

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aline Corrêa Ribeiro

Avaliação da associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa

Juiz de Fora

2024

Aline Corrêa Ribeiro

Avaliação da associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para a defesa do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Priscila de Faria Pinto

Coorientadores: Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

Prof.^{ta}. Dr.^a. Pâmela Souza Almeida Silva Gerheim

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ribeiro, Aline Corrêa .

Avaliação da associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa / Aline Corrêa Ribeiro. -- 2024.

123 f.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Coorientadores: Jorge Willian Leandro Nascimento, Pâmela Souza Almeida Silva Gerheim

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Azatioprina. 2. Doença inflamatória intestinal. 3. Farmacogenética. 4. Polimorfismo. 5. TPMT, XO/XDH, ITPA, HPRT. I. Pinto, Priscila de Faria, orient. II. Nascimento, Jorge Willian Leandro, coorient. III. Gerheim, Pâmela Souza Almeida Silva, coorient. IV. Título.

Aline Corrêa Ribeiro

Avaliação da associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 03 de outubro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Priscila de Faria Pinto - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Thiago Vinicius Ávila
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Hussen Machado
SUPREMA - Juiz de Fora

Dra. Carolina dos Santos Fernandes da Silva

UNIPAC - Juiz de Fora

Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos

Universidade Federal de São Paulo

Juiz de Fora, 10/09/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto, Professor(a)**, em 04/10/2024, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Vinicius Avila, Professor(a)**, em 04/10/2024, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, Usuário Externo**, em 04/10/2024, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina dos Santos Fernandes da Silva, Usuário Externo**, em 04/10/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Willian Leandro Nascimento, Chefe de Departamento**, em 07/10/2024, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hussen Machado, Usuário Externo**, em 10/10/2024, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1977732** e o código CRC **60718984**.

RESUMO

Introdução: As tiopurinas, 6-mercaptopurina (6-MP) e azatioprina (AZA), são utilizadas no tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), englobando retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC). Apesar dos benefícios, a eficácia e a segurança das tiopurinas apresentam importante variação interindividual, explicada, pelo menos em parte, por variações genéticas relacionadas à farmacocinética. **Objetivo:** Avaliar a associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à AZA em pacientes com DII. **Materiais e Métodos:** Estudo observacional transversal (2016 a 2023), com coleta de amostras sanguíneas e dados clínicos de pacientes com DII, em tratamento com AZA há pelo menos 3 meses, atendidos pelo Centro de DII do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foram quantificados os níveis intraeritrocitários de 6-metilmercaptopurina (6-MMP) e 6-tioguanina (6-TGN) utilizando Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, acoplado ao detector ultravioleta. Os pacientes foram genotipados para 13 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real nos genes da tiopurina metil transferase (TPMT) (rs1800462, rs1800460 e rs1142345), da inosina trifosfato pirofosfatase (rs9101, rs8362, rs1127354 e rs7270101), da hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HPRT) (rs1468266) e da xantina oxidase (XO) (rs4407290, rs17323225, rs1884725, rs2295475 e rs17011368). Foram aplicados testes estatísticos apropriados considerando o nível de significância de 0,05. **Resultados:** Incluiu-se 151 pacientes com DII (59,6% mulheres), sendo que 30 tiveram intervenções cirúrgicas; 59 complicações da DII ou do tratamento com tiopurinas e 112 estavam em remissão. Desses, 33 pacientes (21,9%) apresentaram pelo menos um evento adverso relacionado à farmacoterapia. Os metabólitos 6-TGN e 6-MMP variaram de 4,5 a 2456,0 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e 25,8 a 97800,0 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos, respectivamente. Pacientes em remissão mostraram maiores concentrações de 6-TGN em comparação àqueles com a doença ativa enquanto pacientes em terapia com AZA apresentaram maiores medianas de 6-MMP quando comparados àqueles associados com alopurinol. As frequências das variantes alélicas para os genes investigados variaram entre 1,3 e 33%. Os pacientes heterozigotos mostraram maiores concentrações de 6-TGN comparados aos homozigotos TPMT*1/*1. Ademais, pacientes carregando o alelo A para o rs1884725 da XO também apresentaram maior concentração medianas de 6-TGN em relação aos pacientes GG. Observou-se que pacientes com pelo menos um alelo variante da HPRT apresentaram valores aumentados de enzimas hepáticas. A leucopenia foi mais frequentemente observada em pacientes com alelos variantes para os genes da TPMT e da XO (rs4407290). Este último associou-se à neutropenia, sendo mais frequente em heterozigotos. As queixas relacionadas à terapia com AZA foram mais frequentes nos pacientes com genótipo TPMT*1/*1. **Conclusão:** este trabalho é pioneiro em avaliar a frequência de distribuição de polimorfismos em genes associados à farmacocinética da AZA em pacientes em Minas Gerais. Os achados apontam para a associação entre os polimorfismos nos genes da TPMT e XO com a concentração de 6-TGN, sendo maior em pacientes carregando o alelo variante. Variações nos genes da TPMT, HPRT e XO também se mostraram associadas a reações adversas, incluindo elevação de enzimas hepáticas, leucopenia e neutropenia. Tais achados podem impactar a prática clínica, contribuindo para a personalização da terapia.

Palavras-Chaves: Azatioprina. Doença inflamatória intestinal. Farmacogenética. Polimorfismo. TPMT. XO/XDH. ITPA. HPRT.

ABSTRACT

Introduction: Thiopurines, 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine (AZA), are used in the treatment of Inflammatory Bowel Diseases (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Despite the benefits, the efficacy and safety of thiopurines show significant interindividual variability, which is at least partly explained by genetic variations related to pharmacokinetics. **Objective:** To evaluate the association between polymorphisms in genes related to the metabolism of thiopurines and the response to AZA in patients with IBD. **Materials and Methods:** Cross-sectional observational study (2016 to 2023), including the collection of blood samples and clinical data from IBD patients, treated with AZA for at least 3 months, attending the IBD Center at the University Hospital (HU) of the Federal University of Juiz de Fora. The intraerythrocytic levels of 6-methylmercaptopurine (6-MMP) and 6-thioguanine (6-TGN) were quantified using High-Performance Liquid Chromatography, coupled with ultraviolet detection. Patients were genotyped for 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction in the genes of thiopurine methyltransferase (TPMT) (rs1800462, rs1800460, and rs1142345), inosine triphosphate pyrophosphatase (rs9101, rs8362, rs1127354, and rs7270101), hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (HPRT) (rs1468266), and xanthine oxidase (XO) (rs4407290, rs17323225, rs1884725, rs2295475 and rs17011368). Appropriate statistical tests were applied considering a significance level of 0.05. **Results:** The study included 151 IBD patients (59.6% women), with 30 having undergone surgical interventions; 59 had complications from IBD or thiopurine treatment, and 112 were in remission. Of these, 33 patients (21.9%) experienced at least one adverse effect related to pharmacotherapy. The metabolites 6-TGN and 6-MMP ranged from 4.5 to 2456.0 pmol/8x10⁸ erythrocytes and 25.8 to 97800.0 pmol/8x10⁸ erythrocytes, respectively. Patients in remission showed higher concentrations of 6-TGN compared to those with active disease, while patients on monotherapy with AZA had higher median levels of 6-MMP compared to those associated with allopurinol. The allele frequencies for the investigated genes ranged from 1.3 to 33%. Heterozygous patients showed higher concentrations of 6-TGN compared to TPMT*1/1 homozygotes. Additionally, patients carrying the A allele for rs1884725 of XO also had higher average concentrations of 6-TGN compared to GG patients. Patients with at least one variant allele of HPRT showed increased liver enzyme values. Leukopenia was more frequently observed in patients with variant alleles for TPMT and XO genes (rs4407290). The latter was associated with neutropenia, being more frequent in heterozygotes. Complaints related to AZA therapy were more frequent in patients with TPMT1/*1 genotype. **Conclusion:** This is a pioneering study in evaluating the frequency of distribution of polymorphisms in genes associated with the pharmacokinetics of AZA in patients in Minas Gerais. The findings indicate an association between polymorphisms in the TPMT and XO genes with 6-TGN concentration, which is higher in patients carrying the variant allele. Variations in TPMT, HPRT and XO genes were also associated with adverse reactions, including elevated liver enzymes, leukopenia and neutropenia. These findings may impact clinical practice, contributing to personalized therapy.

Keywords: Azathioprine. Inflammatory bowel disease. Pharmacogenetics. Polymorphism. TPMT. XO/XDH. ITPA. HPRT.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.....	15
2.1.1 Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn.....	15
2.1.2 Epidemiologia.....	19
2.1.3 Patogênese da DII.....	21
2.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DII	24
2.3 EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS AO TRATAMENTO COM TIOPURINAS....	31
2.4 FARMACOGENÉTICA NO TRATAMENTO DA DII COM AZA.....	35
2.5 MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA AZATIOPRINA.....	40
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 PACIENTES.....	43
4.2 APLICAÇÃO DOS QUESTIONÁRIOS E ANAMNESE DO PACIENTE.....	45
4.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA SANGUÍNEA.....	45
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS.....	46
4.5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA AZATIOPRINA.....	46
4.5.1 Coleta e Preparo das Papas de Hemácias (Matriz/Branco)	47
4.5.2 Coleta e Preparo das Amostras dos Pacientes	47
4.5.3 Tratamento das Amostras (Matriz/Branco e dos Pacientes)	48
4.5.4 Quantificação dos Metabólitos 6-TGN e 6-MMP.....	48
4.6 GENOTIPAGEM DOS PACIENTES.....	49
4.6.1 Extração de DNA.....	50
4.6.2 Genotipagem para os Polimorfismos nos Genes da TPMT, ITPA, XO e HPRT.....	51
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4.8 REVISÃO SISTEMÁTICA.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA.....	54
5.1.1 Fontes de informações e estratégias de busca.....	54
5.1.2 Processo de seleção.....	54

5.1.3 Avaliação de risco de viés.....	54
5.1.4 Seleção e características dos estudos.....	55
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES.....	55
5.2.1 Análises de Amostras de Pacientes.....	57
5.3 PERFIL GENÉTICO DOS PACIENTES TRATADOS COM AZA.....	60
5.3.1 Associação entre os polimorfismos e a terapia com AZA e seus metabólitos.....	63
5.3.2 Associações dos SNPs com Eventos Adversos e Intolerâncias nas terapias com AZA...	67
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO.....	84
8 AGRADECIMENTOS.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
Apêndice A.....	97
Apêndice B.....	98
Apêndice C.....	104
Apêndice D.....	109
Apêndice E.....	116
Anexo A.....	117
Anexo B.....	119
Anexo C.....	120

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1 - Ilustração da localização do processo inflamatório na doença de Crohn e na retocolite ulcerativa.....	16
Figura 2 - Características típicas da doença de Crohn (imagens endoscópicas)	17
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na patogênese da doença inflamatória intestinal.....	21
Figura 4 - Vias metabólicas da Azatioprina.....	29
Figura 5 - Distribuição de frequência trimodal da Tiopurina Metil transferase (TPMT).....	36
Figura 6 - Cromatogramas de um dos pacientes incluído no estudo e da matriz.....	57
Fluxograma 1 - Casuística do estudo.....	44
Fluxograma 2 - Coleta de amostras sanguíneas para a pesquisa.....	46
Fluxograma 3 - Preparo das amostras e quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da Azatioprina.....	49

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Gráfico 1 - Avaliação das concentrações dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP em pacientes com doença em remissão e em atividade tratados com Azatioprina.....	58
Gráfico 2 - Avaliação das concentrações dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP quanto à terapia com Azatioprina ou terapia combinada com Alopurinol.....	59
Gráfico 3 - Concentrações de 6-TGN e 6-MMP conforme polimorfismos genéticos das enzimas ITPA e XO/XDH em pacientes usando AZA.....	63
Gráfico 4 - Concentrações de 6-TGN e 6-MMP conforme polimorfismo genético da TPMT em pacientes usando Azatioprina.....	64
Gráfico 5 - Relação entre a enzima hepática TGO/AST e genótipos da enzima ITPA.....	69
Quadro 1 - Terapia farmacológica na doença inflamatória intestinal.....	27
Quadro 2 - Condições de amplificação por qPCR.....	52
Quadro 3 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes do estudo.....	56
Quadro 4 - Características dos pacientes com DII que participaram do estudo.....	98
Quadro 5 - Dosagens bioquímicas, hematológicas e dos metabólitos da AZA dos pacientes.....	104
Quadro 6 - Características genéticas e farmacológicas dos pacientes com DII.....	109
Quadro 7 - Valores dos metabólitos relacionados à atividade ou remissão da DII.....	58
Quadro 8 - Valores dos metabólitos e dos parâmetros hematológicos relacionados à terapia com Azatioprina em pacientes com DII.....	60
Tabela 1 - Gene, polimorfismo, troca de base nitrogenada, atividade normal enzimática e a influência do polimorfismo na atividade enzimática e na concentração dos metabólitos da AZA.	40
Tabela 2 - Gene, referência do SNP, troca de base nitrogenada, modificação do aminoácido e identificação dos ensaios utilizados.....	51
Tabela 3 - Frequência dos SNPs para os genes da TPMT, ITPA, HPRT e XO/XDH em pacientes com DII tratados com AZA atendidos no Hospital Universitário da UFJF.....	61
Tabela 4 - Associação dos genótipos relacionados ao grupo racial e à atividade da doença	62
Tabela 5 - Parâmetros hematológicos e concentração dos metabólitos relacionados aos SNPs e a terapia farmacológica utilizando AZA.....	66
Tabela 6 - Eventos adversos, complicações da doença e intolerâncias associadas com as terapias medicamentosas e os polimorfismos genéticos.....	68
Tabela 7 - Frequências em diferentes populações do alelo de menor frequências (MAF) para polimorfismos no gene de quatro enzimas relacionadas à metabolização da Azatioprina.....	116

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

6-MeTIMP - 6-metilmonofosfato
6-MMP - metabólito intraeritrocitário 6-metilmercaptapurina
6-MP - 6-mercaptapurina
6-TGDP - 6-tioguanina difosfato
6-TGMP - 6-tioguanina monofosfato
6-TGN - metabólito intraeritrocitário nucleotídeos 6-tioguanina
6-TGTP - 6-tioguanina trifosfato
6-TIMP - 6-tioinosina monofosfato
6-TITP - pirofosfohidrólise do 6-tioinosina trifosfato
6-TU - metabólito inativo 6- ácido tiourico
6-TXMP - 6-tioxantosina monofosfato
AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais
anti-TNF α - anticorpos monoclonais anti-fator de necrose tumoral alfa
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZA - azatioprina
AZA/ALO - terapias combinadas azatioprina/alopurinol
AZA/ALO/BIO - terapias combinadas azatioprina/alopurinol/biológicos
AZA/BIO - terapias combinadas azatioprina/biológicos
CDAI - *Crohn's Disease Activity*
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CLAE-UV - cromatógrafo líquido de alta eficiência
DC - doença de Crohn
DII - doenças inflamatórias intestinais
DNA - ácido desoxirribonucleico
gDNA - DNA genômico
GMP - guanosina monofosfato
GMPS - guanidina 5-monofosfato sintetase
GSH - glutathione redutase
GST - enzimas glutathione S-transferases
GWAS - estudos de associação genômica ampla
HPRT ou HGPRT - enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase
HU - Hospital Universitário
HU/CAS - Centro de Atenção à Saúde do Hospital Universitário
ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1
ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IHB - índice de *Harvey-Bradshaw*

IMP - inosina monofosfato

IMPDH - enzima inosina-5-monofosfato desidrogenase

IPTA - inosina trifosfato pirofosfohidrolase ou inosina trifosfatase

ITW - índice de *Truelove and Witts*

LaFaCE - Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental

LIP - Laboratório Integrado de Pesquisa

MS - Ministério da Saúde

MTF - monitoramento terapêutico de fármacos

NF- κ B - fator nuclear kB

PCR - dosagens da proteína C-reativa

PRPP - fosforibosilpirofosfato

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Rac1 - proteínas Rho GTPases

RBC - contagem total de eritrócitos

RCU - retocolite ulcerativa

RNA - ácido ribonucleico

SAES - Secretaria de Atenção Especializada à Saúde

SAS - Superintendência de Assistência Socioeducativa

SCTIE - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos

SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

tdGTP - trifosfato de desoxitioguanosina

TGO/AST - transaminase glutâmico-oxalacética/transaminases aspartato aminotransferase

TGP/ALT - transaminase glutâmico-pirúvica/alanina aminotransferase

tGTP - trifosfato de tioguanosina

TPMT - enzima tiopurina metil transferase

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular

XO/XDH - enzima xantina oxidase/xantina desidrogenase

1 INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença inflamatória recorrente crônica incurável de etiologia desconhecida, consistindo principalmente de doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU), que pode afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal, associada a manifestações extraintestinais e outras alterações imunológicas (Bangma et al., 2020; Chebli et al., 2007; Crohn et al., 2000; Eltantawy et al., 2023). A apresentação clínica depende da localização da doença e inclui diarreia, dor abdominal, perda de peso, febre, sangramento gastrointestinal, abscessos entre outros. Fissuras ou fistulas perianais, obstrução do cólon e intestino delgado são comuns na DC, enquanto hematoquezia e a presença de muco ou pus são comuns apenas na RCU (Koh et al., 2023; Yeshe et al., 2020).

