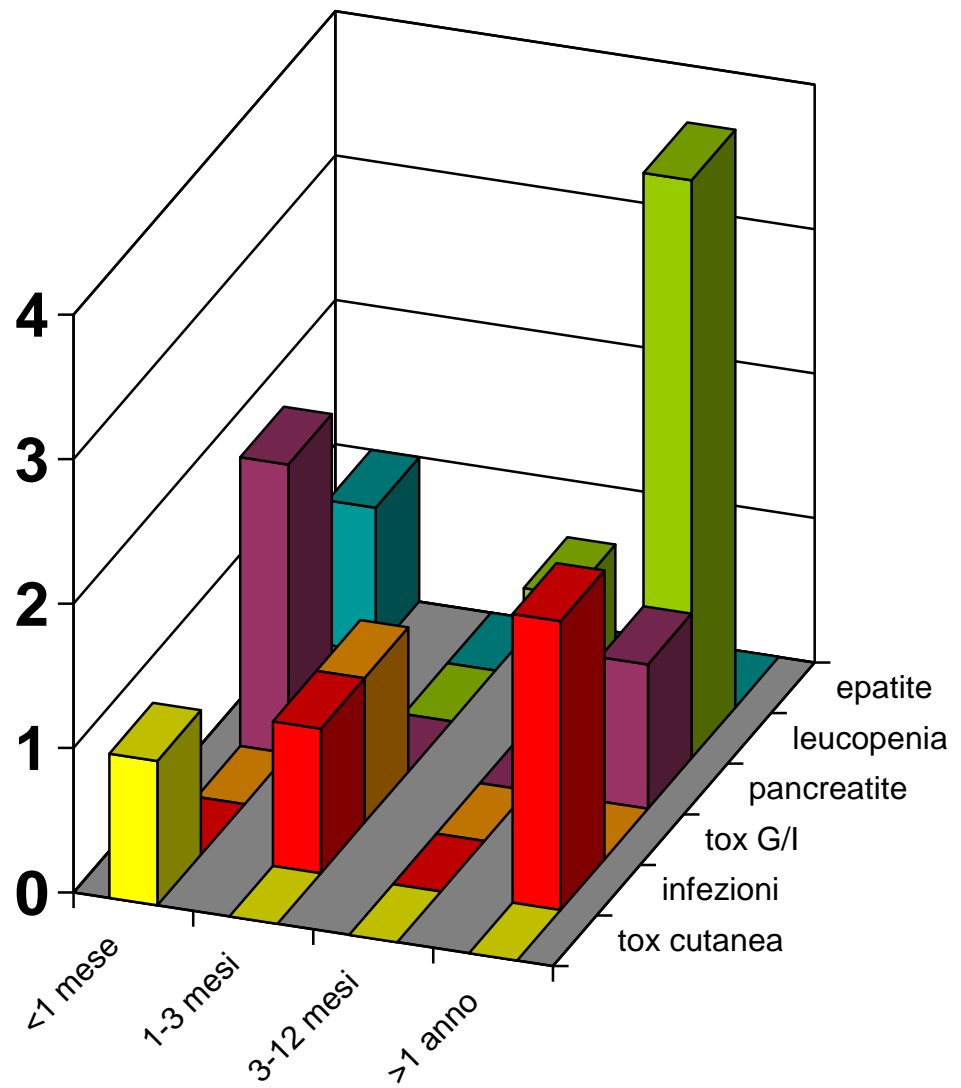


Grafico I. Tempo di comparsa di eventi avversi in pazienti gastroenterologici.

