

# Alelos de tiopurina metiltransferasa en población colombiana

CARLOS A. ISAZA M.\*

Médico, Farmacólogo. Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad Tecnológica de Pereira.

JULIETA HENAO B.\*

Médica, Genetista. Profesora de la Facultad de Medicina de la Universidad Tecnológica de Pereira.

ANA MARÍA LÓPEZ G.\*

Ingeniera Agrónoma con entrenamiento en Genética Molecular.

\*: Grupo de Investigación en Farmacogenética. Laboratorio de Genética Médica de la Facultad de Medicina UTP.

## Resumen

La tiopurina metiltransferasa (TPMT) cataliza la inactivación de los fármacos tiopurinas (mercaptopurina, tioguanina y azatioprina) usados en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, enfermedades autoinmunes y en pacientes con órganos transplantados; no se conocen sustratos endógenos de esta enzima. El polimorfismo del gen TPMT es el principal determinante de las diferencias individuales en cuanto a toxicidad y eficacia terapéutica de estos medicamentos. Las bases moleculares de dicho polimorfismo han sido establecidas para caucásicos, africanos, afro-americanos y asiáticos, pero no han sido estudiadas en amerindios ni mestizos latinoamericanos. En este estudio se identificaron y determinaron en 140 voluntarios colombianos de origen mestizo (edad promedio 27 años, 51.4% hombres) las frecuencias de las cuatro variantes alélicas más comunes del gen: TPMT\*2 (G<sub>238</sub>C), TPMT\*3A (G<sub>460</sub>A and A<sub>719</sub>G), TPMT\*3B (G<sub>460</sub>A) and TPMT\*3C (A<sub>719</sub>G). Se hallaron 10 individuos heterocigotos para el alelo \*3A y uno para el alelo \*2; no se encontraron homocigotos mutados, ni los alelos \*3B y \*3C. De acuerdo con estos resultados, el 92.1% y el 7.9% de la población estudiada corresponden a los fenotipos metiladores altos e intermedios, respectivamente. Esta distribución se asemeja más a la reportada entre caucásicos, donde prevalece el alelo \*3A y se encuentra el \*2, que entre africanos y asiáticos, donde prevalece el alelo \*3C. PALABRAS CLAVES: Farmacogenética, polimorfismo genético, tiopurina metiltransferasa, tiopurinas.

## Introducción

La metilación es una importante vía en el metabolismo de moléculas endógenas (proteínas, fosfolípidos, RNA, DNA, hormonas, neurotransmisores) y de sustancias exógenas, como medicamentos. La tiopurina metiltransferasa es una de las más de 100 enzimas metiltransferasas identificadas hasta ahora, utiliza S-adenosyl-L-metionina (SAM) como donador de grupos metilo (1) y cataliza la S-metilación de los fármacos del grupo de las tiopurinas (6-mercaptopurina, 6-tioguanina y azatioprina), ampliamente usados en el tratamiento de algunas leucemias, enfermedades autoinmunes de curso severo y para prevenir el rechazo de órganos transplantados (2-5). No se conocen sustratos endógenos de esta enzima ni su rol biológico (6).

La 6-mercaptopurina (MP) y la 6-tioguanina (TG) son análogos de las purinas naturales hipoxantina y guanina, en las cuales el grupo ceto del carbono 6 del anillo de purina es reemplazado por un átomo de azufre; la azatioprina (AZA) es convertida en MP *in vivo*. Estos fármacos son transformados por la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) en sus respectivos nucleósidos, y posteriores reacciones catalizadas por fosfoquinasas dan los metabolitos activos, denominados colectivamente tioguanina nucleótidos (TGN) (7). La incorporación de TGN en el DNA se cree que inicia la muerte celular, probablemente por alteración de una vía de reparación del genoma (8).