O comportamento da doença caracteriza-se por períodos de exacerbação alternados com períodos de remissão. A apresentação típica é o envolvimento descontínuo de segmentos do sistema gastrointestinal, podendo levar ao desenvolvimento de complicações, como estenoses, abscessos e fistulas (Ruiz et al., 2020).

A causa da DII é multicausal, entretanto, estudos recentes demonstram que sua prevalência e incidência variam de acordo com os fatores ambientais, hábitos de vida, fatores genéticos e respostas inadequadas do sistema imunológico à microbiota bacteriana intestinal do indivíduo. Desta forma, devido à importância que o sistema imune desempenha nas DII, a terapêutica farmacológica se baseia especialmente na modulação imune (Eltantawy et al., 2023; Koh et al., 2023; Ruiz et al., 2020).

Os fármacos tiopurinas, 6-mercaptopurina (6-MP) e o seu pró-fármaco azatioprina (AZA), continuam sendo os imunomoduladores mais indicados na terapia em conjunto com uso de glicocorticoides, visto que estudos afirmam que essa terapêutica mantém a remissão clínica duradoura para prevenir complicações e sua progressão por alguns anos (Andoh et al., 2021; Bangma et al., 2020; Chen et al., 2020).

Apesar de as tiopurinas serem a primeira linha de escolha no tratamento da DII, tais fármacos estão associados a inúmeros eventos adversos como pancreatite, hepatotoxicidade e mielossupressão, além de apresentar falha terapêutica em cerca de 30 a 40% dos pacientes, ocorrendo normalmente nos primeiros três meses de tratamento (Anandi et al., 2020; Andoh et al., 2021; Chebli et al., 2015).

Estudos fornecem evidências de que os pacientes podem se beneficiar da adição do medicamento alopurinol à terapêutica, promovendo redução na dose de tiopurinas e diminuição do uso de glicocorticoides, melhorando de forma geral, a qualidade de vida destes pacientes (Houwen et al., 2021).

Cabe destacar que a variabilidade interindividual na resposta à terapia com as tiopurinas contribui para as altas taxas de falha terapêutica na DII e possíveis ocorrências de eventos adversos como a mielossupressão, que é um fator dependente da dose, com incidência cumulativa de 7% (Bangma et al., 2020). A maioria dos pacientes com mielossupressão é assintomática, no entanto, infecções oportunistas graves levam 30% dos pacientes a hospitalização, com uma mortalidade estimada de 1% (Anandi et al., 2020; Bangma et al., 2020).

É importante ainda ressaltar que as falhas terapêuticas ao tratamento convencional da DII implicam em sofrimento ao paciente, avanço da morbidade, além de elevado custo para os sistemas de saúde, uma vez que nesses casos o tratamento passa a ser realizado com anticorpos monoclonais anti-fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF α), como o infliximabe ou adalimumabe, os quais possuem custo dezenas de vezes mais elevado do que a combinação de AZA com alopurinol (Anandi et al., 2020; Brasil, 2017; Brasil, 2020).

Ainda que a variabilidade na resposta farmacológica seja compreendida como um evento multifatorial e complexo, os fatores genéticos são capazes de influenciar, pelo menos em parte, na eficácia ou na falha da resposta individual a um determinado fármaco (Franconi et al., 2007). No que se refere ao metabolismo da tiopurinas, variações nos genes da tiopurina S-metiltransferase (TPMT), da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA), da xantina oxidase (XO) e da hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HPRT) estão associadas a um risco aumentado de mielossupressão e de pancreatite. Essa variabilidade interindividual contribui para a ocorrência de eventos adversos, sendo, portanto, necessária uma melhor estratificação dos pacientes para maximizar o benefício do tratamento e minimizar o dano causado por eventos adversos (Bangma et al., 2020).

Nesse sentido, a realização da monitorização terapêutica das tiopurinas poderia permitir a individualização da dose do medicamento, ao contrário da dose padronizada em miligramas do fármaco por massa corporal do paciente (mg/kg). Além disso, esta prática possibilita a adequação dos níveis dos metabólitos ativos da AZA, os nucleotídeos 6-tioguanina (6-TGN), à faixa terapêutica e à manutenção das concentrações destes metabólitos em níveis adequados, reduzindo a prevalência de eventos adversos e toxicidade. Outro benefício da monitorização terapêutica é a identificação de pacientes que não aderem ao tratamento, já que a falta de adesão é uma causa conhecida de recorrência da doença na evolução das DII (Ribeiro et al., 2022; Ribeiro et al., 2023).

Entretanto, no Brasil, a monitorização terapêutica de fármacos ainda é pouco utilizada devido à falta de laboratórios devidamente equipados, de profissionais qualificados ou, ainda, desconhecimento desta ferramenta. No caso da monitorização das tiopurinas, ainda há a

dificuldade de não existirem conjuntos diagnósticos disponíveis comercialmente para quantificação destes metabólitos (Ribeiro et al., 2022; Ribeiro et al., 2023).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi ampliar o conhecimento acerca da influência dos polimorfismos em genes candidatos relacionados à metabolização da AZA em pacientes com DII atendidos no Hospital Universitário da UFJF, correlacionando os genótipos com as concentrações sanguíneas dos metabólitos da AZA e aos efeitos terapêuticos e adversos nos pacientes. Tais dados irão ampliar as informações genéticas referentes à população brasileira, contribuindo para que a terapêutica farmacológica possa ser realizada de forma otimizada e racional, visando o máximo de eficácia com o mínimo de efeitos adversos. Além disso, a otimização terapêutica através da individualização das doses de AZA pode contribuir para aumentar o sucesso da terapia medicamentosa, reduzindo a substituição destes medicamentos por outros de custos mais elevados, como os anticorpos monoclonais anti-TNF α , proporcionando um impacto positivo na farmacoterapia e na qualidade de vida destes e de outros pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

2.1.1 Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem um grupo heterogêneo de entidades que afetam o trato gastrointestinal, sendo os principais representantes a retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC), doenças autoimunes crônicas e recorrentes, responsáveis por causar inflamação da mucosa do trato gastrointestinal, podendo ser limitada à zona intestinal ou abranger outros órgãos subjacentes (Eltantawy et al., 2023; Ferreira et al., 2021; Graham; Xavier, 2020; Ramos; Papadakis, 2019).

Atualmente, a exata etiologia, bem como os eventos fisiopatológicos que deflagram a DII, são desconhecidos. Acredita-se que surjam da interação multicausal - ambiental, genético, microbiota e imunológico -, ocasionando resultado de imunidade intestinal anormal e microbiota alterada devido a fatores ambientais, como dieta, localização geográfica, tabagismo, etilismo, estresse, depressão, apendicectomia, atividade física e padrão de sono (Da Silva Venito et al., 2022; Eltantawy et al., 2023; Ferreira et al., 2021; Matsuoka et al., 2018). Parentes de primeiro grau de pacientes acometidos por DII são mais suscetíveis do que a população geral (Da Silva Venito et al., 2022).

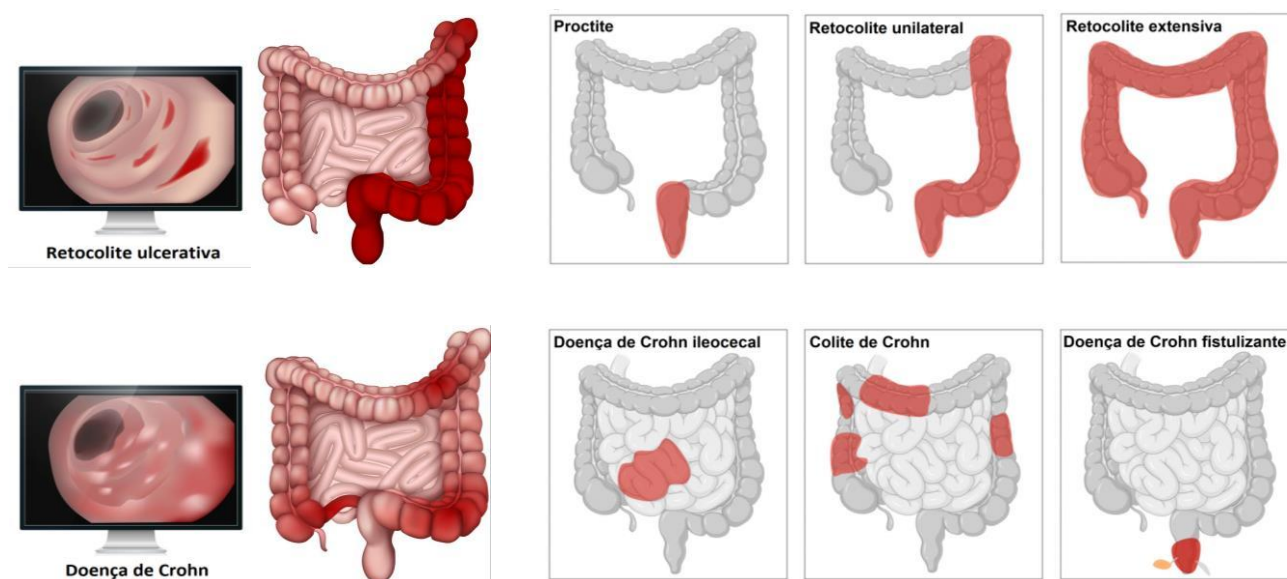
Apesar de semelhanças com a RCU, descrita pela primeira vez em 1859, o diagnóstico diferencial reconhecendo a DC como uma enfermidade diferente foi relatado primeiramente em 1932, com a publicação do artigo "Regional Ileitis: A Pathologic and Clinical Entity" pelo Burril B. Crohn e seus colaboradores Ginzburg e Oppenheimer (Crohn; Ginzburg; Oppenheimer, 1952; Crohn et al., 2000). Porém, como a DC foi inicialmente chamada de "ileíte regional" ou "enterite regional", alguns casos foram relatados como sendo RCU, e atualmente, sabe-se que eram, na verdade, relatos de DC (Crohn et al., 2000; Mulder et al., 2014).

A diferenciação de ambas, por muitas vezes, é um desafio para os profissionais de saúde, uma vez que apresentam heterogeneidade em muitas características clínicas e patológicas, sendo comum apresentarem dores abdominais, diarreia, com sério risco de sangramento importante, astenia, emagrecimento, febre, anemia e déficit nutricional. Elas são distinguidas por sua localização e natureza da inflamação (Huang et al., 2020; Yeshi et al., 2020).

Atualmente, a RCU é considerada uma doença inflamatória do intestino grosso e reto, e caracteriza-se por inflamação, hemorragia e ulceração contínua da camada superficial do

cólon e reto. Já a DC, é definida como uma DII progressiva transmural, que pode afetar qualquer segmento do sistema gastrointestinal, da boca ao ânus, incluindo o intestino delgado e intestino grosso (cólon), tipicamente envolvendo toda a espessura da parede intestinal, podendo haver áreas de intestino normal entre as áreas doentes, chamadas áreas “poupadas”. A inflamação persistente pode evoluir para formas complicadas, levando à formação de estenose ou fístulas, que eventualmente, podem exigir tratamento cirúrgico (Figura 1) (Eltantawy et al., 2023; Ferreira et al., 2021; Van Den Bosch; Coenen, 2021; Yeshi et al., 2020).

Figura 1 - Ilustração da localização do processo inflamatório na doença de Crohn e na retocolite ulcerativa

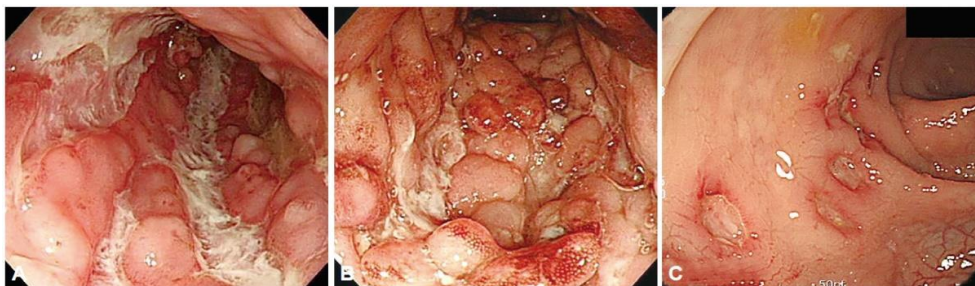


Nota: Diferentes tipos de doenças inflamatórias intestinais. Retocolite ulcerativa: proctítica, colite do lado esquerdo e colite estendida. Doença de Crohn: doença de Crohn ileocecal, colite de Crohn e doença de Crohn fistulizante. Em vermelho indica a área de inflamação.

Fontes: Yeshi et al. (2020).

O diagnóstico da DII geralmente é realizado com estudos de imagem, endoscopia, marcadores sorológicos e avaliação dos marcadores de atividade inflamatória (Figura 2). A colonoscopia é usada para estabelecer o diagnóstico, onde são observadas ulcerações entre áreas de aparência normal (poupadas) e alterações nas mucosas intestinais. A colonoscopia com ileoscopia permite a visualização direta e biópsia da mucosa do reto, cólon e íleo terminal, e devem ser realizadas durante a avaliação inicial de pacientes com quadro clínico sugestivo de DII (Papalia et al., 2021; Da Silva Venito et al., 2022).

Figura 2 - Características típicas da doença de Crohn (imagens endoscópicas)



Nota: (A) úlceras longitudinais, (B) úlceras com aparência de paralelepípedos, (C) úlceras aftosas.
Fonte: Lee e Lee (2016).

Os exames laboratoriais devem incluir a avaliação dos parâmetros inflamatórios no sangue (contagem e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, dosagens da proteína C-reativa (PCR)) e nas fezes (concentração de calprotectina ou lactoferrina). Um valor de calprotectina fecal abaixo de 150-200 $\mu\text{g/g}$ de fezes é considerado um marcador confiável de remissão. O principal diagnóstico diferencial é para a DC, seguida por tipos mais raros de colite, por exemplo, colite induzida por anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e colite isquêmica, linfogênica, collagenosa ou eosinofílica (Da Silva Venito et al., 2022).

A DII pode afetar as pessoas no início da infância até idade adulta, mas os indivíduos mais jovens são os mais afetados, incluindo adolescentes e adultos na faixa de idade mais produtiva - dos 15 aos 40 anos - o que se repercute em custos a longo prazo para o doente, para o sistema de saúde e para a sociedade. A doença é ligeiramente mais comum em mulheres e representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas a problemas gastrointestinais em adultos jovens no Ocidente (Simmons; Jewell, 2001; Van Den Bosch; Coenen, 2021).

Ademais, é notória a diminuição na qualidade de vida nestes pacientes, por sua significativa morbidade. Esta doença apresenta, ainda, um impacto econômico, além de impactos psicológicos e sociais significativos na qualidade de vida, devido à maioria dos pacientes serem afetados em seus anos produtivos (Geller; De Campos, 2015; Simmons; Jewell, 2001).

A avaliação do grau e atividade da doença nos indivíduos com DII é realizada através dos Índices de Atividade da DII (índice de *Harvey-Bradshaw* (IHB) - DC e índice de *Truelove and Witts* (ITW) - RCU), desenvolvidos na década de 70 e que têm sido amplamente utilizados na avaliação clínica da doença. O IHB é uma simplificação do *Crohn's Disease Activity Index* - CDAI, projetado para fazer a coleta de dados e computação mais fácil (Best, 2006). Tal avaliação é desejável para que se possa correlacionar a doença com possíveis desfechos

clínicos e com o prognóstico, selecionando a melhor estratégia terapêutica e o seguimento mais adequado para cada paciente (Bechara et al., 2015; Singh et al., 2023).

As manifestações clínicas das DII são variadas devido ao comprometimento do sistema gastrointestinal, manifestações extraintestinais e gravidade. Cerca de 45% dos pacientes apresentam o envolvimento do intestino delgado, predominantemente no íleo, enquanto 20% a 25% têm a doença confinada ao cólon (Pariente; Laharie, 2014). A associação com granulomas não necrosante epitelióides está presente em aproximadamente 30% dos casos de DII. Alguns pacientes têm a doença perianal e, raramente, podem ter clínica isolada na região oral, esofágica ou gastroduodenal. Conforme apontado por estudos de revisão, muito frequentemente, os sintomas da DII estão presentes em dois ou três anos antes de o diagnóstico ser estabelecido (Geller; De Campos, 2015; Pizzi et., 2015).

Podem ocorrer complicações como estenoses, comprometendo pequenas ou grandes áreas do intestino, e causar sintomas obstrutivos de distensão abdominal, náusea e vômito. Fístulas podem resultar em ulceração profunda, permitindo assim comunicação do intestino com outros órgãos, como a bexiga, vagina ou a pele (Simmons; Jewell, 2001).

Cabe destaque para o fato de que pacientes com DII apresentando lesões extensas por um longo período de tempo, possuem incidência de câncer colorretal significativamente aumentada, com probabilidade acumulada de 18% na RCU e 8% na DC, e incidência alta de neoplasias no intestino delgado e grosso, principalmente na região do reto e canal anal, em pacientes com DC (Da Silva Venito et al., 2022; Ferreira et al., 2021; Pochard et al., 2018).

