



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA**

**“ASOCIACION DE LA DEFICIENCIA DE LA ENZIMA TIOPURINA
METILTRANSFERASA (TPMT) A LA TOXICIDAD HEMATOLÓGICA
SECUNDARIA A LA TERAPIA CON AZATIOPRINA DE PACIENTES
REUMÁTICOS ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA DEL
HOSPITAL NACIONAL CAYETANO HEREDIA”**

Autor:

MARÍA LUISA FERNANDA ZALDÍVAR VILLÓN

Asesor temático:

ARMANDO CALVO QUIROZ

LIMA – PERU
2019

2.1 Resumen:

La azatioprina es un inmunosupresor que actúa a través de su efecto antagonista en el metabolismo de las purinas, inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Sin embargo, puede producir importantes efectos adversos. La enzima clave en su metabolismo es la tiopurinametiltransferasa (TPMT), que cataliza la metilación de 6-mercaptopurina (6-MP) a 6-metilmercaptopurina, un metabolito inactivo. Una baja actividad enzimática desviaría preferentemente el metabolismo de 6-MP a una mayor producción de 6-TG, responsables del efecto mielosupresor. Este es un estudio transversal de casos y a realizarse en el Hospital Cayetano Heredia (HCH). El objetivo principal es Determinar la asociación de toxicidad hematológica en pacientes tratados con Azatioprina con la deficiencia de la enzima tiopurinametiltransferasa (TPMT). La información se obtendrá de historias clínicas de pacientes atendidos en el servicio de Inmuno-Reumatología del HCH. Los pacientes firmaran consentimiento informado. Todos los datos serán guardados en una hoja de cálculo de Excel. Se utilizara un intervalo de confianza de 95% y un poder de 80%. El análisis comparativo del nivel de actividad enzimática se realizará mediante T test. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$.

Palabras clave: azatioprina, tiopurinametiltransferasa, toxicidad.

2.2 Introducción:

La azatioprina (AZA) es un agente inmunosupresor que actúa a través de sus efectos como antagonista del metabolismo de las purinas, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Se ha utilizado como un agente inmunosupresor para el tratamiento de una variedad de patologías, que incluyen las enfermedades reumáticas, como la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), la dermatomiositis y la polimiositis, la esclerosis sistémica y la vasculitis sistémica; para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y otras afecciones; y para la prevención del rechazo de trasplante de órganos. (1-9)

Es uno de los pocos inmunosupresores posibles de administrar a gestantes que requieran inmunosupresión.

Sin embargo, existe una variabilidad individual en la efectividad y pueden producir importantes efectos adversos. Esto se debe principalmente a la dosis utilizada y a una susceptibilidad individual. En las dosis utilizadas en pacientes con Enfermedad inflamatoria intestinal (2,0-3,0 mg/kg/día), los efectos adversos se observan en 10 a 20% de los pacientes, los que incluyen mielotoxicidad, molestias gastrointestinales, toxicidad hepática o pancreatitis. Entre estas, la mielotoxicidad es la más importante, la que puede llevar a una leucopenia potencialmente mortal. (10)

La azatioprina (AZA) es el derivado 1-metil-4-nitro-5-imidazolilo de la tioguanina, un antimetabolito mimético de la purina. Se absorbe bien desde el tracto gastrointestinal y tiene una vida media sérica de 0,2 a 0,5 horas, lo que resulta en una vida media biológica de aproximadamente 24 horas. AZA es un profármaco; la acción del glutatión en los glóbulos rojos provoca la formación del principal metabolito 6-mercaptopurina (6-MP). El profármaco AZA está aproximadamente 30 por ciento unido a proteína. El cuarenta y cinco por ciento de la droga se excreta en la orina; el resto se metaboliza a 6-MP, que luego se metaboliza a lo largo de rutas competidoras. (11,12)

La farmacocinética está mediada por varias enzimas, con dos vías principales: una catabólica que inactiva el fármaco, y una vía anabólica de síntesis de nucleótidos de 6 tioguanina (6-TG), los cuales ejercen el efecto farmacológico. La enzima clave en su metabolismo es la tiopurinametiltransferasa (TPMT). La TPMT es una enzima citosólica que cataliza la metilación de 6-mercaptopurina (6-MP) a 6-metilmercaptopurina, un metabolito inactivo. (13-17).