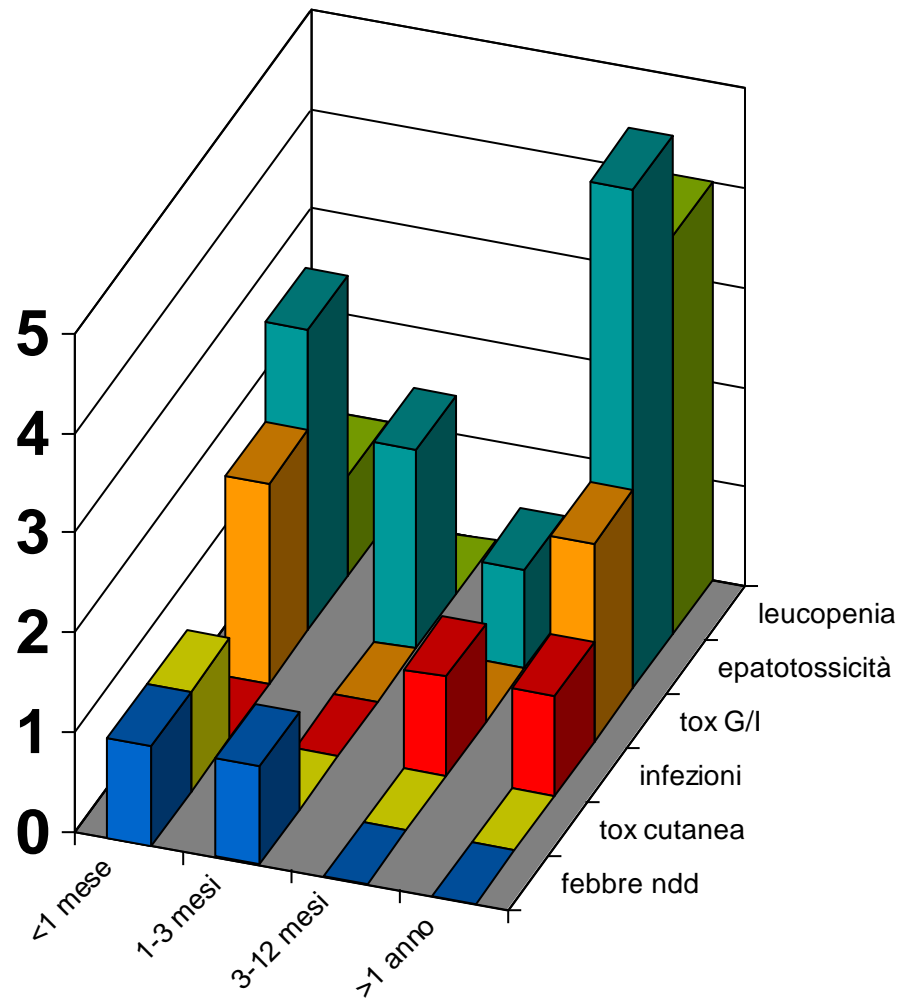


Grafico II. Tempo di comparsa di eventi avversi in pazienti reumatologici.

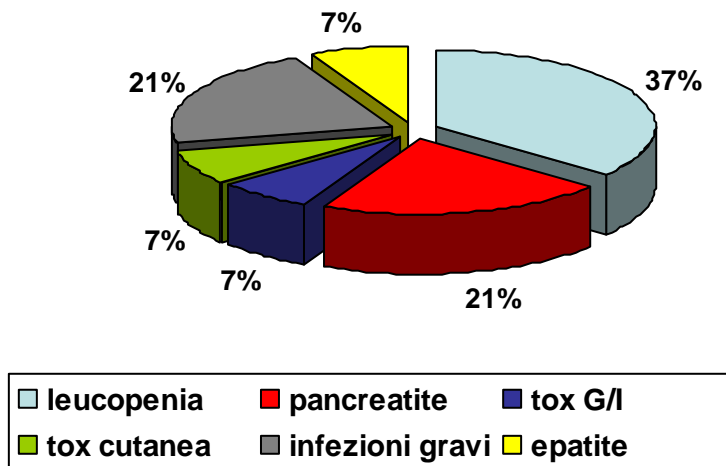


Grafico III. Percentuale di eventi avversi in pazienti gastroenterologici.

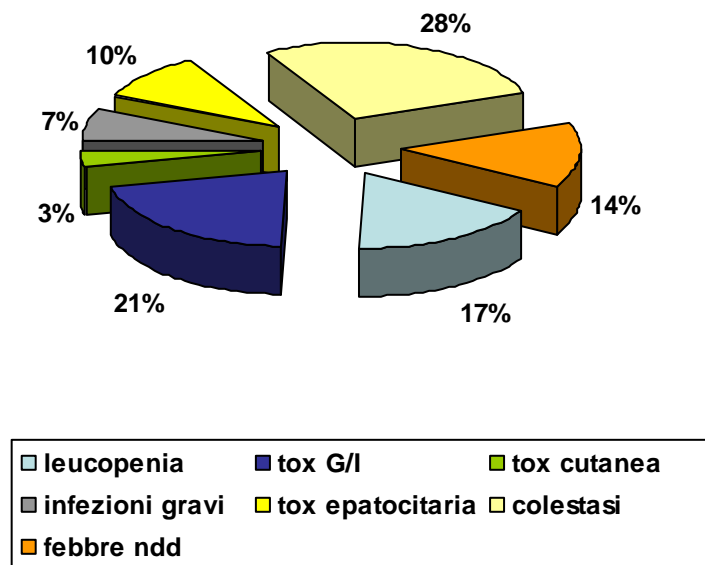


Grafico IV. Percentuale di eventi avversi in pazienti reumatologici.