Dados epidemiológicos têm demonstrado que os sintomas da DII podem ocorrer em até 30% dos pacientes após episódios de gastroenterite infecciosa, observado pelo aumento do número de células imunocompetentes ativadas, em particular de mastócitos, nas mucosas do intestino dos pacientes com DC (Burisch; Munkholm, 2015; Geller; De Campos, 2015; Mak et al., 2020).

A manifestação clínica mais frequente é a diarreia sanguinolenta (> 90%), combinada com cólicas (tenesmo, > 70%) no quadrante inferior esquerdo ou ao longo de todo o comprimento do cólon em pacientes com pancolite. A urgência fecal também é comum (>70%) (Da Silva Venito et al., 2022).

Clinicamente, DC e RCU compartilham sintomas, como diarreia, dor abdominal, dor e alterações no hábito intestinal, febre e, às vezes, sangramento retal, apesar de diferirem da localização e profundidade da inflamação, assim como da prevalência de complicações. Também podem ocorrer perda de apetite e subsequente perda de peso, e progressão crônica com ciclos repetidos de recaída e remissão. Além disso, pode desenvolver complicações extraintestinais em órgãos sistêmicos, como articulações, pele e olhos. Os sintomas podem

variar de leve a grave, mas em geral, as pessoas podem ter vidas ativas e produtivas (Da Silva Venito et al., 2022; Ferreira et al., 2021; Navrátil et al., 2021; Neurath, 2020).

Em relação às manifestações extraintestinais, estas são frequentemente observadas (6 a 7%) e contribuem consideravelmente para a morbidade e mortalidade em pacientes com DII (Greuter; Vavricka, 2019; Mak et al., 2020; Navrátil et al., 2021). A causa não é conhecida; há hipóteses de que possam estar relacionadas com os efeitos periféricos da ativação imunitária no intestino. Tem sido sugerido que podem ser causadas por complexos imunes circulantes ou por um auto-antígeno que é comum no intestino e em outros locais extraintestinais (Karmiris, et al., 2016; Navrátil et al., 2021).

Podem se apresentar, incluindo patologias oculares, artropatias, doenças hepáticas como colangite esclerosante primária e manifestações dermatológicas. Ademais, as lesões orais como a pioestomatite vegetante, erupção e espessamento da mucosa oral com múltiplas pústulas tipicamente indica RCU (Chang et al., 2020). A manifestação cutânea comum é o eritema nodoso, que apresenta nódulos vermelhos dolorosos na pele, coxa ou braço. Uma manifestação clínica mais grave é o pioderma gangrenoso, que começa como uma erupção pustulosa e, posteriormente, se torna ulcerosa (Card; Langan; Chu, 2016; Greuter; Vavricka, 2019; Mak et al., 2020; Navrátil et al., 2021).

Também pode ocorrer comprometimento da região ocular, onde cerca de 3% a 14% dos pacientes apresentam inflamações como uveíte anterior, episclerite e conjuntivite. No caso da presença de uveíte, esta pode estar presente na fase ativa da doença como muitas vezes pode permanecer após o procedimento cirúrgico da retirada das áreas afetadas do intestino (Card; Langan; Chu, 2016; Navrátil et al., 2021).

A doença hepática está presente em cerca de 5% dos pacientes e é causada, principalmente, por colangite esclerosante, caracterizada por um processo inflamatório e por fibrose do sistema biliar, ocasionando alterações dos ductos. Isso possibilita a ocorrência de cirrose e disfunção hepática crônica, associado a um risco aumentado de malignidade biliar (Karmiris et al., 2016). Surgiram também estudos sobre a possibilidade de a inflamação crônica ocasionar disfunções neuromusculares persistentes nos pacientes, assim como um possível aumento dos níveis de fadiga relacionada aos sintomas psicológicos e gastrointestinais, que afetam diretamente na qualidade de vida (Piche et al., 2010).

2.1.2 Epidemiologia

Não só a DII traz grande morbidade, como sua incidência vem aumentando nos últimos anos, configurando uma verdadeira epidemia mundial. A incidência e prevalência da DII variam com a localização geográfica e etnia. O diagnóstico pode ser difícil devido às variadas

manifestações clínicas, e as diferenças nos sistemas de saúde também contribuem para a estimativa imprecisa dos casos pelo mundo (Ferreira et al., 2021; Singh et al., 2020).

A DII é altamente prevalente, 9 a 20 casos notificados em 100.000 pessoas por ano, em países ocidentais, com os maiores índices no norte da Europa, América do Norte, Reino Unido e Austrália, podendo estar relacionado ao ambiente e a estilos de vida do ocidente. Nos últimos anos, houve aumento nos casos em países da América Latina, com taxas de prevalência tão altas quanto 24 por 100.000 no Brasil. É rara em países orientais, porém, a incidência nestes tem aumentado nos últimos anos. Aproximadamente 0,5% dos adultos dos países ocidentais sofrem de DII (Da Silva Venito et al., 2022; Eltantawy et al., 2023; Ferreira et al., 2021).

A DC é menos comum do que a RCU, com taxa de incidência anual de 1,5 a 20,3 diagnósticos por 100.000 habitantes, e uma prevalência de 21 a 243 casos por 100.000 habitantes na Europa (Singh et al., 2020). Percebeu-se uma tendência de aumento no número de casos de DC em alguns países, como os da América do Norte, norte da Europa e Inglaterra. Esta tendência ao aumento do número pode ser atribuída ao aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos ou a um real crescimento da população doente (Papacosta et al., 2017; Ramos; Papadakis, 2019; Singh et al., 2020).

Na última década, a taxa de incidência na China foi de 1,21 por 100.000 pessoas/ano e a taxa de prevalência foi de 2,29 por 100.000 pessoas. Essas taxas são mais altas do que aquelas de 1950 a 2002, que eram de 0,28 por 100.000 pessoas/ano e 1,38 por 100.000 pessoas, respectivamente (Lin et al., 2021). Na América do Norte, a taxa de incidência varia de 6,0 a 15,6 casos por 100.000 pessoas/ano e a prevalência varia de 38 a 246 casos por 100.000 pessoas (Singh et al., 2020).

Parece haver uma variação étnica na incidência de DII. Um grupo étnico com alta incidência desta doença são as populações judaicas, no entanto, os primeiros estudos relataram que a DII é rara em pretos, o que pode estar relacionado ao fato de a maioria desses estudos ter sido realizado em regiões com população preta limitada. Na Índia, foi relatado que a prevalência de RCU é substancialmente menor do que entre os europeus (Singh et al., 2020).

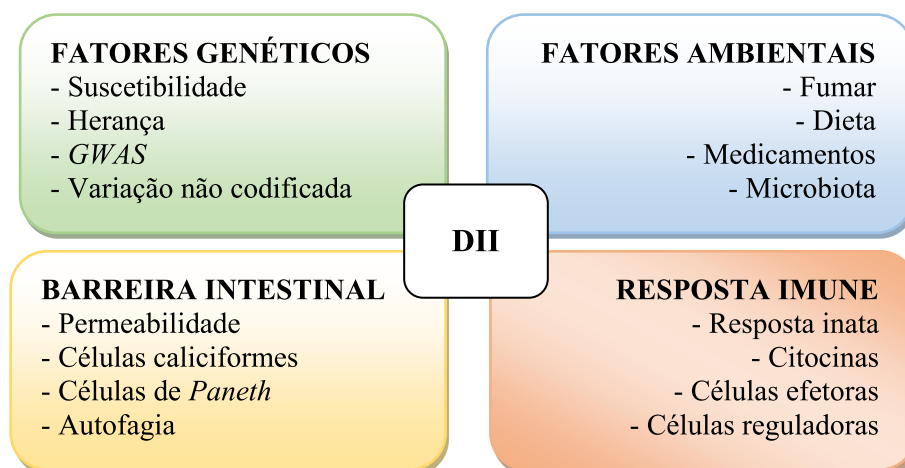
No Brasil, os dados de incidência e prevalência são restritos, pois as DII não são doenças de notificação compulsória, levando a deficiência de registros nos serviços públicos e na rede privada. No entanto, alguns estudos têm apontado um aumento das DII no Brasil, mostrando um índice anual de ocorrência de 0,08 casos/100.000 habitantes/ano, em 1988, para 1,53 casos/100.000 habitantes/ano, em 2007, e 12,8 casos/100.000 habitantes/ano em 2012 (Yeshe et al., 2020).

O aumento da prevalência em populações específicas ao redor do mundo sugere um importante componente genético no desenvolvimento de DII, e a nova tendência epidemiológica revela que os fatores ambientais, como mudanças no estilo de vida, podem desempenhar um papel crítico na patogênese da DC e RCU (Ramos; Papadakis, 2019).

2.1.3 Patogênese da DII

A patogênese da DII é complexa e envolve múltiplos fatores (Figura 3). Estudos destacam que sua prevalência e incidência variam de acordo com os fatores genéticos, ambientais, barreira intestinal e respostas inadequadas do sistema imunológico (Eltantawy et al., 2023; Koh et al., 2023; Ruiz et al., 2020). A interação entre a suscetibilidade genética e o impacto ambiental no microbioma pode levar, através de uma barreira intestinal enfraquecida, à ativação imunológica inadequada, responsável pelos achados clínicos e endoscópicos observados em pacientes com DII (Figura 3) (Ramos; Papadakis, 2019).

Figura 3 - Mecanismos envolvidos na patogênese da doença inflamatória intestinal



Nota: A patogênese da DII é resultado da interação entre fatores genéticos, ambientais, de barreira intestinal e de resposta imune. *GWAS* = estudos de associação genômica ampla.

Fonte: Adaptado de Ramos; Papadakis (2019).

Dentre os fatores genéticos, estudos de revisão apontam que o desenvolvimento da DII está ligado a 200 - 240 loci genéticos humanos, dos quais 110 loci genéticos são comuns, 30 loci genéticos específicos para DC e 23 loci genéticos específicos para RCU. No entanto, mais de 50% dos loci de genes suscetíveis a DII também estão associados a outras doenças inflamatórias e autoimunes (Schirmer et al., 2019; Yeshe et al., 2020).

A análise dos genes e loci genéticos identificados na DII indica que várias vias desempenham papéis importantes na manutenção da homeostase do intestino, como função de barreira epitelial, defesa inata da mucosa, regulação imunológica, migração celular, autofagia,

imunidade adaptativa e vias metabólicas associadas com homeostase celular (Guan, 2019; Schirmer et al., 2019; Yeshi et al., 2020). Foram identificados loci genéticos que aumentam o risco de desenvolvimento da DII. Em sua revisão, Da Silva Venito et al. destacaram que a presença de mutações homozigotas no gene NOD2, um gene associado a uma resposta imunológica inadequada ou exagerada a bactérias intestinais, está relacionada a um risco de 20 a 40 vezes maior para o desenvolvimento da doença de Crohn, em comparação à heterozigotidade (Da Silva Venito et al., 2022).

Apesar dos avanços nos estudos genéticos, apenas cerca de 25% da herdabilidade da DII parece ter sido explicada (Ramos; Papadakis, 2019). A revisão conduzida por Yeshi e colaboradores (2020) mostrou que menos de 50% de concordância para DII ocorre em gêmeos, ressaltando que os fatores ambientais podem ter um papel significativo no desenvolvimento de DII. Além disso, o estudo mostrou que não há a mesma concordância genética entre as duas doenças (DC e RCU) entre gêmeos, onde uma análise de uma coorte de gêmeos suecos mostrou maior concordância para DC (50%) do que para RCU (18,8%), sugerindo que a influência genética ou herdabilidade é maior em DC do que em RCU (Yeshi et al., 2020).

Novas tendências epidemiológicas em países em desenvolvimento sugerem que fatores ambientais podem desempenham um papel importante na promoção da doença em pacientes geneticamente suscetíveis, e suas interações com sistema imunológico, genes de suscetibilidade e alterações do microbioma do hospedeiro, levando à ruptura da mucosa intestinal. O papel das células inflamatórias na manutenção de uma doença ativa é bem conhecido e a maioria das terapias visa interromper a cascata de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias (Da Silva Venito et al., 2022; Ramos; Papadakis, 2019).

Embora a causa definitiva da DII permaneça por ser completamente elucidada, muitos estudos apontam para 10 fatores causais diferentes: o uso excessivo de antibióticos, dieta, cigarro, higiene, susceptibilidade genética, microbiota intestinal, apendicetomia, sono, estresse e inatividade física, fatores ambientais, com três fatores principais sendo genéticos, ambientais e dieta, que influenciam a microbiota intestinal humana (Yeshi et al., 2020).

Há relatos de aumento do risco de DII associado a exposição na primeira infância a antibióticos e a falta de exposição a microrganismos devido a vida mais limpa, urbanização e o uso generalizado de antibióticos, afetando a imunidade e a maturação (conhecida como “Hipótese da higiene”). Essa falta de exposição na primeira infância gera a hipótese de uma perda de vias regulatórias negativas, resultando em hiperatividade de respostas imunes do intestino à microbiota (Schirmer et al., 2019; Yeshi et al., 2020).

A microbiota intestinal tem um papel importante na saúde humana, incluindo o amadurecimento de respostas imunes, proteção contra proliferação de patógenos entéricos e resposta a fármacos. A interação da suscetibilidade genética e impacto ambiental no microbioma de um intestino enfraquecido leva a ativação da imunidade inadequada, responsável pelas sinais clínicos e achados endoscópicos observados em pacientes com DII (Graham Xavier, 2020; Schirmer et al., 2019).

Estudos relatam que uma das causas da DII é a resposta imunológica desregulada para a microbiota intestinal em indivíduos geneticamente suscetíveis, podendo causar o desequilíbrio entre os antígenos luminiais e a resposta imune da mucosa intestinal e assim, ampliar e perpetuar a reação de inflamação (Choung et al., 2016; Papacosta et al., 2017). Em seu estudo de revisão, os Simmons e Jewell afirmam que a citocina pró-inflamatória TNF- α desempenha um papel fundamental no imunopatogênese de DC. O surgimento e a progressão da doença estão relacionados com a integridade da mucosa. Alguns pacientes podem ter o aumento da permeabilidade intestinal, mesmo estando em remissão, devido a uma anormalidade na camada epitelial ou na restituição epitelial após dano (Simmons; Jewell, 2001).

A fisiologia humana pode ser alterada por sinalização celular induzida pelo microbioma, com a proliferação e biossíntese de neurotransmissores, levando a alterações sistêmicas das mucosas, afetando a função de barreira e das respostas da imunidade inata e adaptativa (Beaugerie et al., 2020; Graham; Xavier, 2020). Devido ao amplo efeito do microbioma na fisiologia e seu papel na indução e função do sistema imunológico, pesquisadores buscam compreender a interrelação entre a microbiota e doenças relacionadas ao intestino, como DII e distúrbios metabólicos (Graham; Xavier, 2020; Ramos; Papadakis, 2019).

A maioria dos gatilhos ambientais pode mediar a patogênese de DII por meio de seu impacto sobre o microbioma. No entanto, para que as alterações da microbiota intestinal possam resultar em inflamação contínua, a integridade da barreira intestinal que separa o lúmen e a mucosa também deve ser comprometida (Ramos; Papadakis, 2019; Yeshi et al., 2020).

Fatores dos pacientes associados com a industrialização, como índice de massa corporal, resposta glicêmica, colesterol de lipoproteína de alta densidade, o consumo de lactose, fumo, dieta, uso de medicamentos e ritmo circadiano também têm papéis dominantes na modulação da microbiota e efeitos sobre o desenvolvimento da DII (Schirmer et al., 2019; Yeshi et al., 2020).

O tabagismo tem sido um dos fatores mais estudados no contexto a DII. Clinicamente, notou-se que fumar cigarro é prejudicial em pacientes com DC. Estudos posteriores apontaram para a hipótese do prejuízo na autofagia, toxicidade para o sistema imunológico e

indução de alterações na microbiota (Ramos; Papadakis, 2019). Foi observado também que dieta rica em ácidos graxos saturados e carnes processadas esteve relacionada com o aumento de risco de DII. Por outro lado, dieta com alto teor de fibra foi associada à redução de doença em 40%, devido ao metabolismo da fibra alimentar por bactérias colônicas em ácidos graxos de cadeia leve que possuem propriedades antiinflamatórias, o que poderia potencialmente explicar este efeito protetor (Ramos; Papadakis, 2019; Yeshi et al., 2020).

2.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DII

A terapia farmacológica na DII possibilita desde o controle dos sintomas até a promoção da remissão "profunda" da doença com a cicatrização e cura da mucosa, remissão clínica e bioquímica, podendo ser alcançada em maiores taxas quando os pacientes obtêm o diagnóstico precoce, ou quando não têm doença transmural irreversível (presença de estenose ou fístula) ou ainda quando não apresentam a necessidade de tratamento cirúrgico (Hazel; O'Connor, 2020; Pariente; Laharie, 2014).

As estratégias para o manejo da DII mudaram nos últimos anos, com foco na prevenção da progressão da doença, na indução e manutenção da remissão clínica, na melhora dos resultados a longo prazo, no controle de sintomas e da inflamação, monitorados por resultados clínicos como cicatrização da mucosa e reparo de fístula, em vez de controlar apenas os sintomas. Cicatrização da mucosa no estágio inicial da doença muitas vezes prediz remissão sustentada e pode estar associada à redução de hospitalização e cirurgia (Beaugerie et al., 2020; Colombel et al., 2020; Van Den Bosch; Coene, 2021). A cirurgia mantém um papel fundamental no tratamento de complicações como estenoses, perfurações, fístulas e abscessos. A recorrência cirúrgica é conhecida por afligir mais de 80% dos pacientes operados (Da Silva Venito et al., 2022; Eltantawy et al., 2023).