La eficacia y la toxicidad de las tiopurinas se relacionan con las concentraciones de los nucleótidos de tioguanina (TGN). La xantina oxidasa y la TPMT son enzimas detoxificantes que compiten con la HGPRT para reducir los niveles intracelulares de TGN. La xantina oxidasa se encuentra en cantidades relativamente grandes en el hígado y su actividad no parece variar mucho entre individuos, en tanto que la TPMT tiene actividad variable por ser genéticamente muy polimórfica (1,9).

Como resultado de numerosos estudios poblacionales se ha demostrado que la actividad de la TPMT sigue un patrón de distribución trimodal, con niveles de actividad altos, intermedios y bajos. El polimorfismo genético de la TPMT se convierte así en el mayor determinante de la variabilidad interindividual en las respuestas tóxicas y terapéuticas a las tiopurinas. Bajos niveles de TPMT resultan en altas concentraciones de nucleótidos de tioguanina, lo que representa un factor de riesgo de toxicidad inducida por tiopurinas, como la mielosupresión (1,8), mientras los individuos con muy alta actividad de TPMT tendrán respuestas terapéuticas reducidas a estos agentes (10).

El gen *TPMT* fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda 6p22.3, tiene aproximadamente 34 kb de longitud y consiste de 10 exones, 8 de los cuales codifican una proteína de 245 aminoácidos con PM de 28 kDa (6,11,12). En este gen se han caracterizado un total de nueve alelos mutantes no funcionales, siendo prevalentes los alelos *TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *TPMT\*3B* y *TPMT\*3C* (tabla 1). Estas variantes alélicas contienen mutaciones puntuales (SNPs: single nucleotide polymorphisms) que provocan sustitución de aminoácidos (\*2, \*3A, \*3B, \*3C, \*5, \*6, \*7), formación de un codón de terminación prematuro (\*3D) o destrucción de un sitio splice (\*4) (6,12-16).

La actividad de TPMT se hereda como rasgo autosómico codominante: los individuos homocigotos nativos (*TPMT\*1*) poseen un fenotipo de alta actividad, los individuos homocigotos mutados pertenecen al fenotipo de baja actividad, y los heterocigotos tienen actividad intermedia de la enzima (6). Por ejemplo, en población caucásica y afroamericana aproximadamente el 90% de los individuos tiene alta actividad TPMT, el 10% intermedia y el 0.3% baja (1,15). Los estudios indican que la degradación rápida de la enzima es el mecanismo primario de pérdida de actividad TPMT con las mutantes G<sub>238</sub>C (*TPMT\*2*), G<sub>460</sub>A (*TPMT\*3B*) y A<sub>719</sub>G (*TPMT\*3C*) (9).

Los alelos *TPMT* también difieren entre grupos étnicos.

Los análisis filogenéticos estiman que la divergencia entre africanos y no-africanos ocurrió hace al menos 100.000 años. De los estudios de evolución de genes se considera que el alelo más común en todas las poblaciones es usualmente el alelo ancestral; otras mutaciones y combinaciones luego dan origen a los otros genotipos. Parece probable entonces que el alelo \*3C (A<sub>719</sub>G) fue la primera mutación *TPMT* en originarse en el humano, ya que ésta es la única mutación encontrada tanto en caucásicos como en africanos y orientales (14). Esta mutación ancestral A<sub>719</sub>G probablemente evolucionó hasta contener una segunda mutación G<sub>460</sub>A, después de la divergencia entre poblaciones africanas y no-africanas, dando origen al alelo \*3A, el cual está presente en caucásicos americanos y europeos (más del 80% del total de alelos mutados) y en poblaciones del suroeste asiático (100%) (13,14,17,18), mientras la variante alélica \*3C es la que predomina entre orientales (chinos y japoneses: 100%) (13,19). Puesto que la mutante \*2 (G<sub>238</sub>A) es casi exclusiva de caucásicos (5-10%), éste puede ser el alelo más reciente de la enzima (10,20). Ya se ha reconocido que genes caucásicos están siendo introducidos en el genoma afro-americano; esta integración de genomas puede ser la fuente del pequeño número de alelos \*3A (17%) y de los \*2 (5-10%) encontrados en afro-americanos (14). No se ha investigado la prevalencia de estas variantes alélicas en amerindios; este estudio proporciona la primera descripción del genotipo *TPMT* en mestizo latinoamericano.