Una baja actividad enzimática desviaría preferentemente el metabolismo de 6-MP a una mayor producción de 6-TG, responsables del efecto inmunosupresor y mielosupresor, mediante el bloqueo de la síntesis de ADN e inducción de apoptosis en células inmunes.

Existe una asociación entre disminución de la actividad de la TPMT y toxicidad medular mediada por 6-TG. (17).

La actividad enzimática de la TPMT (fenotipo) está condicionada por polimorfismos genéticos (genotipo) de nucleótido único (SNP). Sobre 20 diferentes variantes alélicas existen para este gen, localizado en el brazo corto del cromosoma 6. El genotipo wild type de la TPMT (*1) se observa en aproximadamente 90%. Las variantes alélicas mutantes más frecuentes en la población son la *2, *3A *3B y *3C. Estas variantes explican 95% de los casos de actividad enzimática baja o deficiente. (10, 14, 16, 17).

Existen diferencias étnicas en las frecuencias de variantes genéticas para la TPMT. Esto ha sido escasamente estudiado en población latinoamericana mestiza, sin una adecuada descripción del grado de mezcla hispánica y amerindia. (18, 19,20).

En un estudio de 67 pacientes que recibieron AZA, cinco de seis individuos heterocigotos para un alelo mutante (evaluado mediante ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa) interrumpieron el tratamiento dentro del mes de iniciación del fármaco debido a los bajos recuentos de leucocitos. La AZA se administró durante un período significativamente más prolongado a aquellos con alelos de tipo wild en comparación con los pacientes con mutaciones genéticas (39 versus 2 semanas, respectivamente). Por el contrario, no hubo asociación entre los alelos TPMT y la toxicidad de AZA en un estudio de 342 pacientes con lupus eritematoso sistémico en Corea. (21).

En un estudio de 200 adultos sanos donadores de sangre, en Chile, se determinó la actividad de TPMT, el genotipo se determinó por PCR. Setenta y siete mujeres (38.5%) y se estudiaron 123 hombres (61.5%), con una edad promedio de 34.9 años. Dieciocho los sujetos (9%) tenían una actividad enzimática baja, 178 (89%) tenían actividad normal, 4 (2%) tuvo alta actividad y no se identificaron sujetos con genotipo deficiente. El genotipo tipo wild (* 1) se encontró en 184 (92%) individuos y 16 (8%) fueron heterocigotos para las variantes: * 2 (n = 2), * 3A (n = 13) y * 3C (n = 1). No hay sujetos homocigotos para estas variantes fueron identificadas. El genotipo de tipo silvestre tuvo un aumento enzimático actividad (40.8 ± 7.2 nmol / gHb / h) en comparación con el grupo heterocigoto (21.2 ± 3 nmol /gHb / h; $p < 0.001$). Concluyendo en que menos del 10% tuvouna baja actividad enzimática o variantes alélicas en el gen TPMT. (22)

En un estudio realizado en Holanda por Pit J. S. M. Kerstens, MD, se midió la actividad de tres enzimas clave del catabolismo de purinas, la purina nucleósido fosforilasa, 5-nucleotidasa (5NT) y tiopurinametiltransferasa (TPMT). Incluyó a tres pacientes con AR que desarrollaron toxicidad de medula ósea asociada al tratamiento con AZA y a 16 pacientes con AR que no desarrollaron toxicidad de medula ósea durante el tratamiento con AZA, inclusive con una duración de 6 meses. Los tres pacientes que desarrollaron toxicidad

medular presentaron deficiencia de las enzimas 5-nucleotidasa (5NT) y tiopurinametiltransferasa (TPMT). (23)