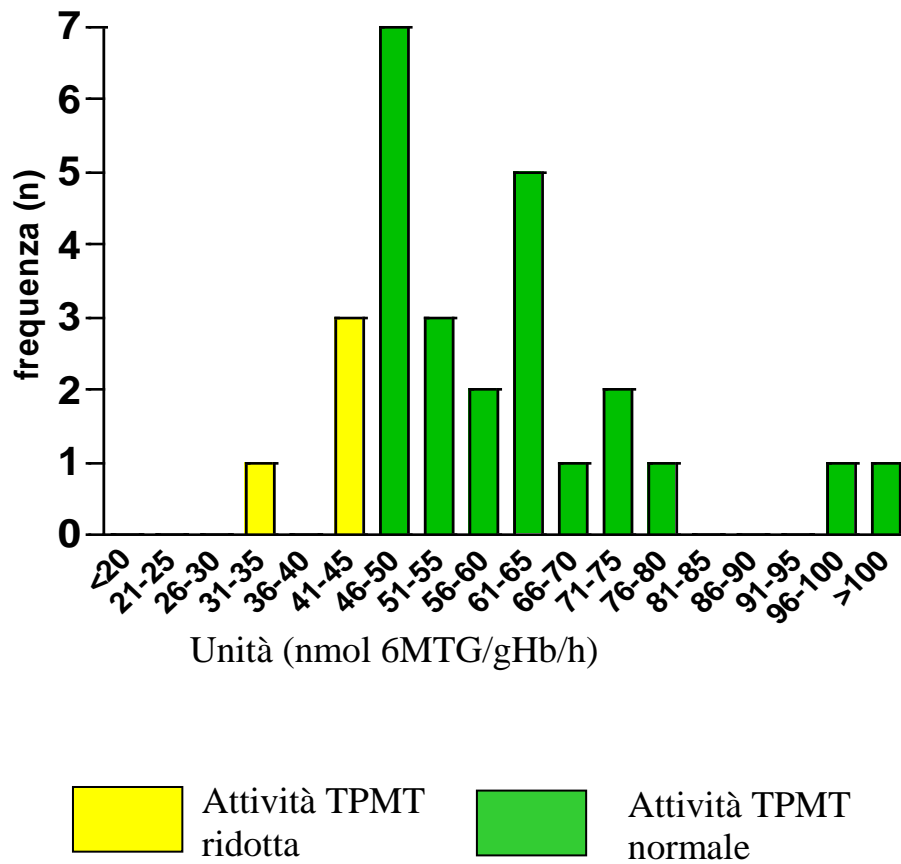


Figura 13. Distribuzione dell'attività enzimatica TPMT

Follow-up. Al follow-up di 3 anni, disponibile per 31 pazienti reumatologici che all'osservazione basale assumevano AZA, si è osservato un solo caso di sospensione del trattamento farmacologico per inefficacia (TPMT WT, attività enzimatica 32,4 nmol 6MTG/gHb/h).

6.4-Discussione

AZA è un farmaco antimetabolita purinico ampiamente usato in reumatologia e gastroenterologia per ridurre l'impiego e/o il dosaggio della terapia steroidea. La ricerca farmacogenetica sui processi metabolici di AZA ha portato all'identificazione di 29 polimorfismi a carico del gene che codifica per l'enzima TPMT, tre dei quali sono associati a ridotti livelli di espressione o a ridotta funzionalità dell'enzima. Tra i Caucasic, lo 0,03% della popolazione è omozigote per la variante allelica associata a una ridotta o nulla attività enzimatica, il 6-11% dei soggetti risulta eterozigote con una parziale riduzione dell'attività enzimatica, mentre soggetti *wild type* mostrano generalmente attività enzimatica normale o elevata. Pazienti omozigoti o eterozigoti per le varianti alleliche possono mostrare un rischio aumentato di sviluppare mielosoppressione grave. La mielosoppressione può, a sua volta, esporre i pazienti al rischio di contrarre infezioni opportunistiche gravi (Clunie e Lennard, 2004; Wang e Weinshilboum, 2006; Ansari et al., 2008).

Nel presente studio è stato analizzato il genotipo TPMT in 104 pazienti e il fenotipo in 27, e sono state identificate varianti alleliche in 4 soggetti. Tre dei pazienti con genotipo mutato hanno manifestato tossicità. Eventi avversi si sono manifestati anche in 37 pazienti *wild type*. In accordo con i risultati pubblicati da

altri Autori (Colombel et al., 2000; Jung et al., 2010; Uchiyama et al., 2009; Hindorf et al., 2010), lo studio del genotipo TPMT da solo non sembra essere uno strumento sensibile e specifico per predire la tossicità indotta da AZA. Infatti i nostri dati suggeriscono che i pazienti con genotipo WT non siano esenti dal rischio di presentare eventi avversi, anche se tale genotipo sembra associato a una maggiore probabilità di successo terapeutico.

In campo gastroenterologico i risultati degli studi condotti su gruppi di pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali riportano dati eterogenei e spesso discordanti (Dong et al., 2010; Kim et al., 2010; Higgs et al., 2010). Alcuni Autori hanno osservato correlazioni significative tra genotipo TPMT ed esiti clinici, in termini sia di efficacia che di tossicità (Gilissen et al., 2004). Altri Autori hanno riscontrato invece scarse correlazioni tra lo stato di TPMT e la comparsa di eventi avversi, suggerendo una scarsa predittività degli studi farmacogenetici nei pazienti in terapia con AZA (Colombel et al., 2000). La quasi totalità degli studi è stata tuttavia condotta su gruppi di pazienti non omogenei, in trattamento polifarmacologico per la malattia di base o per malattie concomitanti, e soprattutto non sono stati svolti studi prospettici su pazienti "naive", ovvero sottoposti alla valutazione dell'attività e del genotipo di TPMT prima di iniziare la terapia con AZA.

Alcuni studi farmacogenetici condotti su pazienti reumatologici in trattamento con AZA hanno fornito risultati discordanti. Nello studio di Black et al. (1998), tra 67 pazienti trattati con AZA per diverse malattie reumatiche, 6 pazienti (9%) sono risultati eterozigoti per TPMT e 5 di questi hanno sospeso l'assunzione

di AZA per la comparsa di tossicità ematologica entro un mese dall'inizio del trattamento, suggerendo una correlazione significativa tra genotipo TPMT e sviluppo di eventi avversi ad AZA.

Okada et al. (2005) hanno analizzato genotipo e fenotipo di TPMT in 68 pazienti giapponesi affetti da lupus. In questo studio 4 pazienti presentavano una variante allelica di TPMT e 2 di questi hanno sviluppato mielotossicità in seguito a terapia con AZA, suggerendo che la genotipizzazione di TPMT sia utile per predire la tossicità da AZA (Black et al., 1998).

Dati differenti sono stati riportati da Naughton et al. (1999). Analizzando i polimorfismi di TPMT in 120 pazienti affetti da lupus, di cui 78 in terapia con AZA, questi Autori hanno osservato che tra 4 pazienti con genotipo mutato, solo un caso ha manifestato tossicità. Più di recente, Jun et al. (2005) hanno riscontrato varianti alleliche di TPMT nel 5% di 342 pazienti coreani affetti da lupus eritematosus sistemico, 94 dei quali in terapia con AZA, senza tuttavia evidenziare alcuna relazione significativa tra genotipo e sviluppo di tossicità.

È evidente che i risultati discordanti disponibili in letteratura possano essere influenzati da numerose variabili in grado di influire sul profilo metabolico di AZA, indipendentemente dal genotipo TPMT.