El polimorfismo genético de la TPMT representa uno de los mejores ejemplos de la aplicación clínica de la investigación farmacogenética (12). Las tiopurinas metabolizadas por esta enzima tienen índices terapéuticos relativamente estrechos, a la vez que se emplean para tratar condiciones que ponen en peligro la vida, tales como leucemia linfoblástica aguda, leucemia granulocítica aguda, enfermedades autoinmunes de curso severo, o para evitar el rechazo de órganos transplantados (2-5); por tanto, la respuesta individual en eficacia o toxicidad medicamentosa puede tener profundas consecuencias para el paciente. Los individuos heterocigotos tienen un riesgo incrementado de

Tabla 1. Principales alelos mutados del locus *TPMT* asociados con disminución de la actividad enzimática.

Alelo	Mutación (sustitución)	Efecto en la proteína
TPMT*2	G <sub>238</sub> C en exón 5	Ala <sub>80</sub> Pro
TPMT*3A	G <sub>460</sub> A y A <sub>719</sub> G en exones 7 y 10	Ala <sub>154</sub> Thr y Tyr <sub>240</sub> Cys
TPMT*3B	G <sub>460</sub> A en exón 7	Ala <sub>154</sub> Thr
TPMT*3C	A <sub>719</sub> G en exón 10	Tyr <sub>240</sub> Cys

toxicidad hemática tras la medicación con dosis convencionales de tiopurinas, mientras los mutados homocigotos pueden desarrollar severa mielosupresión que pone en peligro sus vidas (1,6,8,9). Se calcula que los pacientes con deficiencia de TPMT necesitan dosis 10 a 15 veces menores que las convencionales (14). Se ha reportado que los pacientes con leucemia linfoblástica aguda y alta actividad de la enzima TPMT tienen pobre supervivencia a largo plazo, comparados con los que tienen menor actividad TPMT (8). En pacientes con trasplante renal y en terapia con azatioprina se encontró asociación entre alta actividad TPMT y la tasa de rechazos, probablemente causados por una acelerada inactivación del medicamento (4,21). También se ha comunicado un incremento en el riesgo leucemogénico cuando se administra 6-mercaptopurina con otros agentes citotóxicos en pacientes con baja actividad de TPMT (2,22).

Estas relaciones entre la actividad de la enzima TPMT y la eficacia o la toxicidad de las tiopurinas justifican la caracterización genotípica o fenotípica de la TPMT, previa a la iniciación de la terapia con estos agentes. La genotipificación mediante el uso de técnicas PCR, o la medición de la actividad de la enzima TPMT en eritrocitos lisados, constituyen pruebas altamente sensibles y específicas que permiten instaurar terapias individualizadas, optimizando de este modo los beneficios, o minimizando los riesgos de estos medicamentos tan útiles como potencialmente tóxicos (23).

En este estudio nos hemos propuesto la caracterización genotípica de la enzima TPMT en una población colombiana, mediante la identificación y determinación de las frecuencias de los alelos *TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *TPMT\*3B* y *TPMT\*3C*.

## Materiales y métodos

### Participantes

Con base en un estimado de 10% de individuos portadores de mutaciones asociadas con actividad TPMT disminuida, se incluyeron en este estudio 140 individuos colombianos, adultos, de ambos sexos, clínicamente sanos, procedentes de todas las regiones del país y no consanguíneos. De cada voluntario se obtuvo consentimiento informado y el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica de la Facultad de Medicina UTP, de acuerdo con las pautas establecidas por la OMS (24).