Otros estudios realizados en Sudamérica se llevaron a cabo en Colombia, Argentina, Bolivia y Brasil. En Colombia, se realizó un estudio que incluyó a 140 voluntarios de esta nacionalidad de raza mestiza para determinar la frecuencia de cuatro variantes alélicas del TPMT, TPMT*2 (G238C), TPMT*3A (G460A and A719G), TPMT*3B (G460A) y TPMT*3C (A719G) usando pruebas de PCR y PCR-RFLP. La variante alélica *3^a se encontró en 10 pacientes y la *2 en uno, todos heterocigotos; tampoco en homocigotos no se encontraron mutaciones genotípicas alélicas de *3B ni *3C. De acuerdo a estos resultados, 92.1% y 7.9% de la población Colombiana corresponde a los genotipos alto e intermedio, respectivamente. Estos resultados muestran que la frecuencia de las mutaciones y la distribución alélica de la TPMT es similar al perfil genético encontrado entre poblaciones Norteamericanas, Europeas caucásicas, en las cuales el alelo *3A es prevalente y el alelo *2A también está presente. (24)

En Argentina, se midió la actividad de la enzima TPMT en 147 sujetos Argentinos saludables usando un método de alto performance de cromatografía. Las pruebas genotípicas para nueve alelos (TPMT*2-*8) se basaron en polimorfismo en el brazo largo a través de PCR y PCR específica para algunos alelos. Se encontró que todos los sujetos tuvieron actividad de TPMT detectada. Doce individuos con baja a intermedia actividad fueron homocigotos para un alelo mutante: nueve fueron TPMT*1/*3A, dos TPMT*1/*2 y uno TPMT*1/*4. Todos los sujetos con actividad normal tuvieron un genotipo wild-type (TPMT*1/*1). En conclusión, las variantes alélicas estuvieron presentes en 8.2% de todos los sujetos, lo cual se correlaciona con otros estudios. La frecuencia de TPMT*3A, TPMT*2 y TPMT*4 fue 3.1%, 0.7% and 0.3%, respectivamente. TPMT*3A fue la más prevalente, similar a los resultados en poblaciones caucásicas. Este estudio es el primer análisis de actividad de la enzima TPMT y la frecuencia alélica en Argentina. (25)

En Bolivia se recolectaron muestras de sangre y se extrajo DNA genómico de 50 Tibetanos y 115 Bolivianos. La frecuencia de variantes alélicas de TPMT (TPMT*1 a TPMT*8) se determinaron usando PCR. La frecuencia alélica para TPMT*1 fue 99% y 93.48% para Tibetano y Bolivianos respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron para TPMT *3A 0 y 6.52%; y para TPMT *3C fue 1 y 0%. No se encontraron *2, 3B, 3D, 4-8 en ambas poblaciones. En conclusión así como en poblaciones caucásicas, TPMT*3^a es la mutación alélica más prevalente en Bolivianos. (26)

En Brasil, se determinó el genotipo de TPMT en 202 sujetos de Brasil seleccionados randomizadamente mediante PCR para detectar las mutaciones alélicas más prevalentes (TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B, TPMT*3C, TPMT*5 y TPMT*6). Las mutaciones alélicas de TPMT fueron encontradas en 9.3% (20 de 204) de sujetos brasileiros. TPMT*2

estuvo presente en 7 sujetos, cinco heterocigotos y dos homocigotos, con una frecuencia alélica de 2.2% la mutación alélica más frecuente fue TPMT*3^a, con una frecuencia de 1.5%. Tanto para TPMT*2 y TPMT*3C los sujetos fueron heterocigotos. (27)

Existe incertidumbre con respecto a los beneficios de las pruebas de rutina para la deficiencia de TPMT antes de comenzar la AZA; tanto el genotipado como los ensayos funcionales para esta enzima están disponibles comercialmente. Aunque algunos médicos realizan rutinariamente pruebas de TPMT antes de iniciar la AZA, otros no realizan tales pruebas, sino que inician la terapia a una dosis baja con una estrecha vigilancia a medida que la dosis se incrementa gradualmente.

Hoy en día, determinar la asociación del déficit de la enzima y su toxicidad hematológica permitirá incluir en el manejo del paciente reumático la evaluación genética de la TPMT previo a la administración de azatioprina, previniendo el desarrollo de toxicidad hematológica. Además en nuestro país no se han realizado estudios acerca del tema y este proyecto podría ayudar a mejorar el tratamiento con menos efectos adversos.

2.3 Objetivo:

- Determinar la asociación de toxicidad hematológica en pacientes tratados con Azatioprina con la deficiencia de la enzima tiopurinametiltransferasa (TPMT).