O manejo farmacológico inclui aminossalicilatos, glicocorticoides, imunomoduladores e medicamentos biológicos. Tais tratamentos possuem eficácia variável no controle da doença, demonstrando importantes reações adversas sistêmicas inerentes às substâncias utilizadas (Da Silva Venito et al., 2022; Eltantawy et al., 2023).

Muitas vezes, a obtenção de remissão é demorada, afetando o curso natural da doença, a qual passa a necessitar de terapia com imunossupressores ou terapias biológicas mais recentes, tais como anticorpos anti-TNF α . Ambas as classes de fármacos estão associadas a efeitos adversos e a última terapia ainda apresenta um alto custo (Beaugerie et al., 2020; Colombel et al., 2020; Pariente; Laharie, 2014; Van Den Bosch; Coene, 2021).

A classe de fármacos 5-aminossalicilatos compreende compostos como mesalazina, sulfassalazina, balsalazida e olsalazina. Esses medicamentos são amplamente utilizados em pacientes com RCU e em alguns casos, na DC. O tratamento com fármacos 5-aminossalicilatos se mostra eficaz tanto para indução quanto para manutenção da remissão em pacientes com RCU leve a moderada, sendo, portanto, sugerida a sua utilização nesses casos. Para DC, a eficácia é menos clara (Brasil, 2017; Brasil, 2020; Da Silva Venito et al., 2022; Duijvestein et al., 2018; Hande et al., 2006; Van Den Bosch; Coenen, 2021).

A sulfassalazina foi eficaz no tratamento da doença colônica com a indução da remissão, mas não para terapia de manutenção em DC nem para o tratamento de doença restrita ao intestino delgado, sendo menos eficaz do que os glicocorticoides. No entanto, recomenda-se iniciar o tratamento da doença colônica ou ileocolônica leve a moderada com sulfassalazina e não com a mesalamina ou derivados (Brasil, 2017; Duijvestein et al., 2018).

Estudos clínicos mostraram a eficácia dos glicocorticoides no tratamento da fase aguda da DII. Já nos casos moderados da DII, graves ou apresentando doença extensa, a escolha terapêutica deve iniciar com a prednisona, porém estudos não evidenciaram benefício na associação deste com aminossalicilatos. Conforme protocolos e estudos clínicos, os glicocorticoides convencionais (prednisona e prednisolona) e os mais recentes, como a budesonida, apresentam início de ação rápido e se mostram tendo maior eficácia na indução da remissão da DII, por apresentarem melhor perfil de segurança e tolerabilidade (Brasil, 2017; Brasil, 2020; Duijvestein et al., 2018; Hazel; O'Connor, 2020).

É improvável que um paciente que tenha necessitado de glicocorticoides para induzir a remissão permaneça assintomático por mais de um ano sem tratamento de manutenção. Ademais, parece não haver benefício da manutenção de sulfassalazina ou mesalazina como profilaxia de reagudizações após remissão clínica, nem é indicado o uso de glicocorticoides como terapia de manutenção, portanto, a remissão pode ser mantida com tratamentos utilizando imunomoduladores e fármacos anti-TNF- α , em combinação ou como monoterapia (Brasil, 2017; Brasil, 2020; Hazel; O'Connor, 2020).

Quanto à terapia biológica no tratamento da DII, os fármacos são divididos em grupos. O primeiro grupo, e atualmente o mais utilizado, é o dos anticorpos anti-TNF- α , onde estão incluídos os medicamentos infliximabe, adalimumabe, certolizumabe e golimumabe. O segundo grupo é formado pelos medicamentos anti-integrinas, como o natalizumabe, o vedolizumabe, brazikumabe e miriquizumabe; e o terceiro grupo compreende fármacos de outras classes, principalmente, as anti-interleucina, como o ustekinumabe e os inibidores da JAK, o tofacitinibe, filgotinibe, upadacitinibe (Anvisa, [20--?]; Duijvestein et al., 2018; Trindade et al., 2019).

No Brasil, a maioria dos fármacos citados possuem registros para comercialização e alguns estão inclusos na prática clínica para tratamento da DII, exceto o brazikumabe, miriquizumabe e filgotinibe, cujos estudos clínicos estão na fase III para solicitação dos registros junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Anvisa, [20--?]).

A terapia de indução com os anticorpos monoclonais anti-TNF- α , infliximabe, adalimumabe, vedolizumabe, ustekinumabe, pode ser considerada para pacientes com DII sem resposta clínica significativa a glicocorticoides, AZA e metotrexato, ou com contraindicação ou intolerância a glicocorticoides e imunossupressores. Essa terapia, porém, deve ser suspensa se não houver resposta após duas doses ou os riscos devem ser ponderados em relação a seus benefícios, sendo o tratamento indicado para pacientes com grande comprometimento do estado geral, perda de peso, dor abdominal acentuada e fezes diarreicas, correspondendo a um IHB de 8 ou mais ou em atividade moderada a grave pelo ITW (Brasil, 2017; Brasil, 2020).

Apesar dos enormes avanços nos últimos anos na terapêutica de DII, cerca de 30% dos pacientes não respondem aos fármacos anti-TNF- α e, daqueles que respondem à terapia, até 10% perderão a resposta à droga a cada ano de tratamento. Além disso, os medicamentos atuais da DII, principalmente a classe dos fármacos anti-TNF- α , são associados a infecções e neoplasias com efeitos adversos significativos, além do alto custo do tratamento (Hazel; O'Connor, 2020; Yeshi et al., 2020).

Alguns trabalhos na literatura evidenciaram um aumento do risco de infecções fúngicas oportunistas em pacientes expostos a agentes anti-TNF- α , como infecção por *Legionella pneumophila*, particularmente em pacientes idosos, e tuberculose (Beaugerie et al., 2020). O tratamento realizado com a combinação de anti-TNF- α e tiopurinas expõe os pacientes a maiores riscos de infecções graves e oportunistas, quando comparado à monoterapia com anti-TNF- α , uma vez que este, por si só, já expõe os pacientes a maiores riscos de infecções fúngicas e bacterianas graves (Beaugerie et al., 2020).

Nos tratamentos com imunomoduladores, destacam-se os análogos da purina, a 6-mercaptopurina (6-MP) e seu pró-fármaco precursor, a AZA. As principais indicações para o tratamento com estes fármacos incluem a dependência ou refratariedade aos glicocorticoides, o tratamento da doença fistulizante e, possivelmente, a prevenção de recorrência pós-operatória. Ambos imunomoduladores podem ser utilizados nestes casos, com a escolha geralmente baseada na experiência prévia do clínico (Quadro 1) (Colli et al., 2008; Duijvestein et al., 2018; Sousa et al., 2014; Yeshi et al., 2020).

Quadro 1 - Terapia farmacológica na doença inflamatória intestinal

Farmacoterapia na Doença Inflamatória Intestinal		
Doença Retocolite Ulcerativa		
Pacientes pediátricos	- Azatioprina: 2-2,5 mg/kg por dia, dose única diária;	- Refratários ao corticoides e azatioprina: infliximabe 5 mg/kg (indução) e 0,2-6 mg/kg (manutenção) a cada 8 semanas
Mulheres grávidas e nutrizas	- Azatioprina: 2-2,5 mg/kg/dia	-
Pacientes (geral)	- Aminossalicilatos: 1-2 mg/kg/dia, em 1 ou 2 administrações; - Prednisona: 0,75- 1 mg/kg/dia (não excedendo 60 mg) * Evitar uso crônico	- Refratários aos aminossalicilatos ou prednisona: azatioprina: 2-2,5 mg/kg/dia
Doença de Crohn		
Pacientes pediátricos	- Azatioprina: 2-2,5 mg/kg por dia, dose única diária;	-
Mulheres grávidas e nutrizas	- Azatioprina: 2-2,5 mg/kg/dia	- Não recomendado associação com alopurinol.
Pacientes (geral)	- Prednisona; 40-60 mg/dia. Recomenda-se reduzir a dose até suspender o tratamento. - Azatioprina (2-2,5 mg/kg/dia, em dose única diária) >> indução da remissão e na manutenção	- Refratários a azatioprina: considerar associação de alopurinol (100 mg/dia), com redução de 50% na dose de azatioprina. pacientes sem resposta clínica significativa a corticosteroides, azatioprina e metotrexato, ou com contra-indicação ou intolerância a corticosteroides e imunossuppressores, considerar a terapia infliximabe (5 mg/kg nas semanas 0, 2 e 6) ou adalimumabe (160 mg na semana 0 e 80 mg na semana 2).

Fonte: Adaptado de Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Retocolite Ulcerativa e Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Crohn (Brasil, 2017; Brasil, 2020).

No tratamento a longo prazo da doença, estes imunomoduladores são os fármacos mais utilizados. Foram descobertos e introduzidos no mercado em 1950, originalmente destinados para tratamentos quimioterapêuticos. Em 1960, tais medicamentos começaram a ser utilizados em tratamentos de doenças autoimunes e em 1980 em pacientes com DII para a prevenção de recorrências clínicas (Itagaki et al., 2012).

Em razão do seu efeito anti-inflamatório, também têm sido utilizados em pacientes com outras doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, vasculites, alterações dermatológicas e artrite reumatóide. Outra utilização muito frequente da AZA tem ocorrido em numerosas doenças imunomediadas para a prevenção da rejeição de órgãos pós-transplante (Broekman et al., 2017; Colli et al., 2008; Sousa et al., 2014).

O tratamento da DII atualmente é individualizado por estratificação de risco, levando em consideração a gravidade da doença, localização, comportamento, complicações e resposta às terapias (Duijvestein et al., 2018). De acordo com a portaria SAS/SCTIE/MS nº 14, 28/11/2017, o protocolo terapêutico para DC orienta o tratamento com os fármacos salsalazina ou mesalazina (por tempo indeterminado), AZA e metotrexato (por tempo

indeterminado ou tempo necessário para manter a remissão), e com os imunobiológicos adalimumabe, infliximabe e certolizumabe (terapia mantida na doença ativa, devendo ser reavaliada a cada 12 meses). As orientações para o tratamento da RCU, conforme protocolo terapêutico publicado na portaria conjunta SAES/SCTIE nº 6, 26/03/2020 são semelhantes à DC, com uso de sulfassalazina e mesalazina, hidrocortisona e prednisona, AZA, ciclosporina, infliximabe e vedolizumabe (Brasil, 2017; Brasil, 2020).

A AZA é o pró-farmacó da 6-mercaptopurina (6-MP), que apesar do bom perfil de absorção após administração oral, não é detectável na forma intacta no plasma devido à passagem pelo extenso metabolismo de primeira passagem (meia-vida plasmática de 10 minutos). Já o seu metabólito ativo, 6-MP, possui uma biodisponibilidade oral entre 47,4 a 60%, com concentrações sanguíneas máximas atingidas dentro de 1 a 2 horas após administração. Tanto a AZA quanto a 6-MP ligam-se moderadamente às proteínas plasmáticas (30%) e são rapidamente removidos do plasma no fígado ou pelos eritrócitos, com meia-vida dos nucleotídeos intraeritrocitários entre 3 e 13 dias (Brunton; Goodman; Gilman, 2012; Singh et al., 2020; Turbayne; Sparrow, 2022; University of Minnesota, [2016]).

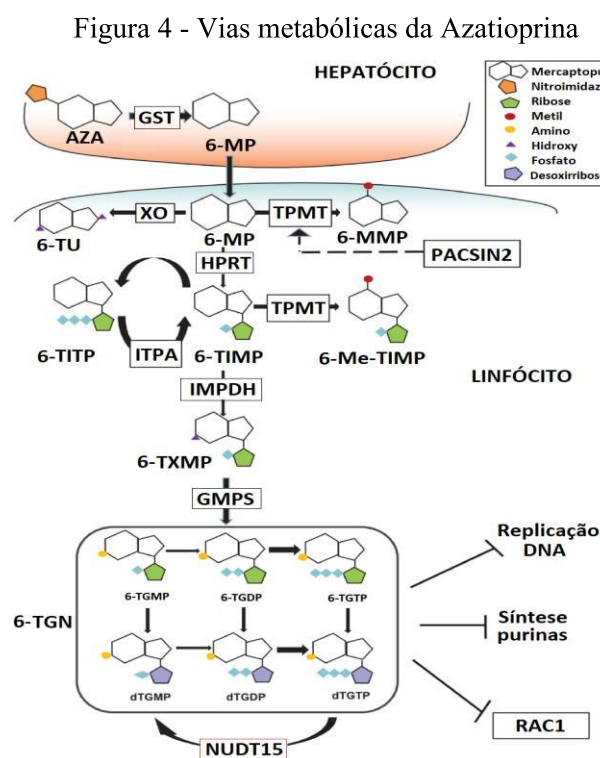
Com ampla distribuição por todos os líquidos corporais, cerca de 88% da AZA são convertidos rapidamente em 6-MP e metil-nitroimidazol não enzimaticamente pela glutatona reduzida e enzimaticamente pela ação da glutatona-S-transferase (GST) (Cuffari, 2014; Wilson et al., 2021; Zochowska et al., 2016).

O 6-MP é absorvido rapidamente pelos progenitores dos glóbulos brancos alvos, particularmente a linhagem mieloide, na medula óssea e o seu metabolismo intracelular ocorre ao longo das três vias enzimáticas concorrentes catalisadas pela xantina oxidase, hipoxantina-fosforibosil transferase e tiopurina S-metil-transferase, formando os metabólitos intraeritrocitários tioanálogos da purina (Figura 4). A 6-MP sofre ação da enzima xantina oxidase ou xantina desidrogenase (XO/XDH) que a oxida, no fígado e na mucosa intestinal, dando origem ao metabólito inativo 6-TU (6- ácido tioúrico). A taxa de conversão varia entre os indivíduos e o processo de eliminação das tiopurinas ocorre, principalmente, na forma de metabólito inativo oxidado (Singh et al., 2020; Turbayne; Sparrow, 2022; Wilson et al., 2021).

Outra enzima intraeritrocitária que atua sobre o fármaco é a tiopurina metil-transferase (TPMT), a qual promove a metilação da 6-MP, produzindo o metabólito inativo intracelular 6-MMP (6-metil mercaptopurina). Uma terceira via enzimática envolve a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase, responsável pela produção dos principais metabólitos ativos, os nucleotídeos ativos da 6-TGN: 6-tioguanina monofosfato (6-TGMP), 6-tioguanina

difosfato (6-TGDP) e 6-tioguanina trifosfato (6-TGTP), que exercem a ação imunossupressora da AZA, sendo o 6-TGTP particularmente mais ativo na inibição de Rac1 (proteínas Rho GTPases) (Lin et al., 2021; Turbayne; Sparrow, 2022; Wilson et al., 2021).

Nessa última etapa, 6-MP é transformada pela hipoxantina-fosforibosil transferase (HPRT) em 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP), a qual pode seguir dois caminhos: ou é metilada pela TPMT para 6-metilmonofosfato (6-MeTIMP); ou é convertida pela inosina-5-monofosfato desidrogenase (IMPDH) em 6-tioxantosina monofosfato (6-TXMP), que, finalmente, pela ação da guanidina 5-monofosfato sintetase (GMPS), gera a 6-TGN e seus nucleotídeos farmacologicamente ativos, promovendo o efeito mielossupressor e atuando como um antagonista de purina que se integram nas moléculas de DNA e RNA para exercerem efeitos citotóxicos e imunossupressores. Além disso, o 6-TGTP também se liga ao Rac1, resultando na diminuição da ativação das células T e redução da migração de leucócitos para locais inflamatórios, levando finalmente ao aumento da apoptose de linfócitos T ativados (Figura 4) (Lin et al., 2021; Sousa et al., 2014; Chen et al., 2021).



Nota: AZA: azatioprina; GST: glutatona S transferases; 6-MP: 6-mercaptopurina; TPMT: tiopurina metil-transferase; 6-MMP: 6-metil mercaptopurina; XO: xantina oxidase; 6-TU: 6- ácido tiourico; HPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase; 6-TIMP: 6-tioinosina monofosfato; 6-MeTIMP: 6-metil-tioinosina monofosfato; ITPA: inosina trifosfatase; 6-TITP: 6-tioinosina trifosfato; IMPDH: inosina-5-monofosfato desidrogenase; 6-TXMP: 6-tioxantosina monofosfato; GMPS: guanidina 5-monofosfato sintetase; 6-TGN: nucleotídeos de 6-Tioguanina; 6-TGMP: 6-tioguanina monofosfato; 6-TGDP: 6-tioguanina difosfato; 6-TGTP: 6-tioguanina trifosfato.

Fonte: Franca et al. (2019).

Apesar da eficácia comprovada da AZA/6-MP no tratamento da DC e RCU, o uso das tiopurinas é, frequentemente, acompanhado de efeitos adversos como hepatotoxicidade induzida pela tiopurina, queixas gastrointestinais, sintomas gripais ou até mesmo mielossupressão, representada por leucopenia ou neutropenia, fato que pode contribuir para que o paciente abandone o tratamento (Anandi et al., 2020; Bangma et al., 2020; Broekman et al., 2017; Trindade et al., 2019).