Probabilmente la variabilità fenotipica, come evidenziato nel presente studio, può rappresentare un indicatore più fedele delle capacità metaboliche di TPMT. Altri determinanti significativi di variabilità potrebbero essere rappresentati dall'interazione con altri farmaci o dall'eventuale presenza di patologie concomitanti. Sono pertanto indispensabili ulteriori studi di tipo prospettico su

gruppi di pazienti omogenei per stabilire la reale capacità predittiva del profilo genotipico e fenotipico di TPMT .

6.5-Conclusioni

I risultati ottenuti nel presente studio consentono di trarre le conclusioni seguenti:

La presenza di un genotipo TPMT non mutato sembra un buon predittore dell'efficacia terapeutica di AZA, anche nel medio-lungo periodo di osservazione.

La presenza di un genotipo TPMT mutato può predire il rischio di eventi avversi in seguito a terapia con AZA, ma il genotipo normale non esclude il rischio di tossicità, sia ovviamente di tipo idiosincrasico, che di tipo dose-dipendente, in particolare nei primi mesi di trattamento.

La valutazione del fenotipo, da sola o in associazione allo studio del genotipo TPMT, permette di predire un buon controllo della malattia da parte di AZA nei pazienti con attività enzimatica normale.

Il riscontro di una ridotta attività enzimatica permette di identificare il rischio di comparsa di tossicità, sia in soggetti con genotipo mutato, per i quali il rischio è comunque già atteso, sia in soggetti WT per i quali il solo studio del genotipo potrebbe non essere sufficientemente affidabile per predire la comparsa di eventi avversi di tipo dose-dipendente.

La valutazione combinata di genotipo e fenotipo TPMT può essere considerata uno strumento utile nella gestione clinica di pazienti in terapia cronica con AZA.

Bibliografia

1. Achkar JP, Stevens T, Easley K, Brzezinski A, Seidner D, Lashner B. "Indicators of clinical response to treatment with six-mercaptopurine or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease". *Inflamm Bowel Dis* 10:339-345;2004
2. Akman-Demir G, Saip S, Siva A. "Behçet's Disease". *Curr Treat Options Neurol* 2011 Mar 18. [Epub ahead of print]
3. Al Hadithy AF, de Boer NK, Derijks LJ, Escher JC, Mulder CJ, Brouwers JR. "Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations". *Dig Liver Dis* 37:282-287;2005
4. Aliabadi AZ, Zuckermann AO, Grimm M. "Immunosuppressive therapy in older cardiac transplant patients". *Drugs Aging* 24:913-932;2007
5. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ. "Influence of tandem repeats in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on the enzymatic activity". *Clin Pharmacol Ther* 70:165-174;2001
6. Ameyaw MM, Collieduguid ESR, Powrie RH, Oforiadjei D, McLeod HL. "Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations". *Hum Mol Genet* 8:367-370;1990
7. Annemans L, Lemkuhl H, Tenderich G, Schulz U, Yang XL, Ricci JF, Hetzer R. "Economic evaluation of everolimus and mycophenolate mofetil versus azathioprine in de novo heart transplantation". *Transplant Proc* 39:3306-3312;2007
8. Ansari A, Arenas M, Greenfield S, Morris D, Lindsay J, Smith M, Lewis C, Marinaki A, Duley J, Sanderson J. "Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease". *Aliment Pharmacol Ther* 28:973-983;2008
9. Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre M, Seed P, Meenan J, Yim A, Sanderson J. "Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease". *Aliment Pharmacol Ther* 16:1743-1750;2002
10. Appell ML, Wennerstrand P, Peterson C, Hertervig E, Mårtensson LG. "Characterization of a novel sequence variant, TPMT*28, in the human thiopurine methyltransferase gene". *Pharmacogenet Genomics* 20:700-707;2010
11. Ardizzone S, Molteni P, Imbesi V, Bollani S, Bianchi-Porro G. "Azathioprine in steroid-resistant and steroid-dependent ulcerative colitis". *J Clin Gastroenterol* 25:330-333;1997
12. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. "Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease". *Dig Liver Dis* 40:253-259;2008

13. Bakr MA, Gheith OA, Ismael AM, Baz ME, Shehab El-Dein AB, Ghoneim MA. "Rescue immunosuppressive therapies in living-related renal allotransplant: a long-term prospective randomized evaluation". *Exp Clin Transplant* 6:48-53;2008
14. Becquemont L, Alfirevic A, Amstutz U, Brauch H, Jacqz-Aigrain E, Laurent-Puig P, Molina MA, Niemi M, Schwab M, Somogyi AA, Thervet E, Maitland-van der Zee AH, van Kuilenburg AB, van Schaik RH, Verstuyft C, Wadelius M, Daly AK. "Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics". *Pharmacogenomics* 12:113-124;2010
15. Behm BW, Bickston SJ. "Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease". *Cochrane Database Syst Rev* 23:CD006893;2008
16. Bell BA, Brockway GN, Shuster JJ, Erdmann G, Sterikoff S, Bostrom B, Camitta BM. "A comparison of red blood cell thiopurine metabolites in children with acute lymphoblastic leukemia who received oral mercaptopurine twice daily or once daily: a Pediatric Oncology Group study (now The Children's Oncology Group)". *Pediatr Blood Cancer* 43:105-109;2008
17. Belloni B, Andres C, Ollert M, Ring J, Mempel M. "Novel immunological approaches in the treatment of atopic eczema". *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8:423-427;2008
18. Bermejo F, Lopez-Sanroman A, Taxonera C, Gisbert JP, Pérez-Calle JL, Vera I, Menchén L, Martín-Arranz MD, Opio V, Carneros JA, Van-Domselaar M, Mendoza JL, Luna M, López P, Calvo M, Algaba A. "Acute pancreatitis in inflammatory bowel disease, with special reference to azathioprine-induced pancreatitis". *Aliment Pharmacol Ther* 28:623-628;2008
19. Bertias G, Boumpas DT. "Update on the management of lupus nephritis: let the treatment fit the patient". *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:464-472;2008
20. Bertias G, Boumpas DT. "Update on the management of lupus nephritis: let the treatment fit the patient". *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:464-472;2008
21. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, Collie-Duguid ESR, Reid DM. "Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine". *Ann Intern Med* 129:716-718;1998
22. Campbell S, Kingstone K, Ghosh S. "Relevance of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease patients maintained on low-dose azathioprine". *Aliment Pharmacol Ther* 16:389-398;2002
23. Carrico CK, Sartorelli AC. "Effects of 6-thioguanine on macromolecular events in regenerating rat liver". *Cancer Res* 37:1868-1875;1997
24. Chabner BA. "In celebration of a Nobel Prize". *J Natl Cancer Inst* 80:1512-1513;1988
25. Chen KR, Carlson JA. "Clinical approach to cutaneous vasculitis". *Am J Clin Dermatol* 9:71-92;2008