2.4 Material y método

- **Diseño:** Estudio transversal de casos y controles.

	Con Alteración/deficiencia enzimática	Sin Alteración/deficiencia enzimática
Con toxicidad hematológica	a	b
Sin toxicidad hematológica	c	d

- **Población:** pacientes que recibieron tratamiento con Azatioprina, atendidos en el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Cayetano Heredia.

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años
- Pacientes que han recibido azatioprina como tratamiento inmunosupresor único y han presentado o no toxicidad hematológica.
- Pacientes con diagnóstico de enfermedad sistémica autoinmune: lupus eritematoso sistémico, vasculitis, artritis reumatoide.
- Pacientes que hayan firmado consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de alguna neoplasia, en quimioterapia, VIH.
- Pacientes que usan varios fármacos inmunosupresores.
- Pacientes que no deseen participar en el estudio.

- **Muestra:** pacientes que recibieron tratamiento con Azatioprina, que cumplan los criterios de inclusión, atendidos en el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Cayetano Heredia.

Definición operacional de variables:

Caso: paciente con toxicidad hematológica por azatioprina.

Control: paciente que no presentó toxicidad hematológica luego de la administración de azatioprina.

Definiciones:

Toxicidad hematológica: leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, anemia, pancitopenia.

Toxicidad hematológica por AZA: pacientes que desarrollaron toxicidad hematológica a partir del 7° día en terapia con azatioprina a dosis de al menos 1 mg/kg/día.

Procedimientos y técnicas

La información se obtendrá a partir de las historias clínicas de pacientes atendidos en una consulta regular en el servicio de Inmuno- Reumatología del HNCH. En caso de no llegarse a obtener toda la información durante la consulta, se acudirá al área de archivos del HNCH a completarse la evaluación. La aplicación del instrumento de recolección de datos se realizará teniendo en cuenta la Declaración de Helsinki, que menciona la protección de la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de los participantes en la investigación. Por lo tanto, toda la información que se recolecte de las historias clínicas será de carácter estrictamente confidencial y se utilizará con fines exclusivamente académicos. Asimismo,

el estudio contará con la aprobación de la Oficina de Capacitación, Docencia e Investigación del HCH.

Los pacientes que cumplan los criterios de inclusión serán invitados a participar del estudio y posterior a ello firmar el consentimiento informado durante la consulta en el servicio de Inmuno- Reumatología. En dicha consulta, se recolectará inicialmente datos clínicos y laboratoriales. La dosis mínima de AZA es 1mg/kg/día y la toxicidad hematológica se presenta en los primeros 7 a 14 días de iniciado el tratamiento. Posteriormente, en una cita coordinada con los pacientes acudirán a realizárseles dosaje del nivel de la enzima tiopurinametiltransferasa (TPMT) y/o mutaciones en sus alelos, las más frecuentes son la *2, *3A *3B y *3C mediante la recolección de muestras de sangre. Se dividirá a los pacientes en dos grupos de casos y de controles, cada grupo estará conformado por 10 pacientes. El grupo control: aquellos pacientes que no presentaron toxicidad hematológica durante el tratamiento con Azatioprina y el grupo caso: aquellos pacientes que si presentaron toxicidad hematológica durante el tratamiento con Azatioprina. Los datos recolectados en las fichas serán ingresadas a una hoja de cálculo en Excel para Windows 2016.

Plan de análisis:

Mediante pruebas estadísticas se medirá la asociación de las alteraciones o deficiencias enzimáticas y la toxicidad hematológica. Se utilizara un intervalo de confianza de 95% y un poder de 80%. El análisis comparativo del nivel de actividad enzimática se realizará mediante T test. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$.

2.5 Referencias bibliográficas:

1. Dubinsky MC. Azathioprine, 6-Mercaptopurine in Inflammatory Bowel Disease: Pharmacology, Efficacy, and Safety. *ClinGastroenterolHepatol* 2004; 2: 731-43.
2. Mcleod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus-implication for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2002; 3 (1): 89-98.
3. Ohno K, Masunaga Y, Ogawa R, Hashiguchi M, Ogata H. A systematic review of the clinical effectiveness of azathioprine in patients with ulcerative colitis. *YakugakuzasshiJournal of thePharmaceutical Society of Japan* 2004; 124 (8): 555-60.
4. Pearson DC, May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane DatabaseSystRev* 2000; (2): CD000067.
5. Chang JC, Cohen RD. Medical management of severe ulcerative colitis. *GastroenterolClin N Am* 2004; 33: 235-50.
6. Czaja AJ. Diagnosis and Treatment of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology* 2002; 36 (2): 479-97.