Em termos de via metabólica das tiopurinas, o fármaco alopurinol, inibidor da enzima xantina oxidase (XO), promove um desvio do metabolismo gerando um aumento da produção dos nucleotídeos ativos 6-TGN e diminuição da 6-MMP, aumentando o risco de mielotoxicidade, porém reduzindo o risco de hepatotoxicidade. O mecanismo pelo qual o fármaco conduz a uma redução nas concentrações do metabólito inativo 6-MMP ocorre porque o aumento das tioxantinas inibe a TPMT (Curkovic et al., 2013; Wilson et al., 2021).

Uma possibilidade é que o alopurinol possa inibir um cofator enzimático envolvido no metabolismo da tiopurina. O fosforibosilpirofosfato (PRPP) é um substrato necessário para várias enzimas envolvidas na síntese de ribonucleotídeos à base de purinas, incluindo o 6-MMP. Estudos indicam que o alopurinol causa rápida depleção do PRPP eritrocitário, o que inibe a produção de 6-MMP. Há também dados que sugerem que o próprio alopurinol apresente ações anti-inflamatórias no tratamento da DII por eliminação de espécies reativas de oxigênio intestinal (Turbayne; Sparrow, 2022). Em estudos clínicos e relatos de casos, as doses de tiopurinas foram reduzidas entre 25 e 50% da dose inicial quando combinada com doses diárias de alopurinol (100mg a 200mg ou até 300mg) (Curkovic et al., 2013; Pacheco Neto et al., 2012; Wilson et al., 2021).

Os efeitos dessa combinação de AZA com alopurinol (AZA/alopurinol) levam a um aumento da produção de 6-TGN, normalização da função hepática, a resolução de diversos efeitos adversos à AZA, a um melhor controle da doença e menor uso de glicocorticoides, melhorando de forma geral, a qualidade de vida destes pacientes (Curkovic et al., 2013). De modo geral, a intervenção terapêutica, associando-se a tiopurina com alopurinol tem mostrado resultados importantes no tratamento da doença, aumentando a adesão ao tratamento e reduzindo os efeitos adversos, impactando diretamente sobre a saúde pública, com redução dos gastos com medicamentos de alto custo, hospitalizações e procedimentos cirúrgicos (Pacheco Neto et al., 2012).

Atualmente, já é usual a associação AZA/alopurinol como escolha terapêutica em casos particulares, conforme recomendado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – DC - Portaria SAS/MS nº 14, de 28 de novembro de 2017, com o objetivo de melhorar a adesão ao tratamento e reduzir, ou até mesmo eliminar, os efeitos adversos da AZA (Quadro 1).

Entretanto, há uma preocupação com relação à dose da AZA que, quando associada ao alopurinol, necessita ser reduzida, o que atualmente, ocorre de forma empírica (Brasil, 2017; Misdaq et al., 2015).

Torna-se evidente a importância do conhecimento do metabolismo da AZA, bem como a eficácia da associação do alopurinol à AZA em pacientes que apresentem perfil metabólico desfavorável, isto é, com produção preferencial de 6-MMP em relação à 6-TGN (Lin et al., 2021).

Pacientes que apresentam mau prognóstico da doença, não são necessariamente aqueles que irão responder melhor ou pior a certas terapias. Embora a personalização da terapia em DC ainda não seja uma realidade de todos, a previsão confiável de resposta ao tratamento, combinada com indicadores clínicos de doença agressiva, permite uma melhor seleção de candidatos ao tratamento, favorecendo a escolha de terapias mais eficazes e menos tóxicas (Cravo et al., 2014). Além disso, pacientes que apresentam falha à terapêutica ou que são intolerantes às tiopurinas, geralmente necessitam ser tratados com terapia anti-TNF- α (infliximabe, adalimumabe ou certolizumabe), no entanto são medicamentos de custo muito elevado e de disponibilidade mais restrita que as tiopurina (Anandi et al., 2020).

2.3 EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS AO TRATAMENTO COM TIOPURINAS

Os eventos adversos podem ser divididos em reações idiossincráticas/alérgicas, reações dependentes da dose (metabólito) e malignidades. Numa revisão, foram destacadas como reações idiossincráticas/alérgicas a toxicidade gastrointestinal, toxicidade cutânea, pancreatite, sintomas constitucionais e reações de hipersensibilidade induzidas por medicamentos. Mudar a farmacoterapia de um paciente em uso de AZA para 6-MP pode superar intolerâncias em até 50% dos casos, consistente com o metil-nitrotioimidazol ser a causa da intolerância nesses pacientes (Turbayne; Sparrow, 2022).

Os eventos adversos dependentes da dose (e do metabólito) incluem mielossupressão, hepatotoxicidade e infecções. Suspeita-se que aproximadamente 20% dos pacientes que iniciaram o tratamento com AZA apresentarão efeitos adversos devido aos níveis tóxicos dos metabólitos 6-MMP ($> 5.700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) e/ou 6-TGN ($> 450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos). O risco aumentado de malignidades em pacientes com DII tratados com tiopurinas pode incluir leucemia, linfoma, câncer de pele não melanoma, câncer urotelial e cervical. Embora a associação com câncer de pele não melanoma (taxa de risco 1,4–4,3) e linfoma (taxa de risco 2,2–5,3) seja consistente em vários estudos reunidos em uma revisão de literatura, os riscos de outras doenças malignas, especialmente em comparação com pacientes

tratados com medicamentos biológicos, permanecem menos definidos (Turbayne; Sparrow, 2022).

Mudanças na atividade das enzimas que participam da farmacocinética das tiopurinas, principalmente da TPMT, podem afetar os níveis de 6-TGN e 6-MMP e, portanto, podem contribuir para as diferenças interindividuais observadas na resposta terapêutica ou na toxicidade após a administração de tiopurina (Franca et al., 2019). Os pacientes com baixa atividade enzimática TPMT, apresentam elevadas concentrações de 6-TGN, portanto, quando tratados com doses padrão de AZA, estão sujeitos a um maior risco de mielossupressão. Entretanto, os pacientes com alta atividade de TPMT são normalmente resistentes às tiopurinas ou requerem uma dose mais elevada para alcançar eficácia terapêutica, o que aumenta o risco de ocorrência da hepatotoxicidade (Broekman et al., 2015; Liu et al., 2015; Turbayne; Sparrow, 2022).

Os nucleotídeos de 6-TGN produzidos agem como substratos antagonistas competitivos pela enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT), e são incorporados ao DNA como falsos metabólitos (antimetabólitos), interferindo na síntese proteica com a incorporação de trifosfato de tioguanosina (tGTP) no RNA e do trifosfato de desoxitioguanosina (tdGTP) no DNA, danificando os ácidos nucléicos, prejudicando a replicação do DNA, resultando assim em parada do ciclo celular e apoptose (Franca et al., 2019; Petit et al., 2008; Prefontaine et al., 2009; Turbayne; Sparrow, 2022).

Shin e colaboradores (2016) relataram outra possível explicação para os efeitos imunossupressores em linfócitos T. O metabólito ativo da 6-MP, o 6-TGN, e o tGTP inibem a ação da proteína guanosina trifosfato, a Rac1, (Figura 4), potencializando os efeitos antiproliferativos das tiopurinas nos linfócitos (Shin et al., 2016). As patologias autoimunes e rejeições de transplantes são mediadas por essa proteína transmembrana. A inibição da Rac1 impossibilita a ativação de genes importantes, alvos de cascatas, como a do gene antiapoptótico Bcl-xl e do fator nuclear kB (NF- κ B) (Franca et al., 2019; Shin et al., 2016).

Vários estudos compilados em uma revisão relataram que as variantes da enzima ITPA podem aumentar o risco de toxicidade hematológica relacionada à tiopurina, hepatotoxicidade, sintomas semelhantes aos da gripe, pancreatite e erupção cutânea em pacientes com DII (Lee et al., 2022).

A mielossupressão, que se caracteriza pela contagem de leucócitos $< 2,5 \times 10^9 / L$ e/ou pela contagem de neutrófilos $\leq 1,0 \times 10^9 / L$, é um evento adverso dependente da dose da AZA, e apresenta uma incidência de 2,5 a 10% nos pacientes com DII tratados com tiopurinas, gerando uma grande preocupação, visto que o risco da mielossupressão é aumentado em pacientes com deficiência da enzima citoplasmática TPMT e se tornam

susceptíveis a infecções oportunistas graves que levam à hospitalização de 30% dos pacientes, com uma mortalidade estimada de 1% (Anandi et al., 2020; Bangma et al., 2020; Chang et al., 2020; Shin et al., 2016).

A leucopenia é a forma mais comum de mielossupressão induzida por tiopurina. A maioria dos casos de leucopenia grave se desenvolve no primeiro mês de terapia com tiopurinas, no entanto, pode ocorrer a qualquer momento durante o tratamento, de forma abrupta, sem quaisquer sintomas ou sinais de alerta (Chang et al., 2020).

Estima-se que a incidência de leucopenia induzida por tiopurina é cerca de 5% em pacientes caucasianos com DII, enquanto observa-se incidência mais alta em populações do Leste Asiático, incluindo coreanos (31,2% - 39,6%), chineses (15,6%) e japoneses (20,8%). Tais diferenças étnicas na incidência de leucopenia parecem estar relacionadas a polimorfismos em genes que regulam o metabolismo da tiopurina (Chang et al., 2020).

Os eventos adversos são significativamente mais graves em pacientes com uso de doses mais elevadas de AZA. Estudos clínicos na Ásia têm mostrado que a mielotoxicidade ocorre em aproximadamente 20 a 40% dos pacientes que receberam AZA para o tratamento da DII (Lin et al., 2021; Shi et al., 2016). Por conseguinte, achados clínicos evidenciam que a maioria dos médicos do continente asiático tendem a iniciar a AZA numa dose mais baixa e aumentam gradualmente a fim de evitar efeitos secundários (Roman et al., 2012; Shi et al., 2016).

Pacientes que apresentam maior risco de desenvolver leucopenia fatal no tratamento com tiopurinas são os homocigotos para uma variante genética da TPMT, pois muitas vezes mostram uma perda completa da atividade de TPMT e, conseqüentemente, um aumento dos níveis tóxicos de 6-TGN (Van Den Bosch; Coenen, 2021). A atividade reduzida ou nula da TPMT ocasiona no risco de supressão da medula óssea devido a altos níveis de 6-TGN em relação à dose usual recebida. Por essa razão, a realização de testes farmacogenômicos antes do início da terapia poderia otimizar a seleção de medicamentos apropriados e suas doses, bem como reduzir seus efeitos adversos (Eltantawy et al., 2023; Turbayne; Sparrow, 2022).

Outros metabólitos metilados das tiopurinas como o 6-MMP, gerados pela ação da enzima TPMT são considerados sem atividade terapêutica e apresentam efeito hepatotóxico, que se manifesta como hepatites ou pancreatites. Na maioria dos casos, é uma hepatotoxicidade imprevisível, cujos mecanismos patogênicos permanecem desconhecidos (Franca et al., 2019; Gearry; Barclay, 2005; Kirzherr et al., 2013).

O aparecimento de hepatite foi registrado em 3,5% a 10% dos pacientes adultos com DII tratados com AZA. Outros achados histopatológicos foram observados na hepatotoxicidade induzida por AZA, como pancreatite, hiperplasia nodular regenerativa,

doença venooclusiva, peliosis hepática, fibrose perisinusoidal, reação idiossincrática colestática e danos nas células endoteliais hepáticas. A colestase, associada ou não à necrose dos hepatócitos, também foi relatada em estudos clínicos (Anandi et al., 2020; Colli et al., 2008; Misdaq et al., 2015).

A pancreatite, considerada pela dosagem das enzimas pancreáticas séricas (amilase / lipase) duas vezes acima do limite superior do normal, ocorre em cerca de 4% dos pacientes expostos à tiopurina e a patogênese desse evento

adverso idiossincrático potencialmente fatal permanece mal compreendida. O haplótipo HLA-DQA1-HLA-DRB1 foi identificado como um determinante genético para pancreatite (Bangma et al., 2020).

As tiopurinas são conhecidas por induzir o estresse oxidativo, especialmente em mitocôndrias, resultando em uma disfunção mitocondrial e ativação da proteína quinase pela via de estresse oxidativo. O estresse oxidativo induzido provoca disfunção do ciclo do ácido tricarbóxico, esgotando as enzimas mitocondriais, promove a incorporação no DNA mitocondrial, onde é rapidamente oxidado, ocasionando a diminuição das concentrações de proteínas mitocondriais e perda da função mitocondrial (Misdag et al., 2015; Pereira et al., 2016; Wilson et al., 2021).

Um estudo em culturas de linfoblastos humanos tratados com tiopurinas mostrou a ocorrência de processo oxidativo no DNA, causando danos e disfunções mitocondriais (Misdag et al., 2015). Estudos anteriores realizados com culturas de hepatócitos primários de rato mostraram que a AZA levou a um profundo esgotamento da GST intracelular durante o seu metabolismo hepático, ocasionando o estresse oxidativo mediado pela enzima XO, com consequente lesão mitocondrial, redução de atividade metabólica, diminuição da 5-trifosfato-adenosina e morte celular por necrose e não por apoptose. Efeitos estes agudos e dependentes da dose (Al Maruf; Wan; O'Brien, 2014; Petit et al., 2008).

Apesar dos estudos ainda serem preliminares, têm-se sugerido que a hepatotoxicidade em ratos tratados com AZA esteja relacionada à depleção de GST, levando a produção de espécies reativas de oxigênio, precipitando a peroxidação de lípidos e proteínas e a indução transitória da permeabilidade mitocondrial. Tal hipótese é considerada, uma vez que o efeito hepatotóxico não é observado quando há administração do fármaco 6-MP (metabólito ativo da AZA), o que evitaria a formação do radical liberado pela AZA no fígado, durante sua conversão enzimática (Broekman et al., 2015; Misdaq et al., 2015; Petit et al., 2008; Raza et al., 2003).

2.4 FARMACOGENÉTICA NO TRATAMENTO DA DII COM AZA

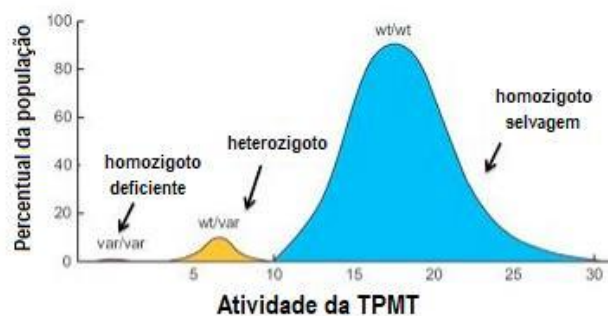
Informações farmacogenéticas podem desempenhar um papel importante na identificação de pacientes respondedores e não respondedores aos medicamentos, além de minimizar a chance de reações adversas e otimizar a dose do medicamento (FDA, 2024). Neste sentido, ainda que a variabilidade na resposta farmacológica seja compreendida como um evento multifatorial e complexo, os fatores genéticos são capazes de influenciar, pelo menos em parte, na eficácia ou na falha da resposta individual a um determinado fármaco (Franconi et al., 2007).

No que se refere a estudos farmacogenéticos envolvendo as tiopurinas, maior foco tem sido dado a variações na enzima TPMT, que desempenha um papel fundamental no processo catabólico da S-metilação de compostos aromáticos, agindo sobre as tiopurinas. A atividade da TPMT exibe uma distribuição trimodal em eritrócitos e os polimorfismos do gene da enzima levam a uma importante variação na atividade enzimática entre os indivíduos (Misdaq et al., 2015; Van Den Bosch; Coenen, 2021; Turbayne; Sparrow, 2022).

A TPMT é codificada por um gene de 27 kb localizado no braço curto do cromossomo 6 no locus 22.3 (6p22.3) e os polimorfismos dessa enzima têm sido amplamente investigados por diversos pesquisadores, tendo-se conhecimento de que a presença de alelos polimórficos como TPMT *2, *3A, *3B e *3C está associada à atividade diminuída da enzima quando comparada ao alelo selvagem TPMT *1 (Tabela 1) (Beránek et al., 2015; Broekman et al., 2015; Carvalho et al., 2014; Zeglam et al., 2015).

Estudos funcionais dos polimorfismos no gene da TPMT demonstram uma distribuição trimodal da atividade da referida enzima: atividade normal ou alta, atividade intermediária e atividade baixa ou deficiente (Relling et al., 2011). Neste contexto, os indivíduos homocigotos para o alelo selvagem da TPMT (wt/wt) apresentam atividade normal a alta da enzima, enquanto os indivíduos que carregam um alelo variante (wt/var) apresentam atividade enzimática intermediária, ao passo que aqueles homocigotos para o alelo variante (var/var) apresentam baixa ou nula atividade da TPMT (Figura 5) (Relling et al., 2011).

Figura 5 - Distribuição de frequência trimodal da Tiopurina Metil transferase (TPMT)



Fonte: Adaptado de Relling et al., 2011.