### Primers y exones

Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, USA) (tabla 2). Las secuencias de los exones 5, 7 y 10 del gen *TPMT*, donde están localizadas las mutaciones estudiadas, fueron recuperadas de la base de datos GenBank, con los códigos de acceso AFO19366, AFO19367 y AFO19369, respectivamente.

### Extracción del DNA

El DNA genómico fue aislado de leucocitos (sangre anticoagulada con EDTA) con el kit GFX Genomic Blood DNA Purification (Pharmacia Biotech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Determinación del genotipo

En la determinación de las mutaciones  $G_{238}C$  (*TPMT\*2*),  $G_{460}A$  (*TPMT\*3B*) y  $A_{719}G$  (*TPMT\*3C*) se emplearon los métodos de PCR y PCR-RFLP, y los set de primers descritos previamente por Yates *et al* (25).

Para el estudio del alelo  $G_{238}C$  (*TPMT\*2*) se utilizó una técnica PCR alelo-específica (13,25): 200-400 ng del DNA genómico fueron amplificados en el buffer D (Invitrogen, San Diego, USA) con 0.3 uM de cada primer, 10 mM de dNTPs 1 U de *Taq* polimerasa (Amersham Pharmacia). El primer reverse P2C fue usado con el primer forward tipo nativo P2W o con el primer forward tipo mutado P2M (tabla 2), en reacciones específicas para nativo y mutado, respectivamente. Los productos PCR de 254 bp fueron separados y analizados en geles de agarosa al 2.5%.

En la detección de la mutación puntual  $G_{460}A$  (*TPMT\*3B*) se empleó la técnica PCR-RFLP propuesta por Yates *et al* (25). Con 0.3 uM de los primers P460F y P460R y el empleo del buffer J (Invitrogen, San Diego, USA) se amplificó un fragmento PCR de 365 bp que contiene el nucleótido 460. El producto PCR se sometió a digestión con la enzima de restricción *MwoI* (New England Biolabs) por 2 horas a 60°C. Los productos de digestión fueron luego separados en gel de agarosa al 3%. La mutación  $G_{460}A$  destruye el sitio de restricción de modo que la digestión *MwoI* no rompe el fragmento de 365 bp, mientras que en un DNA nativo la digestión *MwoI* da fragmentos de 267 y 98 bp.

El análisis de la mutación  $A_{719}G$  (*TPMT\*3C*) también se hace con la técnica PCR-RFLP de acuerdo con los procedimientos descritos por Yates *et al* (25). En el

Tabla 2. Secuencias de los primers usados en la genotipificación TPMT

Primer	Secuencias	Uso	Ref.
P2W	5'-GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTG-3'	TPMT*2	(13,25)
P2M	5'-GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTC-3'	TPMT*2	(13,25)
P2C	5'-TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC-3'	TPMT*2	(13,25)
P460F	5'-ATA ACA GAG TGG GGA GGC TGC-3'	TPMT*3B	(13,25)
P460R	5'-CTA GAA CCC AGA AAA AGT ATA G-3'	TPMT*3B	(13,25)
P719F	5'-TGT TGG GAT TAC AGG TGT GAG CCA C-3'	TPMT*3C	(13,25)
P719R	5'-CAG GCT TTA GCA TAA TTT TCA ATT CCT C-3'	TPMT*3C	(13,25)

buffer de reacción con 0.3 uM de los primers P719F y P719R, se amplificó un fragmento de 293 bp que contiene el nucleótido 719. Los productos PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *Accl* (New England Biolabs) por 4 horas a 37°C y separados en un gel de agarosa al 3%. El alelo mutado contiene un sitio de restricción *Accl* que produce fragmentos de 207 y 86 bp; el alelo nativo no posee sitio de restricción para la enzima *Accl*.