26. Chen KR, Carlson JA. "Clinical approach to cutaneous vasculitis". *Am J Clin Dermatol* 9:71-92;2008
27. Claudepierre P, Bagot M. "Psoriatic arthritis". *Ann Dermatol Venereol* 135:263-268;2008
28. Claudepierre P, Bagot M. "Psoriatic arthritis". *Ann Dermatol Venereol* 135; 263-268;2008
29. Clunie GPR, Lennard L. "Relevance of thiopurine methyltransferase status in rheumatology patients receiving azathioprine". *Rheumatology* 43:13-18;2004
30. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soulé JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F. "Genotypic analysis of thiopurine methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy". *Gastroenterology* 118:1025-1030;2000
31. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. "Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience". *Gut* 34:1081-1085;1993
32. Corominas H, Doménech M, Laiz A, Gich I, Geli C, Diaz C, De Cuevillas F, Moreno M, Vázquez G, Baiget M. "Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in rheumatoid arthritis patients?". *Rheumatology* 42:40-45;2003
33. Coulthard SA, Hall AG. "Recent advances in the pharmacogenomics of thiopurine methyltransferase". *Pharmacogenomics J* 1:254-261;2001
34. Coulthard SA, Hogarth L. "The thiopurines: An update". *Invest New Drug* 23:523-532;2005
35. Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. "The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blast from patients with acute leukemia". *Blood* 92:2856-2862;1998
36. Cuffari C, Li DY, Mahoney J, Barnes Y, Bayless TM. "Peripheral blood mononuclear cell DNA 6-thioguanine metabolite levels correlate with decreased interferon-gamma production in patients with Crohn's disease on AZA therapy". *Dig Dis Sci* 49:133-137;2004
37. Cuffari C, Théoret Y, Latour S, Seidman G. "6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity". *Gut* 39:401-406;1996
38. Dayharsh GA, Loftus EV Jr, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Zinsmeister AR, Witzig TE, Macon WR, Burgart LJ. "Epstein-Barr virus-positive lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine". *Gastroenterology* 122:72-77;2002
39. de Boer NK, Derijks LJ, Keizer-Garritsen JJ, Lambooy LH, Ruitenbeek W, Hooymans PM, van Bodegraven AA, de Jong DJ. "Extended thiopurine metabolite assessment

- during 6-thioguanine therapy for immunomodulation in Crohn's disease". *J Clin Pharmacol* 47:187-191;2007
40. de Boer NK, van Bodegraven AA, de Graaf P, van der Hulst RW, Zoetekouw L, van Kuilenburg AB. "Paradoxical elevated thiopurine S-methyltransferase activity after pancytopenia during azathioprine therapy: potential influence of red blood cell age". *Ther Drug Monit* 30:390-393;2008
 41. Del Tacca M. "Introduzione" *Seminario Nazionale "Ruolo della farmacogenetica nello sviluppo e personalizzazione delle terapie farmacologiche"*. Pisa, 5 Ottobre 2002
 42. Dong XW, Zheng Q, Zhu MM, Tong JL, Ran ZH. "Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and thiopurine toxicity in treatment of inflammatory bowel disease". *World J Gastroenterol* 16:3187-3195;2010
 43. Elion GB. "Biochemistry and pharmacology of thiopurine analogs". *Fed Proc* 26:898-904;1967
 44. Fargher EA, Tricker K, Newman W, Elliot R, Roberts SA, Shaffer JL, Bruce I, Payne K. "Current use of pharmacogenetic testing: a national survey of thiopurine methyltransferase testing prior to azathioprine prescription". *J Clin Pharm Ther* 32:187-195;2007
 45. Ferucci ED, Hurlburt KJ, Mayo MJ, Livingston S, Deubner H, Gove J, Plotnik J, McMahon BJ. "Azathioprine metabolite measurements are not useful in following treatment of autoimmune hepatitis in Alaska Native and other non-Caucasian people". *Can J Gastroenterol* 25:21-27;2011
 46. Firooz A, Ghandi N, Hallaji Z, Chams-Davatchi C, Valikhani M, Karbakhsh Davari M. "Role of thiopurine methyltransferase activity in the safety and efficacy of azathioprine in the treatment of pemphigus vulgaris". *Arch Dermatol* 144:1143-1147;2008
 47. Food and Drug Administration. "Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels".
<http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm> Ultimo accesso: 4 aprile 2011
 48. Ford LT, Berg JD. "Determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes using 6-thioguanine as substrate and a non-extraction liquid chromatographic technique". *J Chromatogr B* 798:111-115;2003
 49. Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Lorient MA, Gala JL, Broly F. "Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants". *Biochem Pharmacol* 76:404-415;2008
 50. Garrod AE. "The inborn errors of metabolism". Oxford University Press, London;1968;1909
 51. Geary RB, Barclay ML, Roberts RL, Harraway J, Zhang M, Pike LS, George PM,