Neste contexto, são bem caracterizados três variantes do gene da TPMT associados com SNP não sinônimos rs1142345 (c.719A>G - TPMT *3A - TPMT *3C), rs1800460 (c.460G>A - TPMT *3A e TPMT *3B) e rs1800462 (c.238G>C - TPMT *2), todos apresentando baixa ou nula atividade da enzima. Esses três polimorfismos são responsáveis por mais de 95% da deficiência da atividade de TPMT (Franca et al., 2019).

Conforme estudos em população caucasiana, 89% a 94% dos indivíduos são homozigotos para o alelo selvagem da TPMT e, conseqüentemente, apresentam níveis de atividade enzimática entre normal e alta, de 6% a 11% são heterozigotos e têm atividade enzimática intermediária e cerca de 0,3% são homozigotos para o alelo não-funcional, sendo a atividade da enzima ausente, insignificante ou baixa (Figura 5) (Carvalho et al., 2014; Misdag et al., 2015; Van Den Bosch; Coenen, 2021; Zeglam et al., 2015)

A distribuição fenotípica da TPMT também foi pesquisada entre brasileiros mostrando comportamento semelhante à supracitada, sendo que 89,9% dos indivíduos exibiram atividade normal da enzima, 9,8% atividade intermediária e 0,3% com fenótipos de metabolizador de fraco, semelhante entre as pessoas autodeclaradas brancas, pretas e pardas (Botton et al., 2019; Pacheco Neto, 2010; Suarez-Kurtz et al., 2020).

Estudos apontam que com doses convencionais de tiopurinas, os indivíduos homozigotos para o alelo variante da TPMT apresentam mielossupressão grave, ao passo que uma alta proporção de heterozigotos apresenta mielossupressão moderada a grave, e aqueles que são homozigotos para o alelo selvagem apresentam níveis mais baixos de metabólitos 6-TGN e, conseqüentemente, menor risco de mielossupressão. Coletivamente, os dados disponíveis para TPMT indicam que aproximadamente 10% dos brasileiros correm risco aumentado de toxicidade e aproximadamente 0,3% correm risco muito alto de toxicidade quando expostos às doses padrão de tiopurinas (Relling et al., 2011; Suarez-Kurtz et al., 2020).

Além da TPMT, outra enzima de interesse envolvida no metabolismo da tiopurina é a ITPA (inosina trifosfato pirofosfohidrolase ou inosina trifosfatase), a qual catalisa a pirofosfohidrólise do 6-tioinosina trifosfato (6-TITP) em 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP). A ITPA é uma enzima protetora, altamente expressa em leucócitos e hemácias, que evita o acúmulo de metabólitos tóxicos, como o 6-TITP, durante o metabolismo de 6-MP (Tabela 1) (Eltantawy et al., 2023; Lee et al., 2022; Van Den Bosch; Coenen, 2021). Mais de 300 polimorfismos distintos foram identificados no gene ITPA humano e estima-se que quase um terço da população global possa abrigar o polimorfismo que está associado à diminuição da atividade ITPA (Burgis et al., 2023).

Em estudos clínicos e de revisão de literatura, foi evidenciado que duas variantes no gene da ITPA estão associadas com a diminuição da atividade 6-TITP para 25 a 60% da atividade normal: ITPA rs1127354 (94C>A p. (Pro32Thr)) e ITPA rs7270101 (c.124 + 21A>C) (Eltantawy et al., 2023; Van Den Bosch; Coenen, 2021). Vários estudos se concentraram em pesquisar principalmente essas duas variantes no gene ITPA rs1127354 (94C>A) e ITPA IVS2 + 21A>C e suas relações com o metabolismo da AZA e 6-MP, bem como a relação com efeitos adversos em pacientes com DII. A deficiência da enzima ITPA decorrente de variantes genéticas afeta 5 a 7% dos caucasianos e africanos, e até 15% dos asiáticos (Eltantawy et al., 2023; Van Den Bosch; Coenen, 2021; Moradveisi et al., 2019).

A variante ITPA rs1127354 (94C>A) é um dos polimorfismos mais conhecidos associados à deficiência de ITPA, que retém purinas na forma de 6-TITP, resultando em toxicidades por tiopurina, incluindo mielossupressão e hepatotoxicidade. Como a ITPA desempenha um papel na proteção das células contra o acúmulo de metabólitos tóxicos, foi considerado um possível gene candidato que pode afetar o metabolismo e as toxicidades induzidas por 6-MP com variabilidade interindividual (Lee et al., 2022; Van Den Bosch; Coenen, 2021).

O polimorfismo da ITPA rs 1127354 afeta cerca de 5% das pessoas e está associado à baixa eficácia em pacientes submetidos ao tratamento com tiopurina. Estudos indicaram que a variante ITPA rs 1127354 tem cerca de 50% da atividade enzimática em relação ao tipo selvagem, e dados clínicos mostraram uma deficiência completa e atividade enzimática diminuída para 25% nos homozigotos e heterozigotos em relação ao tipo selvagem, respectivamente. Portanto, pacientes com um alelo variante não funcional de ITPA têm menor atividade enzimática ITPA, levando ao acúmulo anormal de metabólitos potencialmente tóxicos nos eritrócitos, o que pode estar associado a toxicidades induzidas por 6-MP (Burgis et al., 2023; Lee et al., 2022; Van Den Bosch; Coenen, 2021).

Embora vários estudos contemplados nas revisões dos autores tenham relatado uma associação clínica entre o polimorfismo no gene da ITPA e toxicidades relacionadas ao tratamento com 6-MP, os resultados foram inconsistentes (Lee et al., 2022; Lee et al., 2021; Peltenburg et al., 2015). Entretanto, outros estudos, ressaltaram que a diminuição da atividade de ITPA foi associada a efeitos adversos como neutropenia febril durante o tratamento com AZA e 6-MP, enquanto outras pesquisas não demonstraram tal associação (Eltantawy et al., 2023; Van Den Bosch; Coenen, 2021).

As frequências alélicas da variante ITPA 94C>A indicaram variabilidade interétnica (1–2% na população hispânica, 5–7% na população caucasiana e africana e 19% na população asiática). Curiosamente, o alelo ITPA 94C>A mostrou frequências de distribuição alélica inversas àquelas exibidas pelo gene da TPMT, em diferentes populações pesquisadas como na China e Japão. Portanto, as variantes do ITPA podem ser essenciais para prever a toxicidade induzida pela 6-MP em populações nas quais as frequências alélicas da variante TPMT são baixas, como nas populações asiáticas (Lee et al., 2022).

Ademais, a xantina oxidase (XO) é o segundo principal fator enzimático na degradação da AZA, além da TPMT. XO é uma enzima citoplasmática desintoxicante precoce que está extensivamente presente no fígado e no intestino delgado. Ela oxida amplamente não apenas as purinas e pirimidinas endógenas, mas também o análogo de purina exógeno, a 6-MP, no metabolismo de primeira passagem da tiopurina (Tabela 1) (Moon; Loftus, 2016).

Como a afinidade da XO pelas purinas endógenas é muito maior do que pelo análogo da purina exógena, 6-MP, o nível de oxidação de uma determinada dose de AZA ou 6-MP pode variar com a quantidade diária individual de purinas na dieta. A tiopurina que escapa ao metabolismo de primeira passagem, pela XO, entra na circulação e a sua inativação ocorre predominantemente através da metilação pela TPMT nas células sanguíneas e no fígado. Além disso, a atividade da XO varia entre populações e sexo (Moon; Loftus, 2016). A deficiência da enzima XO decorrente de variantes genéticas afeta 3% a 5% dos americanos, de 8% a 9% dos europeus, e até 17% dos asiáticos (Peter et al., 2024).

A atividade XO pode ter um impacto significativo na resposta e toxicidade de um indivíduo à AZA, sendo relatadas a existência de diferenças interindividuais na atividade desta enzima. Apesar disso, como a oxidação do 6-MP é significativamente influenciada por muitos outros fatores como ingestão dietética de purinas, dose de tiopurina e medicamentos complementares, a medida da atividade XO parece não ser um determinante da oxidação real da tiopurina, não se constituindo em um marcador útil para o monitoramento da terapia com tiopurina na DII (Moon; Loftus, 2016). Importante ressaltar que a deficiência completa de XO causa toxicidade grave com dose completa de AZA, mas a influência da faixa de atividade

normal de XO na eficácia clínica da terapia com tiopurina permanece desconhecida (Ding et al., 2021).

Outra enzima envolvida na metabolização da AZA é a enzima hipoxantina-guanina fosforribosil-transferase (HPRT ou HGPRT), que catalisa a transferência reversível do radical 5'-fosforribosil do PRPP para uma base púrica, guanina ou hipoxantina, formando um nucleosídeo monofosfato: guanosina monofosfato (GMP) ou inosina monofosfato (IMP), respectivamente (Tabela 1). Na presença de pirofosfato, a enzima HPRT também catalisa a hidrólise de IMP e GMP, embora esta reação inversa seja muito menos favorecida (Da Rocha; Burbanos, 2015).

O gene HPRT1 codifica a enzima HPRT e é um dos genes mais bem caracterizados do genoma humano, principalmente pelas consequências clínicas da deficiência da proteína por ele codificada. Localizado no braço longo do cromossomo X (banda Xq26.1) ele é constituído por cerca de 40,5 kb e apresenta nove éxons. Observa-se a expressão do gene HPRT1 em uma grande variedade de tecidos (Da Rocha; Burbanos, 2015).

A variação interindividual na atividade do HPRT pode ser uma razão potencial para a interferência na resposta terapêutica e nos efeitos adversos da AZA em pacientes com DII submetidos ao tratamento com tiopurina. Um estudo de espectro genético mutacional no HPRT descobriu que as mutações se distribuem por todo o gene (Moon; Loftus, 2016). A deficiência da enzima HPRT decorrente de variantes genéticas afeta 1% dos europeus e asiáticos, e até 16% dos americanos (Peter et al., 2024). É possível que muitas destas mutações possam influenciar a atividade da enzima HPRT. Existem dados escassos sobre a relação entre a atividade da HPRT e os efeitos adversos relacionados com a tiopurina em doentes com DII (Moon; Loftus, 2016).

Tabela 1 - Gene, polimorfismo, troca de base nitrogenada, atividade normal enzimática e a influência do polimorfismo na atividade enzimática e na concentração dos metabólitos da AZA

Gene	SNP	Troca de Base Nitrogenada	Atividade Normal Enzimática	Atividade Enzimática Polimorfismo e Metabólitos
TPMT	*1/*2	238G>C	Produz 6-MMP (sem efeito farmacológico)	TPMT normal ou ↑, 6-MMP ↑, 6-TGN ↓ ou normal
	*1/*3A	460G>A e 719A>G		
	*1/*3B	460G>A		TPMT ↓, 6-MMP ↓, 6-TGN ↑
	*1/*3C	719A>G		
ITPA	rs 9101	224G>A	Reduz 6-TITP (tóxico) e aumenta 6-TIMP	ITPA normal ou ↑, 6-TGN ↑
	rs 8362	138G>A		ITPA ↓, 6-TITP ↑, 6-TIMP ↓, 6-TGN ↓
	rs 1127354	94C>A		
	rs 7270101	21A>C		
HPRT	rs 1468266	319T>A	Produz 6-TGN (efeito farmacológico)	HPRT normal ou ↑, 6-TGN ↑ HPRT ↓, 6-TGN ↓
	rs 4407290	837G>A	Produz 6-TU (inativo)	XO/XDH normal ou ↑, 6-TU ↑
rs 17323225	1936T>C			
XO/XDH	rs 1884725	3030G>A		XO/XDH ↓, 6-TU ↓, 6-TGN ↑
	rs 2295475	2211G>A		
	rs 17011368	2107T>C		

Nota: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; AZA: azatioprina; TPMT: tiopurina metiltransferase; 6-MMP: metabólito 6-metil mercaptopurina; 6-TGN: metabólito nucleotídeos 6-tioguanina; AZA: azatioprina; ITPA: inosina trifosfatase; 6-TITP: metabólito 6-tioinosina trifosfato; 6-TIMP: metabólito 6-tioinosina monofosfato; HPRT: hipoxantina fosforribosil transferase; XO/XDH: xantina oxidase/xantina desidrogenase; 6-TU: 6-ácido tiúrico.

Fonte: Batra, et al. (2023). Elaborado pela autora (2024).

Diante do exposto, nota-se que as informações farmacogenética desempenham um papel importante na personalização do tratamento com tiopurinas, identificando variantes genéticas que afetam a atividade enzimática e se associam a efeitos adversos, incluindo a mielossupressão. Essas variações genéticas podem constituir-se em importantes preditores da eficácia e da segurança no tratamento da DII (Moon; Loftus, 2016).

2.5 MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA AZATIOPRINA

A monitorização dos níveis intraeritrocitários de 6-TGN é de grande aplicabilidade para o gerenciamento de DII, em pacientes submetidos à terapia com AZA, uma vez que podem identificar a dose ideal para maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade (Andoh et al., 2008; Beaugerie et al., 2020). Estudos iniciais que apoiam a dosagem de tiopurina com base no peso corporal foram realizados em um momento em que a monitorização dos níveis dos metabólitos de tiopurina não estava disponível. Desde então, vários estudos relataram uma correlação fraca entre a dose baseada em peso e a concentração de 6-TGN, sugerindo que a

variabilidade individual no metabolismo do fármaco é mais importante do que a escolha da dose por kg (Eltantawy et al., 2023; Lee et al., 2022; Wilson et al., 2021).

Com isso, a monitorização terapêutica das tiopurinas permite a individualização da dose do medicamento, ao contrário da dose padronizada em miligramas do fármaco por massa corporal do paciente (mg/kg). Além disso, possibilita a adequação dos níveis dos metabólitos ativos da AZA, os 6-TGN, à faixa terapêutica e à manutenção das concentrações destes metabólitos em níveis adequados, reduzindo a prevalência de eventos adversos e toxicidade (Pacheco Neto, 2010; Ribeiro et al., 2022; Ribeiro et al., 2023).

É importante caracterizar o perfil genético do paciente para o monitoramento terapêutico de fármacos (MTF), que é utilizado para quantificar os metabólitos das tiopurinas (6-TGN e 6-MMP) e correlacioná-los com a resposta terapêutica e eventos adversos. Esse monitoramento pode ser empregado para aumentar a eficácia clínica, individualizar o tratamento e reduzir a toxicidade associada à AZA (Singh et al., 2020; Yao et al., 2021).

Nossa hipótese é de que polimorfismos em enzimas relacionadas ao metabolismo da AZA podem influenciar nas quantidades de metabólitos alterando a farmacocinética e o desenvolvimento e sinais da doença, podendo ter um impacto na terapêutica de pacientes atendidos no HU/CAS, uma vez que hipotetizamos que a frequência de polimorfismos nesses pacientes é alta, conforme dados de outros locais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre polimorfismos em genes relacionados à presença de metabólitos das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conduzir uma revisão sistemática da literatura para investigar a influência dos polimorfismos genéticos na alteração dos níveis sanguíneos dos metabólitos das tiopurinas, bem como sua resposta terapêutica e adversa.

- Aplicar método cromatográfico na quantificação dos metabólitos da azatioprina (6-TGN e 6-MMP).

- Genotipar e determinar a frequência dos alelos e genótipos para polimorfismos nos genes da TPMT, ITPA, XO e HPRT em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa, atendidos pelo Hospital Universitário da UFJF.

- Avaliar os efeitos terapêuticos e adversos da AZA e sua correlação com as concentrações intraeritrocitárias de 6-MMP e 6-TGN e a variabilidade genética em pacientes com DII.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Foi realizado um estudo observacional do tipo transversal, com coletas de amostras sanguíneas e de dados clínicos que se iniciaram em agosto de 2016, no qual foram incluídos pacientes diagnosticados com DII, atendidos pelo Centro de DII do Hospital Universitário HU/CAS-UFJF, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos, em tratamento com AZA há pelo menos 3 meses, período suficiente para avaliar adequadamente o impacto da AZA no controle da doença e na segurança do paciente. Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo A)

Os critérios de exclusão do estudo foram pacientes com DII que não estavam em tratamento com AZA, pacientes que apresentam reação de hipersensibilidade prévia a AZA, pacientes gestantes ou nutrizes; internados; etilistas crônicos; e que não apresentaram entendimento do questionário aplicado ou que não quiseram preencher o TCLE.

A pesquisa foi submetida e registrada na Plataforma Brasil em 18/03/2016 (CAAE 54335416.3.0000.5133 - versão 2) e aprovada em 30/06/2016 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário - UFJF / MG (CEP HU-UFJF) sob o número de parecer 1.633.090 (Anexo B) e em 29/09/2017 (CAAE 77867417.4.0000.5147 - versão 7) e aprovado em 30/06/2020 sob o número 4.860.618 (Anexo B). Os pacientes selecionados assinaram o TCLE, manifestando concordância da participação na pesquisa.