Para confirmar que las secuencias esperadas eran las que realmente se amplificaron, se hizo secuenciación automatizada usando el kit Thermo sequenasa Dye Terminator en el equipo ALFexpress (Pharmacia Biotech) de muestras de cada uno de los fragmentos amplificados en el proceso de identificación de las mutaciones G<sub>238</sub>C, G<sub>460</sub>A y A<sub>719</sub>G. Tal como ha sido aceptado internacionalmente, si se encontraban las dos mutaciones G<sub>460</sub>A (\*3B) y A<sub>719</sub>G (\*3C) en un mismo individuo, se asignó el alelo \*3A, aunque el mismo resultado genotípico puede estar dado por un individuo heterocigoto \*3B/\*3C (14).

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC100 (MJ Research) con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C (\*2) ó 51°C (\*3B y \*3C) por 2 min, y 72°C por 1 min; la extensión final se llevó a cabo a 72°C por 7 min. Los productos resultantes fueron separados en geles de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

*Caracterización de los alelos TPMT y cálculo de frecuencias*

Las frecuencias alélicas fueron calculadas del número de alelos observados y del número de cromosomas examinados. Los individuos se clasificaron de acuerdo con su genotipo determinado mediante métodos PCR, PCR-RFLP y secuenciación, así: a los homocigotos nativos (TPMT\*1) se les predijo el fenotipo «alto metilador» (high methylator, HM), el

individuo heterocigoto para un alelo TPMT no funcional (\*2, \*3A, \*3B o \*3C) se clasificó como «metilador intermedio» (intermediate methylator, IM), mientras a los homocigotos o heterocigotos compuestos portadores de mutaciones inactivantes se les predijo el fenotipo «metilador deficiente» (deficient methylator, DM).

**Resultados**

Los DNA genómicos de 140 voluntarios colombianos (edad 27+-9 años; hombres 51.4%) no emparentados fueron sometidos a tipificación del gen TPMT. Se investigaron las cuatro mutaciones reportadas con mayor frecuencia hasta ahora (\*2, \*3A, \*3B y \*3C), las cuales están relacionadas con actividad deficiente de la enzima. Entre los 140 individuos genotipificados se encontraron 129 portadores de los dos alelos nativos (genotipo \*1/\*1, 92.1%), que corresponderían al fenotipo alto metilador (HM), y 11 individuos heterocigotos para un alelo no funcional (genotipo \*1/mut, 7.9%), que corresponderían al fenotipo metilador intermedio (IM); no se encontraron sujetos portadores de dos alelos no funcionales (genotipo mut/mut, fenotipo DM).

La variante alélica \*3A fue la más prevalente (10 de los 11 alelos mutados, 91%), seguida por la mutación \*2 (1 de 11, 9%). Los alelos \*3B y \*3C no fueron encontrados en nuestra población. La figura 1 presenta los patrones electroforéticos de los diferentes fragmentos de DNA amplificados.

La tabla 3 muestra la distribución alélica y genotípica de nuestra población y de otras poblaciones del mundo.

**Discusión**

El polimorfismo del gen TPMT tiene importantes consecuencias clínicas que se ponen en evidencia cuando las personas deben emplear medicamentos del grupo de las tiopurinas. Cuando estos agentes son usa-