- Florkowski CM. "Thiopurine methyltransferase and 6-thioguanine nucleotide measurement: early experience of use in clinical practice". *Inter Med J* 35:580-585;2005
52. Gilissen LP, Derijks LJ, Bos LP, Verhoeven HM, Bus PJ, Hooymans PM, Engels LG. "Some cases demonstrating the clinical usefulness of therapeutic drug monitoring in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients". *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16:705-710;2004
 53. Gisbert JP, Gomollón F. "Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review". *Am J Gastroenterol* 103:1783-1800;2008
 54. Gisbert JP, Niño P, Rodrigo L, Cara C, Guijarro LG. "Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients". *Am J Gastroenterol* 101:2769-2776;2006
 55. Givens RC, Watkins PB. "Pharmacogenetics and clinical gastroenterology". *Gastroenterology* 12:240-248;2003
 56. Grootsholten C, Snoek FJ, Bijl M, van Houwelingen HC, Derksen RH, Berden JH. "Health-related quality of life and treatment burden in patients with proliferative lupus nephritis treated with cyclophosphamide or azathioprine/methylprednisolone in a randomized controlled trial". *J Rheumatol* 34:1699-1707;2007
 57. Hanauer SB, Present DH. "The state of the art in the management of inflammatory bowel disease". *Rev Gastroenterol Disorders* 3:81-92;2003
 58. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Vandenbroeck K, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, Collins J, Rodgers C, McElnay JC. "Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine". *Br J Clin Pharmacol* 66:517-528;2008
 59. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. "Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications?". *Pharmacogenomics* 11:177-188;2010
 60. Hindorf U, Jahed K, Bergquist A, Verbaan H, Prytz H, Wallerstedt S, Werner M, Olsson R, Björnsson E, Peterson C, Almer SH. "Characterization and utility of thiopurine methyltransferase and thiopurine metabolite measurements in autoimmune hepatitis". *J Hepatol* 52:106-111;2010
 61. Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Soderkvist P, Strom M, Hjortswang H, Pousette A, Almer S. "Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease". *Gut* 55:1423-1431;2006
 62. Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. "Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-American". *Hum Mol Genet* 8:371-376;1999
 63. Huang SM, Temple R. "Is this the drug or dose for you? Impact and consideration of

- ethnic factors in global drug development, regulatory review, and clinical practice". *Clin Pharmacol Ther* 84:287-294;2008
64. Juillerat P, Mottet C, Pittet V, Froehlich F, Felley C, Gonvers JJ, Vader JP, Michetti P. "Extraintestinal manifestations of Crohn's disease". *Digestion* 76:141-148;2007
 65. Juillerat P, Mottet C, Pittet V, Froehlich F, Felley C, Gonvers JJ, Vader JP, Michetti P. "Extraintestinal manifestations of Crohn's disease". *Digestion* 76:141-148;2007
 66. Jun JB, Cho DY, Kang C, Bae SC. "Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and the relationship between the mutant alleles and the adverse effects in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine". *Clin Exp Rheumatol* 23:873-876;2005
 67. Jung YS, Cheon JH, Park JJ, Moon CM, Kim ES, Lee JH, Kim SW, Kim JH, Hong SP, Kim TI, Kim WH. "Correlation of genotypes for thiopurine methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase with long-term clinical outcomes in Korean patients with inflammatory bowel diseases during treatment with thiopurine drugs". *J Hum Genet* 55:121-123;2010
 68. Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Brensinger C, Lewis JD. "Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine". *Gut* 54:1121-1125;2005
 69. Karran P, Attard N. "Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer". *Nat Rev Cancer* 8:24-36;2008
 70. Kaufman I, Schwartz D, Caspi D, Paran D. "Sjögren's syndrome - not just Sicca: renal involvement in Sjögren's syndrome". *Scand J Rheumatol* 37:213-218;2008
 71. Kaufman I, Schwartz D, Caspi D, Paran D. "Sjögren's syndrome - not just Sicca: renal involvement in Sjögren's syndrome". *Scand J Rheumatol* 37:213-218;2008
 72. Keysser M, Keysser G, Keysser C. "Long-term application of disease modifying antirheumatic drugs (DMARD). A single-center, observational study of 1681 patients with rheumatoid arthritis (RA)". *Z Rheumatol* 58:267-276;1999
 73. Khodabakhshi S. "Clinical usage of azathioprine and 6-mercaptopurine". *Shiraz E-Medical J* 2;2001
 74. Kim JH, Cheon JH, Hong SS, Eun CS, Byeon JS, Hong SY, Kim BY, Kwon SH, Kim SW, Han DS, Yang SK, Kim WH. "Influences of thiopurine methyltransferase genotype and activity on thiopurine-induced leukopenia in Korean patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study". *J Clin Gastroenterol* 44:242-248;2010
 75. Krynetski EY, Evans WE. "Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm". *Pharmaceut Res* 16:342-349;1999
 76. Kurzawski M, Dziewanowski K, Gawrońska-Szklarz B, Domański L, Drożdżik M.