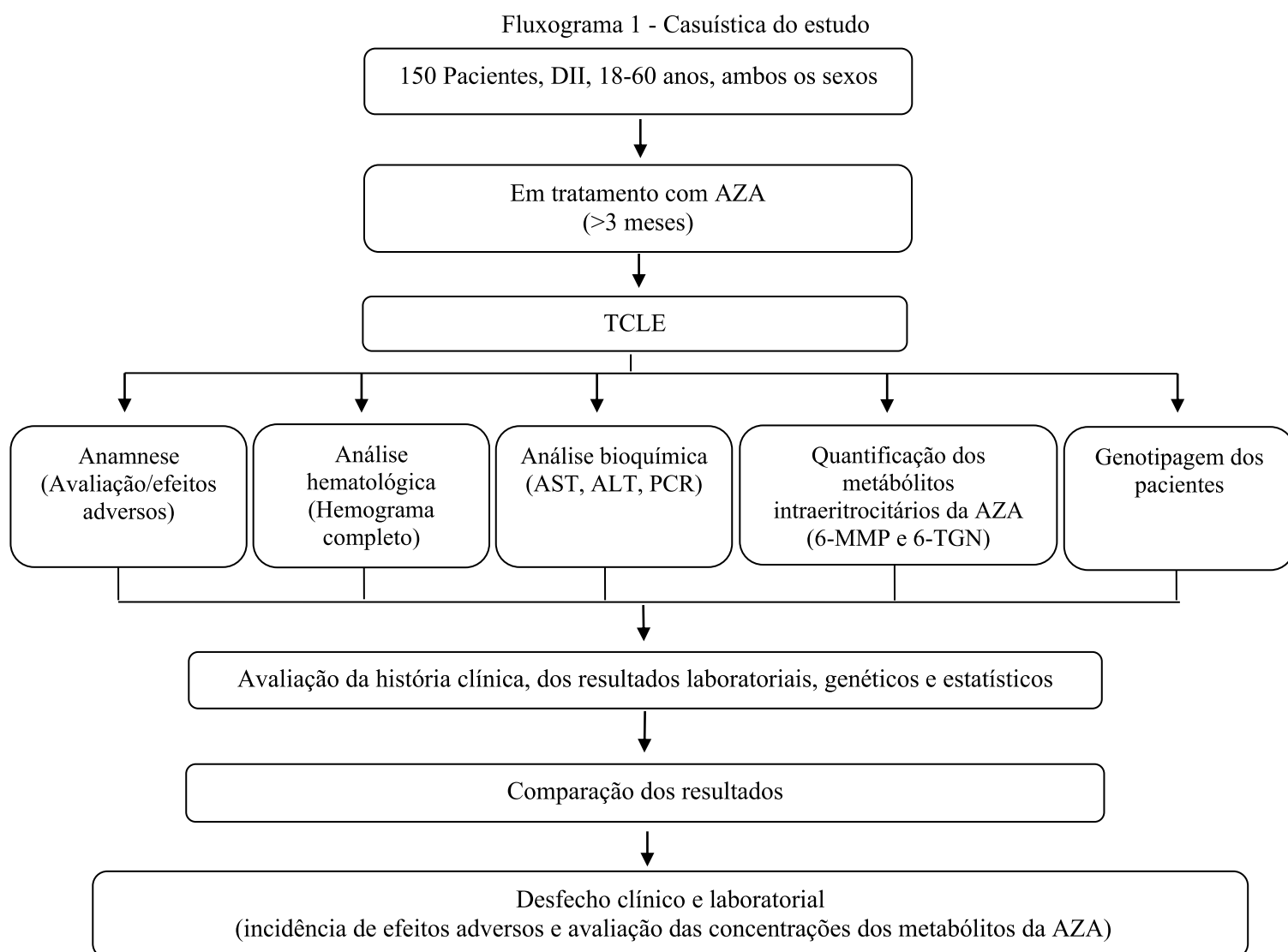
Os riscos envolvidos na pesquisa consistiram em risco mínimo associado à coleta de uma quantidade pequena de sangue, sem risco de contaminação, podendo ter ocorrido um pequeno desconforto na hora da coleta. Não houve risco adicional em relação ao tratamento com os medicamentos.

Durante as coletas de amostras de sangue, o pesquisador colaborador aplicou os questionários clínicos simples e estruturado contendo dados do diagnóstico da DII, como a duração da doença, localização e comportamento da doença, história de cirurgias prévias (enterectomia ou colectomia parcial), atividade da doença (índice de *Harvey-Bradshaw* - DC e índice de *Truelove and Witts* - RCU, e PCR).

Foram coletadas amostras sanguíneas (cerca de 10 mL) de todos os pacientes participantes, no laboratório de análises clínicas do HU/CAS, para as determinações do perfil hepático (TGO/AST (transaminase glutâmico-oxalacética/transaminases aspartato aminotransferase), TGP/ALT (transaminase glutâmico-pirúvica/alanina aminotransferase)), quantificações da PCR e para avaliações hematológicas (hemograma e leucograma). Além das

análises bioquímicas e hematológicas, foram realizadas as quantificações dos metabólitos intraeritrocitários da AZA (6-MMP e 6-TGN) no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE – ICB/UFJF). Utilizando as mesmas amostras de sangue, foi extraído o material genético (DNA genômico, DNAg) de cada participante, no Laboratório de Habilidades em Farmacologia Clínica (ICB/UFJF), para análise dos polimorfismos nas enzimas estudadas.

Os resultados bioquímicos, hematológicos e genotipagem dos pacientes foram interpretados, avaliados e comparados entre si e com estudos publicados para observação do desfecho clínico e laboratorial da AZA, da associação com alopurinol, dos efeitos adversos e das possíveis alterações nas concentrações dos metabólitos intraeritrocitários da tiopurina, correlacionando com a variabilidade genética individual dos pacientes (Fluxograma 1).



Nota: DII: Doença inflamatória intestinal; AZA: Azatioprina, TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; AST: transaminases aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, PCR: quantificações da proteína C-reativa, 6-MMP: 6-metilmercaptopurina, 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4.2 APLICAÇÃO DOS QUESTIONÁRIOS E ANAMNESE DO PACIENTE

Os questionários aplicados (Anexo C) constituem de índices clínicos utilizados mundialmente para avaliação da atividade da DC e RCU. São questionários simples, com questões sobre bem estar do paciente, ocorrência de dor abdominal e informações sobre complicações e cirurgias. Simultaneamente, os pacientes foram questionados sobre possíveis efeitos adversos do tratamento com AZA para complementação das informações já coletadas (Best, 2006).

Os pacientes foram considerados como apresentando DII em atividade quando o IHB foi ≥ 5 , e de acordo com o número de evacuações líquidas/dia e presença de sangue de acordo com a ocorrência de anemia conforme o índice de *Truelove and Witts*, do contrário, foram considerados como tendo DII em remissão. Além disso, foi feito o registro, durante as entrevistas, da presença ou não de sintomas sugestivos de eventos adversos à AZA como dor abdominal, febre, náuseas, vômitos, mialgia, adinamia, fadiga e artralgia (Vermeire et al., 2010).

4.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA SANGUÍNEA

Para a realização das coletas sanguíneas, os pacientes foram previamente orientados quanto à tomada do medicamento (AZA), onde a mesma não foi suspensa nem modificada para realização do estudo, somente nos casos de orientação médica. Nos casos onde houve a suspensão do tratamento, os pacientes comunicaram ao pesquisador colaborador, sendo os mesmos, excluídos do estudo.

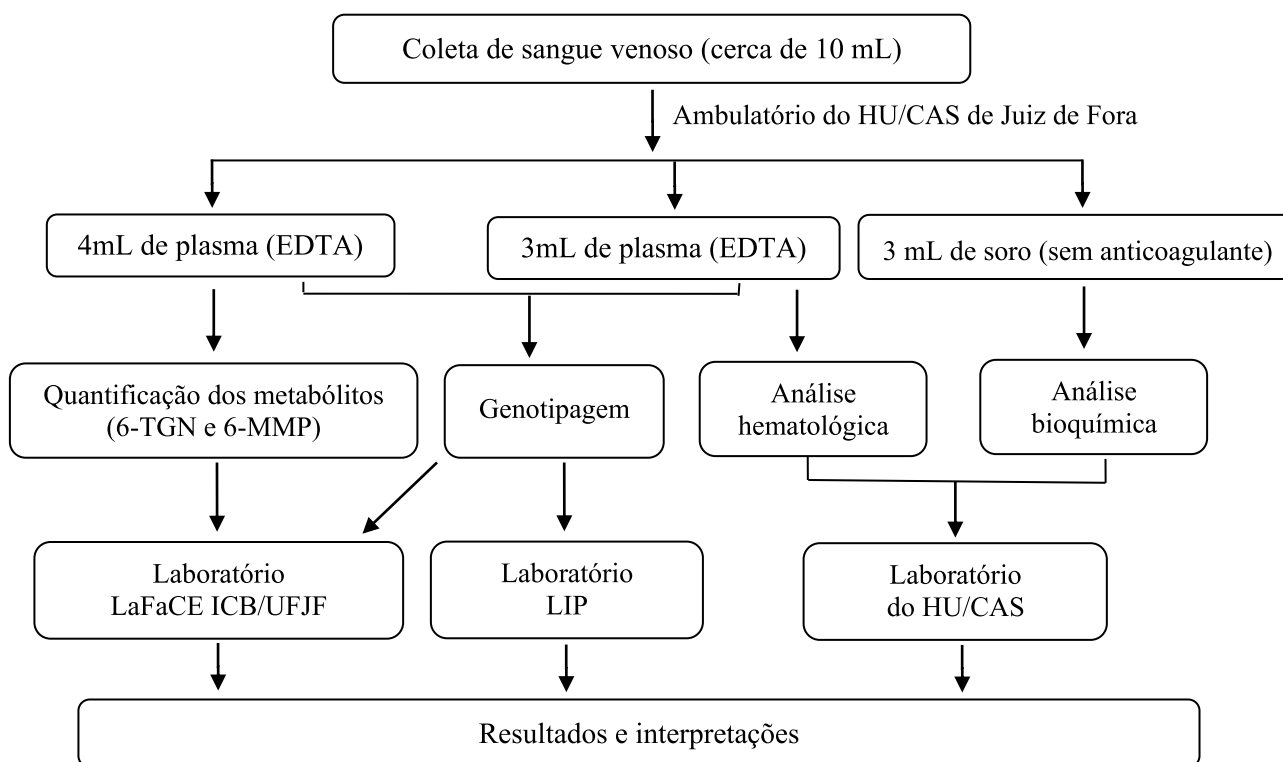
A coleta ocorreu no ambulatório do Hospital Universitário HU/CAS de Juiz de Fora. Foram coletadas amostras de sangue venoso (acesso em veia mediana do braço e antebraço) e foram distribuídos em três tubos, dois tubos de coleta com anticoagulante EDTA para a realização das análises hematológicas, genotipagem e quantificação dos metabólitos do fármaco AZA e em um terceiro tubo, sem anticoagulante, para as análises bioquímicas (Fluxograma 2) (Pacheco Neto, 2010).

Os resultados das análises bioquímicas, hematológicas e dos metabólitos de cada paciente foram avaliados e comparados de modo a observar o desfecho clínico e laboratorial da terapia com AZA e da associação (AZA/alopurinol) quanto à possível resolução dos efeitos adversos e ao resgate terapêutico de eficácia da AZA, além da verificação de possíveis alterações nas concentrações dos metabólitos intraeritrocitários da tiopurina, baseando nas doses dos fármacos individualizadas para os pacientes e nos genótipos analisados no estudo.

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS

Amostras de cada paciente foram encaminhadas para o laboratório do HU/CAS para a realização das análises bioquímicas, realizadas conforme técnicas de rotina no Laboratório de Análises Clínicas do HU. As quantificações bioquímicas das transaminases (aspartato aminotransferase (TGO/AST) e alanina aminotransferase (TGP/ALT)), a determinação do perfil hepático e quantificação da PCR para avaliação do processo inflamatório (doença em remissão ou em atividade) foram realizadas utilizando amostras sanguíneas armazenadas nos tubos sem anticoagulante. As avaliações hematológicas (Hemogramas) foram realizadas com as amostras armazenadas em presença do anticoagulante EDTA.

Fluxograma 2 - Coleta de amostras sanguíneas para a pesquisa



Nota: AZA: Azatioprina, EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina, 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina, LaFaCE ICB/UFJF: Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental – Instituto de Ciências Biológicas, LIP: Laboratório Integrado de Pesquisa – Instituto de Ciências Biológicas (ICB); HU/CAS: Hospital Universitário Centro de Atenção à Saúde.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4.5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA AZATIOPRINA

Amostras coletadas e acondicionadas em tubos com anticoagulante EDTA foram encaminhadas para o laboratório LaFaCE-ICB/UFJF (Laboratório de Farmacologia Clínica e

Experimental), para a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA (6-MMP e 6-TGN), utilizando metodologia cromatográfica desenvolvida e validada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, acoplado ao detector ultravioleta (CLAE-UV) (Apêndice A) (Ribeiro et al., 2022). Através da quantificação destes metabólitos, foi possível avaliarmos a correlação entre os mesmos com a ocorrência de efeitos adversos nos pacientes em tratamento com a AZA.

4.5.1 Coleta e Preparo das Papas de Hemácias (Matriz/Branco)

Para a preparação da matriz ou “branco”, utilizou-se amostras de sangue de voluntários que não estavam em terapia com AZA, coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e centrifugadas, à velocidade de 2900 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente (18 a 25 °C), conforme procedimento interno (SBPC/ML, 2014).

O plasma, juntamente com os leucócitos, plaquetas e a camada superior de eritrócitos foram removidos com auxílio de pipetas. As amostras foram lavadas três vezes com solução salina de cloreto de sódio a 0,9%, repetindo-se entre as lavagens as condições de centrifugação supracitadas, conforme procedimento interno, para obtenção das papas de hemácias. Depois desse processo, as diferentes papas de hemácias foram misturadas formando um *pool* ou branco, que foi utilizado para o preparo dos calibradores e dos controles de qualidade.

4.5.2 Coleta e Preparo das Amostras dos Pacientes

Foram coletadas e utilizadas amostras de sangue dos pacientes com DII em terapia com AZA, atendidos pelo Centro de DII do Hospital Universitário HU/CAS-UFJF, que aceitaram participar da pesquisa. O procedimento compreendeu a obtenção das amostras até o processo de lavagem e da papa de hemácia de cada paciente, seguindo a técnica descrita no item 4.5.1 e esquematizado no fluxograma 3.

Uma alíquota de 200,0 µL de cada amostra foi separada e transferida para um microtubo de 1,5 mL, a ela foram adicionados 200,0 µL de solução salina para diluição e realização do procedimento de contagem de eritrócitos (RBC), no Setor de Hematologia do laboratório do HU/CAS em contador hematológico automatizado. O restante das amostras (papa de hemácias) de cada paciente foi imediatamente armazenado em microtubo de 1,5 mL e congelado (-15 a -20 °C) até o momento das análises (SBPC/ML, 2014).

4.5.3 Tratamento das Amostras (Matriz/Branco e dos Pacientes)

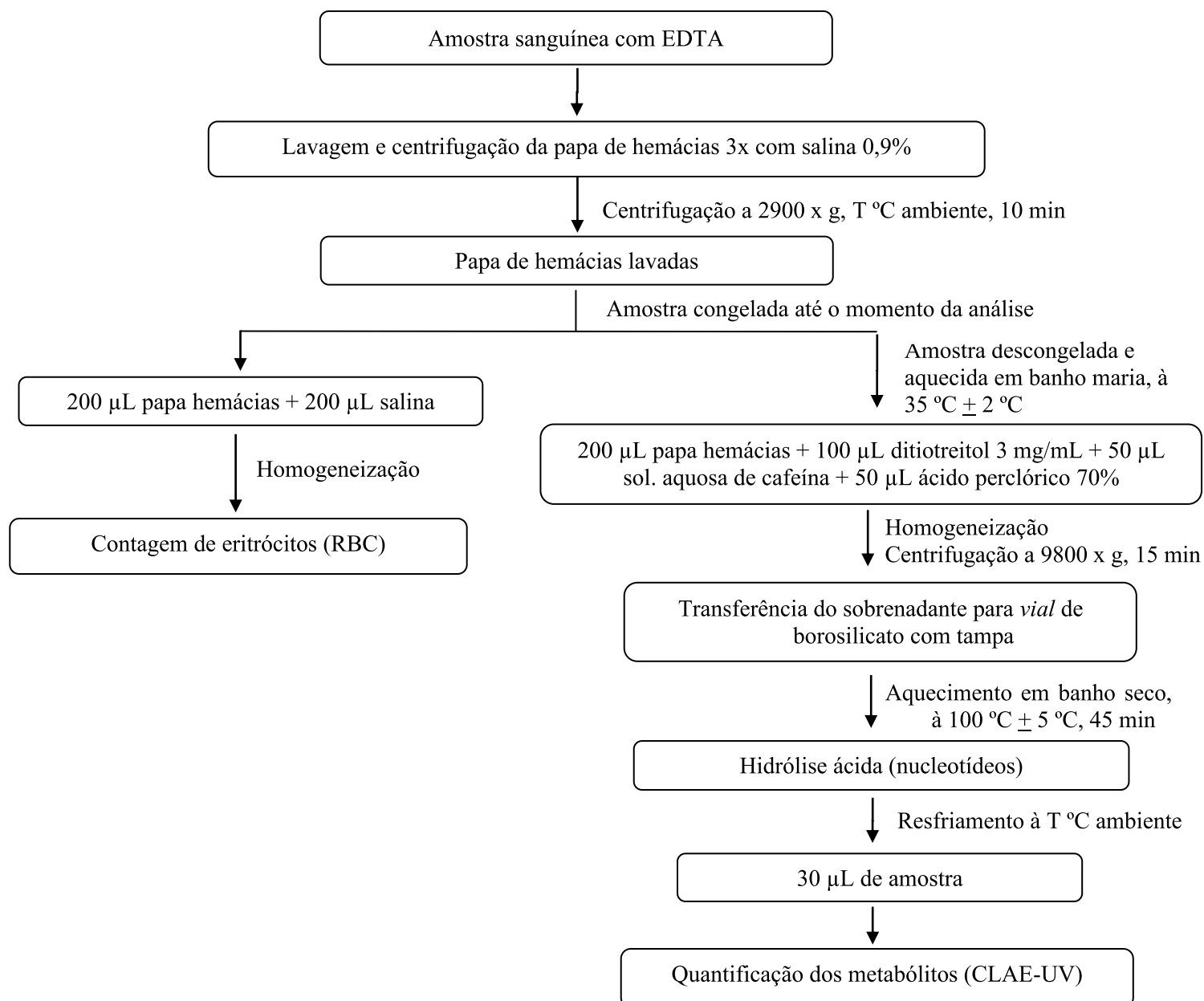
Após descongelamento e homogeneização das amostras, as papas de hemácias, de cada paciente e matriz, foram aquecidas em banho-maria à temperatura de 35 °C. De cada amostra, 200,0 µL dos eritrócitos lavados foram transferidos para outro microtubo, utilizando ponteiros aquecidas em banho-maria à temperatura de 35 °C. Nestas alíquotas, foram adicionados 100,0 µL de solução de ditioneitol a 3 mg/mL, 50,0 µL de solução aquosa de Cafeína (padrão interno) 4,0 µg/mL e 50,0 µL de ácido perclórico 70% (v/v), para a realização da desproteinização. Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação a 9800 x g, por 15 minutos, em temperatura ambiente (18 a 25 °C) (Hawwa et al., 2009; Oliveira et al., 2004; SBPC/ML, 2014).