7. Gaffney K, Scott DG. Azathioprine and Cyclophosphamide in the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 824-36.
8. Ioannou Y, Isenberg DA. Current concepts for the management of systemic lupus erythematosus in adults: a therapeutic challenge. *PostgradMed J* 2002; 78: 599-606.
9. Tassaneeyakul W, Srimarthpirom S, Reungjui S, Chansung K, Romphruk A, Tassaneeyakul W. Azathioprine-induced fatal myelosuppression in a renal-transplant recipient who carried heterozygous TPMT*1/*3C. *Transplantation* 2003; 76 (1): 265-6
10. Ho GT, Lees C, Satsangi J. Pharmacogenetics and Inflammatory Bowel disease, progress and prospects. *InflammBowelDisease* 2004; 10: 148-58
11. Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989; 244:41.
12. Huskisson EC. Azathioprine. *Clin Rheum Dis* 1984; 10:325.
13. Remy C. S-Methylation with S-Adenylmethionine Transmethylase and Catabolism in Mammalian tissues. *J BiolChem* 1963; 238 (3): 1078-84.
14. Weinshilboum RM, Sladeck SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocytes thiopurine methyltransferase activity. *Am J HumGenet* 1980; 32: 651-62.
15. Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee Vc, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *PharmacogenetGenomics* 2005; 15: 801-15.
16. Geary RB, Barclay ML. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J GastroenterolHepatol* 2005; 20: 1149-57.
17. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann InternMed* 1997; 126: 608-14.
18. Laróvere LE, Dodelson de Kremer R, Lambooy LHJ, De Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann ClinBiochem* 2003; 40: 388-93.
19. Isaza C, Henao J, López AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *MethodsFindExpClinPharmacol* 2003; 25 (6): 423-9.
20. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann InternMed* 1998; 129:716.
21. 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. *ClinExp Rheumatol* 2005; 23:873.
22. Jorquera A, Solari S. Phenotype and genotype of thiopurine methyltransferase in Chilean individuals. *RevMed Chile* 2012; 140: 889-895.

23. Pit J. S. M. Kerstens, MD. azathioprine-related bone marrow toxicity and low activities of purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *arthritis & rheumatism* Volume 38. Number 1, January 1995;142-145.
24. Isaza C, Henao J, López AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003 Jul-Aug;25(6):423-9.
25. LE Laro vere, R Dodelson de Kremer, LHJ Lambooy, RA De Abreu. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 388–393.
26. Lu F, Shih C, Hsueh C, Chen M, Chang Y, Chang G. Molecular analysis of the thiopurine S-methyltransferase alleles in Bolivians and Tibetans. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (2005) 30, 491–496.
27. WL Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Falca RP, Teixeira-Vidigal PV, De Marco L. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *The Pharmacogenomics Journal* (2003) 3, 178–182.

2.7 Anexos:

CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL EN ESTUDIOS DE CASOS Y CONTROLES	
<i>Cálculo del tamaño muestral mínimo necesario para detectar un odds ratio significativamente diferente de 1</i>	
Frecuencia de exposición entre los casos	0.80
Frecuencia de exposición entre los controles	0.20
Odds ratio a detectar	2.00
Nivel de seguridad	0.95
Potencia	0.80
Número de controles por caso	2
TAMAÑO MUESTRAL MÍNIMO	
Casos	7
Controles	14
<i>Sonia Pértega Díaz Salvador Pita Fernández Unidad de Epidemiología y Bioestadística Complejo Hospitalario "Juan Canalejo"</i>	

https://www.fisterra.com/mbe/investiga/muestra_casos/casos_controles.asp

Muestra calculada:

CASOS: 7

CONTROLES: 14 (dos controles por cada caso)