- "The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism on azathioprine-induced myelotoxicity in renal transplant recipients". *Ther Drug Monit* 27:435-441;2005
77. Langford CA. "Vasculitis". *J Allergy Clin Immunol* 125:216-225;2010
 78. Lee CH, Chen CL, Lin CC, Yang CH, Cheng YF, Wang MC, Eng HL, Liu PP, Chuang FR. "Plasma exchange therapy for thrombotic thrombocytopenic purpura in pediatric patients with liver transplantation". *Transplant Proc* 40:2554-2556;2008
 79. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. "Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia". *Lancet* 336:225-229;1990
 80. Leong RW, Gearry RB, Sparrow MP. "Thiopurine hepatotoxicity in inflammatory bowel disease: the role for adding allopurinol". *Expert Opin Drug Saf* 7:607-616;2008
 81. Levy G, Grazi GL, Sanjuan F, Wu Y, Mühlbacher F, Samuel D, Friman S, Jones R, Cantisani G, Villamil F, Cillo U, Clavien PA, Klintmalm G, Otto G, Pollard S, McCormick PA. "12-month follow-up analysis of a multicenter, randomized, prospective trial in de novo liver transplant recipients (LIS2T) comparing cyclosporine microemulsion (C2 monitoring) and tacrolimus". *Liver Transpl* 12:1464-1472;2006
 82. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, Deren JJ, Vaughn DJ, Strom BL. "Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma". *Gastroenterology* 121:1080-1087;2001
 83. Liu L, Yang L, Zhang YC, Ai XF, Wang JX, Xiao ZJ. "Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes genes in a Han Chinese population". *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 89:2675-2681;2009
 84. Loennechen T, Yates CR, Fessing MY, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. "Isolation of a human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) complementary DNA with a single nucleotide transition A719G (TPMT*3C) and its association with loss of TPMT protein and catalytic activity in humans". *Clin Pharmacol Ther* 64:46-51;1998
 85. Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. "Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival". *Gut* 46:336-343;2000
 86. Maltzman JS and Koretzsky GA. "Azathioprine: old drugs, new actions". *J Clin Invest* 111:1122-1124;2003
 87. Malysheva OA, Wahle M, Wagner U, Pierer M, Arnold S, Häntzschel H, Baerwald CG. "Low-dose prednisolone in rheumatoid arthritis: adverse effects of various disease modifying antirheumatic drugs". *J Rheumatol* 35:979-985;2008
 88. Malysheva OA, Wahle M, Wagner U, Pierer M, Arnold S, Häntzschel H, Baerwald CG. "Low-dose prednisolone in rheumatoid arthritis: adverse effects of various disease

modifying antirheumatic drugs". *J Rheumatol* 35:979-985;2008

89. Markowitz JF. "Therapeutic efficacy and safety of 6-mercaptopurine and azathioprine in patients with Crohn's disease". *Rev Gastroenterol Disorders* 3:23-29;2003
90. Masunaga Y, Ohno K, Ogawa R, Hashiguchi M, Echizen H, Ogata H. "Meta-analysis of risk of malignancy with immunosuppressive drugs in inflammatory bowel disease". *Ann Pharmacother* 41:21-28;2007
91. Mayo Clinic: "Diseases & Conditions: Lupus" Disponibile: <http://www.mayoclinic.com/health/lupus/DS00115>. 2006. Ultimo accesso: 4 aprile 2011
92. Mc Cormack JJ and Johns DG. "Pharmacologic principles of cancer treatment" (Chabner BA ed.) WB Saunders Co., Philadelphia 213-228;1982
93. McLeod HL, Miller DR, Evans WE. "Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient". *Lancet* 341:1151;1993
94. McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J, Indalo A, Ameyaw MM, Powrie RH, Booth L, Collie-Duguid ES. "Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals". *Pharmacogenetics* 9:773-776;1999
95. McLeod HL, Siva C. "The thiopurine S-methyltransferase gene locus: implications for clinical pharmacogenomics". *Pharmacogenomics* 3:89-98;2002
96. McNeil K, Glanville AR, Wahlers T, Knoop C, Speich R, Mamelok RD, Maurer J, Ives J, Corris PA. "Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients". *Transplantation* 81:998-1003;2006
97. Mok CC. "Therapeutic options for resistant lupus nephritis". *Semin Arthritis Rheum* 36:71-81;2006
98. Motulsky AG. "Drug reactions, enzymes and biochemical genetic". *J Am Med Assoc* 165:835-837;1957
99. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. "Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy". *N Engl J Med* 268:1315-1323; 1963
100. Nakamura Y. "Pharmacogenomics and drug toxicity". *N Engl J Med* 359:856-858;2008
101. Nataraja A, Mukhtyar C, Hellmich B, Langford C, Luqmani R. "Outpatient assessment of systemic vasculitis" *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21:713-732;2007
102. Naughton MA, Battaglia E, O'Brien S, Walport MJ, Botto M. "Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine".