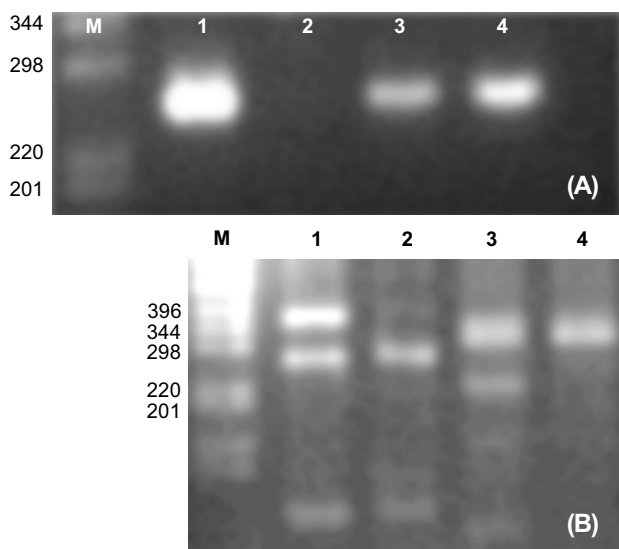


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa para los análisis de las tres mutaciones encontradas. A) Líneas 1-4, PCR para la mutación en el nucleótido 238: las líneas 1 y 2 corresponden a un homocigoto nativo, las líneas 3 y 4 a un heterocigoto. B) Líneas 1 y 2, PCR-RFLP para la mutación en el nucleótido 460: la línea 1 corresponde a un heterocigoto y la línea 2 a un homocigoto nativo. Líneas 3 y 4, PCR-RFLP para la mutación en el nucleótido 719: la línea 3 corresponde a un heterocigoto y la línea 4 a un homocigoto nativo. Línea M: marcador de peso molecular.

dos con los mismos protocolos de tratamiento se pueden observar grandes diferencias inter-individuales en cuanto a toxicidad, eficacia terapéutica y severidad de interacciones medicamentosas (12). El conocimiento de las mutaciones prevalentes en un determinado grupo étnico permite, mediante un sencillo test de caracterización genotípica, prever la respuesta a tales fármacos. Este es un buen ejemplo de cómo la información farmacogenética encuentra utilidad clínica.

Para definir el genotipo *TPMT* en nuestra población

mestiza con ancestros de blanco español, negro africano e indígena americano, se escogieron las cuatro más comunes mutaciones que provocan pérdida de la actividad de la enzima. El total de individuos mutados heterocigotos de este estudio (7.9%) coloca a nuestra población en un lugar intermedio entre caucásicos y africanos, que tienen la mayor frecuencia de mutaciones *TPMT* inactivantes (10-14%), y la población oriental (1.5-5%) (tabla 3).

Del mismo modo, las mutaciones específicas del gen *TPMT* en población colombiana (\*3A y \*2) se asemejan más a las reportadas entre caucásicos europeos y norteamericanos, donde prevalece el alelo \*3A, en contraste con poblaciones africanas (10,20) y orientales (13,19), donde el alelo \*3C da cuenta de todas las mutaciones observadas.

Así como se reconoce la introducción de alelos caucásicos en el genoma afro-americano (14), creemos que la presencia de las mutaciones \*3A y \*2 en la población mestiza de nuestro estudio es consistente con el mismo fenómeno de mezcla genética. Por ejemplo, la mutación \*2, el alelo más reciente de esta enzima polimórfica, es exclusiva de caucásicos o grupos étnicos con ancestro caucásico (10,20).

La ausencia de los alelos \*3B y \*3C entre nosotros no es sorprendente. Por un lado, la mutación \*3B es rara o inexistente en varias regiones geográficas (6); por otro lado, se acepta que en la raza caucásica el alelo \*3C se convirtió en \*3A cuando a la mutación ancestral  $A_{719}G$  se le sumó la  $G_{460}A$ , después de la separación entre africanos y no-africanos (13,17). El hecho de no haber encontrado el genotipo *mut/mut* entre los

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas del gen *TPMT* en mestizos colombianos y otros grupos étnicos.

Población	n	TPMT genotipo (%)			
		wt/wt	wt/mut	mut/mut	
Colombianos (este estudio)	140	92.1	7.9	0.0	
Caucásicos (17,20)	191-199	86-90	9.6-13.5	0.5	
Africanos (10,20)	101-217	85-89	11-14	0.5	
Afro-Americanos (14)	246	90.7	9.3	0.0	
Orientales (13,19)	192	95-98	1.5-5.0	0.0	
Suroeste asiático (13)	99	98	2.0	0.0	
		TPMT alelos (%)			
	n	*1	*2	*3A	*3C
Colombianos (este estudio)	280	96	0.4	3.6	0.0
Caucásicos (14,17,20)	354-398	93-96	0.2-0.5	3.2-5.7	0.2-0.8
Africanos (10,20)	202-434	92-95	0.0	0.0	5.4-7.6
Afro-Americanos (14)	596	95.4	0.4	0.8	2.4
Orientales (13,19)	384	98-99	0.0	0.0	0.8-2.3
Suroeste asiático (13)	198	99	0.0	1.0	0.0

participantes de este estudio puede atribuirse a su baja presencia, por lo que se requiere un tamaño de muestra mayor para definir su frecuencia real.

Conviene anotar que en poblaciones no estudiadas previamente, los datos arrojados por estudios de genotipificación deben ser confirmados mediante la determinación del fenotipo, a fin de detectar e investigar las razones de posibles discrepancias genotipo-fenotipo. Una vez se han caracterizado las mutaciones prevalentes en una población y se ha alcanzado un alto poder predictivo, los test de tipificación farmacogenética hacen valiosos aportes al uso racio-

nal de medicamentos. La implementación de pruebas basadas en el DNA, rápidas, sensibles y costo-efectivas, permite reconocer los pacientes con alto riesgo de toxicidad o reducida respuesta terapéutica, antes de la administración del fármaco (18).

### Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Centro de Investigaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira y por el Departamento de Neurociencias Clínicas del Centro de Investigación Biomédica, La Coruña (España).

### Referencias bibliográficas

.....

- Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: Catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:19-52.
- Thomsen JB, Schroder H, Kristinsson J, Madsen B, Szumlanski C, Weinshilboum R, et al. Possible Carcinogenic Effect of 6-mercaptopurine on Bone Marrow Stem Cells. Relation to Thiopurine Metabolism. *Cancer* 1999 Sep 15; 86(6):1080-6.
- McLeod HL, Coulthard S, Thomas AE, Pritchard SC, King DJ, Richards SM, Eden OB, Hall AG, Gibson BE. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1999 Jun; 105(3):696-700.
- Dervieux T, Medard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, Loirat C, et al. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1999 Dec; 48(6):793-800.
- Faud AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (ed). Harrison's Principles of Internal Medicine; 14 ed; McGraw-Hill, NY, 1998.
- Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 2000; 61:136-46.
- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Calabresi P. Antineoplastic Agents. In: Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics; 9 ed; McGraw-Hill; 1996.
- Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The Relationship Between Thiopurine Methyltransferase Activity and Genotype in Blast From Patients with Acute Leukemia. *Blood* 1998; 92(8):2856-62.
- Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT\*3A, TPMT\*2): Mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 June; 94:6444-9.
- Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet* 1999 Feb; 8(2):367-70.
- Szumanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996; 15:17-30.
- Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos* 2001 Apr; 29(4):601-5.
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999 Feb; 9(1):37-42.
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 1999 Feb; 8(2):371-6.
- Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res* 1999 Mar; 16(3):342-9.
- 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* 1998 March; 101(5):1036-44.
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, LoGuidice JM, Chevalier D, et al. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 1998 Oct; 125(4):879-87.
- Alves S, Prata MJ, Ferreira F, Amorim A. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: alternative molecular diagnosis and preliminary data from Northern Portugal. *Pharmacogenetics* 1999 Apr; 9(2):257-61.
- Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, Agatsuma Y, Mizugaki M. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat Res* 2000 Mar; 448(1):91-5.
- 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* 1999 Dec; 9(6):773-6.
- Thervet E, Anglicheau D, Toledano N, Houllier AM, Noel LH, Kreis H, Beaune P, et al. Long-term results of TPMT activity Monitoring in azathioprine-treated renal allograft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2001 Jan; 12(1):170-6.
- Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA, et al. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999 Jul; 354(9172):34-9.
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Fazio F, Sergent E, Bernard C, Sabbagh N, Marez D, Lo Guidice JM, D'halluin JC, Broly F. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 1999 Apr; 9(2):189-98.
- International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects, CIOMS, WHO, Geneva, Switzerland, 1993.
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai H-L, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126:608-614.