103. Nguyen TM, Daubard M, Le Gall C, Larger M, Lachaux A, Boulieu R. "Monitoring of azathioprine metabolites in pediatric patients with autoimmune hepatitis". *Ther Drug Monit* 32:433-437;2010
104. Okada Y, Nakamura K, Kodama T, Ueki K, Tsukada Y, Maezawa A, Tsukamoto N, Nojima Y, Ishizaki T, Horiuchi R, Yamamoto R. "Thiopurine methyltransferase genotype and phenotype status in Japanese patients with systemic lupus erythematosus". *Biol Pharm Bull* 28:2117-2119;2005
105. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, Weinshilboum R. "Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms". *Clin Pharmacol Ther* 62:60-73;1997
106. Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, Weinshilboum RM. "Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity." *J Clin Invest* 101:1036-1044;1998
107. Palmer SM, Baz MA, Sanders L, Miralles AP, Lawrence CM, Rea JB, Zander DS, Edwards LJ, Staples ED, Tapson VF, Davis RD. "Results of a randomized, prospective, multicenter trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in the prevention of acute lung allograft rejection". *Transplantation* 71:1772-1776;2001
108. Pandhi P. "Pharmacogenomic studies: hype & reality." *Indian J Med Res* 123:597-600;2006
109. Paone C, Chiarolanza I, Cuomo G, Ruocco L, Vettori S, Menegozzo M, La Montagna G, Valentini G. "Twelve-month azathioprine as maintenance therapy in early diffuse systemic sclerosis patients treated for 1-year with low dose cyclophosphamide pulse therapy". *Clin Exp Rheumatol* 25:613-616;2007
110. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. "Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis". *Ann Intern Med* 123:132-142;1995
111. Pierik M, Rutgeerts P, Varmeire S. "Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease". *World J Gastroenterol* 12:3657-3667;2006
112. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. "6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity". *Ann Intern Med* 111:641-649;1989
113. Price Evans DA, Manley KA, Mc Kusick VA. "Genetic control of isoniazid metabolism in man". *Br Med J* 2:485-491;1960
114. Rahman A, Isenberg DA. "Systemic lupus erythematosus". *N Engl J Med* 358:929-939;2008
115. Relling MV and Giacomini KM. "Pharmacogenetics" in "Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics", 93-116. Brenton LL, Lazo JS, Parker KL editors, New York: Mc Graw Hill; 2006

116. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. "Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing". *Clin Pharmacol Ther* 89:387-391;2011
117. Roblin X, Oussalah A, Chevaux JB, Sparrow M, Peyrin-Biroulet L. "Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: A worldwide survey of experts". *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Feb 23. [Epub ahead of print]
118. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. "Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines". *Eur J Clin Pharmacol* 64:753-767;2008
119. Sandborn WJ. "Azathioprine: state of the art in inflammatory bowel disease". *Scand J Gastroenterol* 225:92-99;1998
120. Sanderson J, Ansari A, Marinaki T, Duley J. "Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy?". *Ann Clin Biochem* 41:294-302;2004
121. Scheja A, Hesselstrand R, Wildt M, Akesson A. "Relapse of skin thickening after discontinuation or decrease of azathioprine therapy in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis". *Rheumatology* 46:1862-1863;2007
122. Scheja A, Hesselstrand R, Wildt M, Akesson A. "Relapse of skin thickening after discontinuation or decrease of azathioprine therapy in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis". *Rheumatology (Oxford)* 46: 1862-1863; 2007
123. Seidman EG. "Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD". *Rev Gastroenterol Disorders* 3:30-38;2003
124. Shaye OA, Yadegari M, Abreu MT, Poordad F, Simon K, Martin P, Papadakis KA, Ippoliti A, Vasiliauskas E, Tran TT. "Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine (6-MP) and Azathioprine (AZA) in adult IBD patients". *Am J Gastroenterol* 102:2488-2494;2007
125. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Giudice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, Turck D, Noel C, Flipo RM, Pol A, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Broly F. "Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population". *Br J Pharmacol* 125:879-887;1998
126. Swen JJ, Huizinga TW, Gelderblom H, de Vries EGE, Assendelft WJJ, Kirchheimer J, Guchelaar HJ. "Translating pharmacogenomics: challenges on the road to the clinic". *PloS Med* 4:209;2007
127. Tamm R, Oselin K, Kallassalu K, Magi R, Anier K, Remm M, Metspalu A. "Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population". *Clin Chem Lab Med* 46:974-

- 979;2008
128. Tan BB, Lear JT, Gawkrödger DJ, English JS. "Azathioprine in dermatology: a survey of current practice in the U.K.". *Br J Dermatol* 136:351-355;1997
 129. Thervet E, Anglicheau D, Legendre C, Beaune P. "Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation". *Ther Drug Monit* 30:143-150;2008
 130. Thervet E. "Recent advances in the pharmacology of immunosuppressive drugs used in organ transplantation". *Med Sci* 24:961-966;2008
 131. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D. "CD28-dependent Rac 1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+T lymphocytes". *J Clin Invest* 111:1133-1145;2003
 132. Török HP, Göke B, Konrad A. "Pharmacogenetics of Crohn's disease". *Pharmacogenomics* 9:881-893;2008
 133. Uchiyama K, Nakamura M, Kubota T, Yamane T, Fujise K, Tajiri H. "Thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease in whom adverse drug reactions were induced by azathioprine/6-mercaptopurine treatment". *J Gastroenterol* 44:197-203;2009
 134. Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. "Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24)". *Pharmacogenet Genomics* 18:887-893;2008
 135. Vogel F. "Modern probleme der humangenetick". *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 12:52-55;1959
 136. Walters G, Willis NS, Craig JC. "Interventions for renal vasculitis in adults". *Cochrane Database Syst Rev* 16:CD003232;2008
 137. Walters G, Willis NS, Craig JC. "Interventions for renal vasculitis in adults". *Cochrane Database Syst Rev* 16:CD003232; 2008
 138. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. "Genomics and drug response". *N Engl J Med* 364:1144-1153;2011
 139. Weinshilboum RM, Sladek SL. "Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity". *Am J Hum Genet* 32:651-662;1980
 140. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. "Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance". *Ann Intern Med* 126:608-614;1997
 141. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. "Novel approaches to therapy for SLE". *Clin Rev Allergy Immunol* 25:105-112;2003