O sobrenadante foi retirado e transferido para um *vial* de borosilicato com tampa e aquecido em banho seco à 100°C + 5,0°C, por 45 minutos para realização completa da hidrólise ácida dos nucleotídeos em suas bases livres. Depois de resfriada à temperatura ambiente (21 a 23 °C), com o auxílio de uma pipeta, a amostra foi acondicionada em *vial* de borosilicato com insert de 200,0 µL para a quantificação em CLAE-UV, com um volume de injeção de 30,0 µL (Fluxograma 3).

4.5.4 Quantificação dos Metabólitos 6-TGN e 6-MMP

Para eluição e identificação dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP foi utilizada como fase móvel solução tampão fosfato de potássio monobásico pH \cong 3, acetonitrila e metanol, com eluição por gradiente e fluxo de 1,0mL/min. A fase estacionária utilizada foi a coluna de fase reversa Supelcosil[®] LC18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) com a temperatura do forno da coluna mantida em 40 °C. As leituras dos analitos feitas em 342 nm e 291 nm pelo detector duplo canal Ultravioleta-Visível WATERS[®] 2489 (Fluxograma 3).

Fluxograma 3 - Preparo das amostras e quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da Azatioprina



Nota: EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético, g: força g, T °C: temperatura em Celsius.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4.6 GENOTIPAGEM DOS PACIENTES

Para realização das análises de genotipagem, foi realizada uma coleta por paciente de sangue venoso em tubo com anticoagulante EDTA. O material foi centrifugado à velocidade de 2900 x g por 10 minutos, conforme a técnica descrita no item 4.5.1. A camada leucocitária (*buffy coat*) foi removida com auxílio de uma micropipeta e transferida para microtubo de 1,5 mL, devidamente identificado. O material foi encaminhado para o laboratório LaFaCE -

ICB/UFJF, sendo mantido em armazenamento a aproximadamente -20 °C até extração do DNA genômico (gDNA).

4.6.1 Extração de DNA

O gDNA foi isolado da camada leucocitária utilizando um método comercial, Qiam DNA *Blood mini kit* (Qiagen®, Düsseldorf, Germany), de acordo com instruções do fabricante. Foram adicionados aos microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados para cada paciente, 20 µL de proteinase K (proteinase Qiagen), 200 µL de creme leucocitário do paciente (amostra em temperatura ambiente – 15°C a 25°C) e 200 µL de solução de lise celular. Essa solução foi agitada em vórtex por 15 segundos e incubada a 56 °C por 30 minutos, em banho maria.

Decorrido o tempo, as amostras foram brevemente centrifugadas para remoção de gotículas da tampa. Foram adicionados em cada microtubo, 200 µL de etanol 100%, misturando-se por agitação em vórtex por 15 segundos. Novamente, após breve centrifugação, essa solução foi transferida cuidadosamente para uma coluna de extração contendo sílica e acoplada a um microtubo de 2,0 mL, de modo a evitar molhar as bordas.

Foi realizada nova centrifugação a 11.780 x g, por 5 minutos. O tubo coletor contendo o líquido foi descartado em local apropriado. A coluna contendo gDNA fixado foi transferida para um novo tubo coletor de 2,0 mL e foram adicionados 500 µL de solução de lavagem 1 à coluna, sem molhar as bordas. Foi novamente centrifugado a 11.780 x g, por 5 minutos. O tubo coletor foi descartado e novo tubo coletor de 2,0 mL foi acoplado à coluna. Foram adicionados 500 µL de solução de lavagem 2 com os mesmos cuidados de não molhar as bordas, e então centrifugados a 13.740 x g por 3 minutos. Novamente, o tubo coletor foi descartado e a coluna foi acoplada à um microtubo de 1,5 mL novo identificado com o nome/número da amostra.

A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril. Cuidadosamente, a coluna foi aberta e foram adicionados 100 µL da solução de eluição. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada à 9.800 x g por 3 minutos. A coluna foi descartada e o líquido eluído no microtubo corresponde à fração contendo o DNA extraído. Este foi estocado em refrigerador à - 20°C até a etapa de genotipagem.

A determinação da pureza e quantificação do gDNA foi realizada por espectrofotometria (*Nanodrop Lite Quick*, Thermofisher), medindo-se a absorbância a 260/280 nm, no Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP – ICB/UFJF).

4.6.2 Genotipagem para os Polimorfismos nos Genes da TPMT, ITPA, XO e HPRT

A técnica de genotipagem dos alelos dos genes TPMT, ITPA, XO e HPRT, selecionados para a pesquisa, seguiram o protocolo “TaqMan® SNP *Genotyping Assays Protocol*” da Applied Biosystems®. Os SNPs selecionados para esse estudo são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Gene, referência do SNP, troca de base nitrogenada, modificação do aminoácido e identificação dos ensaios utilizados

Gene	Referência do SNP	Troca de Base Nitrogenada	Modificação do aminoácido	Ensaio (Thermo Fisher)
TPMT	rs 1800462	238G>C	Ala80Pro	C__12091552_30
	rs 1800460	460G>A	Ala154Thr	C__30634116__20
	rs 1142345	719A>G	Tyr240Cys	C__19567__20
ITPA	rs 9101	224G>A	-	C__11201764__1_
	rs 8362	138G>A	-	C__1272747__10
	rs 1127354	94C>A	Pro32Thr	C__27465000__10
	rs 7270101	21A>C	-	C__29168507__10
HPRT	rs 1468266	319T>A	-	C__8940525__10
XO/XDH	rs 4407290	837G>A	-	C__27930724__30
	rs 17323225	1936T>C	-	C__25603303__20
	rs 1884725	3030G>A	-	C__3279863__30
	rs 2295475	2211G>A	-	C__25473873__30
	rs 17011368	2107T>C	-	C__25472962__20

Nota: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; TPMT: tiopurina metiltransferase; ITPA: inosina trifosfatase; HPRT: hipoxantina fosforribosil transferase; XO/XDH: xantina oxidase/xantina desidrogenase. Fonte: Disponível no banco de dados da Rede Nacional de Farmacogenética (<https://www.refargen.org.br>) e no 1000Genomes database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Elaborado pela autora (2024).

Para todas as análises supracitadas, foi utilizada a técnica de fluorescência com sondas TaqMan® a partir de ensaios validados pela Thermo Fisher (Quadro 2). As sondas contêm corantes fluorescentes distintos e um par de iniciadores para Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real, qPCR, sendo capazes de detectar os alvos de SNPs específicos que se alinham exclusivamente com o genoma para proporcionar uma grande especificidade para o alelo de interesse. As sondas foram marcadas com fluoróforos distintos (VIC e FAM) para distinção dos dois alelos do SNP.

As amostras de gDNA foram diluídas para a concentração final de 2 ng/μL, sendo utilizado 4,5 μL dessa solução em cada poço de reação, com quantidade final aproximada de DNA de 10 ng por poço. Para cada reação, foram adicionados os seguintes itens ao Mix: 5 μL de TaqMan™ Genotyping MasterMix (Thermo Fisher®) e 0,5 μL do ensaio TaqMan (20 x). Para preparar o Mix, foi utilizado um microtubo de 1,5 mL. Em placas de PCR de 96 poços

(MicroAmp® Fast Optical, Thermo Fisher), foram adicionados 5,5 µL do mix/poço, 4,5 µL de solução de DNA (concentração de 2 ng/µL), com volume final de reação de 10 µL. Após cobertas com filme adesivo (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Thermo Fisher), as placas foram então centrifugadas a 1200rpm por 2 minutos e levadas para reação no equipamento *StepOne Plus Real Time* da ThermoFisher®. Foram consideradas ótimas as condições de amplificação na PCR em tempo real descritas no quadro 2. A análise genotípica dos polimorfismos foi realizada pelo programa *Allelic Discrimination* da Applied Biosystems®, no LIP – ICB/UFJF.

Quadro 2 - Condições de amplificação por qPCR

	Temperatura	Duração	Ciclos
Estabilização	60 °C	30 segundos	-
1º Estágio (Ativação da polimerase)	95 °C	10 minutos	-
2º Estágio (Desnaturação)	95 °C	15 segundos	40 ciclos
3º Estágio (Anelamento / Extensão)	60 °C	90 segundos	40 ciclos

Fonte: Adaptado do Kit TaqMan® Genotyping Master Mix (2010).

A partir da obtenção dos genótipos dos pacientes para cada um dos polimorfismos estudados, foram avaliadas as possíveis correlações desses com os valores sanguíneos dos metabólitos da AZA, bem como à resposta clínica ao tratamento com a tiopurina. Os resultados também foram avaliados quanto à terapia com AZA e terapias combinadas azatioprina / alopurinol (AZA/ALO), azatioprina / biológicos (AZA/BIO) e azatioprina / alopurinol / biológicos (AZA/ALO/BIO).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O critério de amostragem foi o de amostragem por conveniência. O número de sujeitos que compõem o espaço amostral foi definido utilizando dados de variabilidade de estudos semelhantes, os quais foram processados por meio do aplicativo G* Power 3.1.5 (Franz Faul, Universität Kiel, Germany).

Após a coleta, foi feita uma análise exploratória dos dados, incluindo normalidade e homocedasticidade, a fim de verificarmos qual o tratamento inferencial adequado.

Na análise descritiva, dados escalares foram apresentados como média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil. Dados ordinais foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, e dados categóricos foram apresentados como porcentagem.

Na análise inferencial, em virtude do desenho do experimento e dos objetivos do estudo, os dados escalares foram analisados através de métodos de análise de dados repetidos. O método escolhido dependeu da distribuição dos dados, sendo utilizada uma análise de variância de dados repetidos (r-ANOVA), teste-t pareado, teste não paramétrico de Mann-Whitney, correlação de Spearman. Em seguida, após a r-ANOVA ou o Friedman foram aplicados os testes post-hoc mais apropriados. Nas correlações entre a variável interveniente e variável preditora (variável independente), foi aplicado um modelo linear generalizado (ANCOVA), utilizando a variável interveniente como covariável, a fim de afastar qualquer viés de confusão. Diferenças na distribuição dos genótipos/alelos e desvios do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram avaliadas pelo teste do X^2 ou Teste Exato de *Fisher*, quando apropriado.

Nas inferências, o nível de significância adotado (erro tipo-I) foi de 5%. As análises foram feitas por meio do aplicativo jamovi project (2024) versão 2.5, Sydney, Austrália.

4.8 REVISÃO SISTEMÁTICA

Para a escrita da tese, foram selecionados artigos originais e de revisão, que permitiram a condução de uma revisão sistemática da literatura com a finalidade de investigar a influência dos polimorfismos genéticos na alteração dos níveis sanguíneos dos metabólitos das tiopurinas, bem como sua resposta terapêutica e adversa (Apêndice A)

5 RESULTADOS

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

5.1.1 Fontes de informações e estratégias de busca

Uma pesquisa da literatura médica foi realizada usando o MEDLINE, Scielo, Scopus, BVS Lilacs e biblioteca Cochrane, com estratégia de busca sem restrição de ano de publicação ou etnia, nos idiomas inglês, português e espanhol, incluindo artigos publicados até outubro de 2022. Apenas estudos originais publicados em formato de artigo com abordagem da influência dos polimorfismos genéticos da enzima TPMT na resposta terapêutica a tiopurinas em pacientes com DII foram incluídos (Apêndice A).

Foram contemplados ensaios clínicos controlados e randomizados, estudos multicêntricos retrospectivos ou prospectivos nos quais as tiopurinas foram usadas para tratamento de pacientes com DII, que abordassem as variações genéticas relacionadas à enzima TPMT. A estratégia de busca utilizou as palavras-chave: *polymorphism genetic, pharmacogenetic, drug effects, azathioprine, thiopurine, inflammatory bowel diseases*.

5.1.2 Processo de seleção

Para avaliar a relevância do tema, todos os artigos foram revisados de forma independente por três pesquisadores por meio da triagem de seus títulos e resumos. Uma segunda triagem confirmatória foi realizada utilizando o aplicativo Rayyan.

Os termos de busca foram construídos com base no PICOT, relacionados à doença de Crohn, colite ulcerativa, doenças inflamatórias intestinais, azatioprina, 6-mercaptopurina ou tiopurina, 6-metilmercaptopurina, 6-tioguanina, polimorfismo genético, variantes alélicas, análise farmacocinética, farmacogenético, mutações genéticas, genótipo, efeitos de drogas, terapia, agentes imunossupressores, reação adversa a medicamentos, monitoramento de metabólitos. Além disso, os termos de pesquisa foram combinados dentro do mesmo domínio usando 'OR' e entre o domínio usando 'AND'.

5.1.3 Avaliação de risco de viés

A avaliação de risco de viés dos estudos incluídos foi conduzida por dois revisores independentes. Com base no risco de viés, os estudos foram classificados com “baixo risco” “com algumas preocupações” (22 artigos não deixaram claro o tempo de acompanhamento dos pacientes ou tiveram sujeitos perdidos no seguimento provavelmente não introduzindo viés no estudo), “moderado risco” “com algumas preocupações” (14 artigos com um tempo de

acompanhamento dos pacientes pequeno ou tiveram taxa de acompanhamento em torno de 70-80% dos pacientes recrutados), e “alto risco” (4 artigos cujos estudos não eram cegos para as intervenções ou tiveram sujeitos perdidos no seguimento provavelmente introduzindo viés no estudo). A avaliação foi conduzida tanto para o estudo quanto para os desfechos primários.

5.1.4 Seleção e características dos estudos

Ampla estratégia de busca identificou 1134 estudos envolvendo polimorfismos genéticos relacionados à terapia medicamentosa com tiopurinas em pacientes com DII. A partir da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão definidos, foram excluídos, inicialmente, 662 artigos. Um total de 472 papers foram avaliados detalhadamente e, destes, 432 foram excluídos por motivos diversos, deixando 40 artigos elegíveis para inclusão.

A maioria dos estudos incluídos foram estudos de coorte (38 estudos, 95%), seguidos por estudos clínicos randomizados (2 estudos, 5%). Grande parte dos estudos foram conduzidos na Europa (Inglaterra (3), Holanda (3), Itália (3), Grécia (2), Eslováquia (2), Alemanha (1), Espanha (1)) e Ásia (Japão (6), Coreia (4), China (5)), seguidos dos Estados Unidos (3) e da Oceania (Nova Zelândia (2) e Austrália (1)).

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Foram recrutados 150 pacientes com DII, em uso de AZA, dos quais 60,0% eram mulheres. Dos pacientes com DII, 30 (20,0%) sofreram algum tipo de intervenção cirúrgica e 59 (39,3%) apresentam alguma complicação decorrente da DII ou do tratamento com tiopurinas. As características dos pacientes estão retratadas no quadro 3 e detalhadas no quadro 4 (Apêndice B).

Dos 150 pacientes, 68,0% estavam com a doença em remissão. Considerando o protocolo farmacoterapêutico, estavam recebendo tratamento em terapia com AZA ou em associação com alguma classe de medicamentos biológicos ou com alopurinol. No total, 33 pacientes (22,0%) apresentaram pelo menos um evento adverso relacionado à terapia com AZA durante o tratamento, incluindo artralgia, dor abdominal, enjoos/náuseas/vômitos, anemia, queda de cabelo, pele ressecada, lesões e manchas dentre outros. Além dos efeitos adversos citados, foram observadas alterações nas provas de função hepática; aumento da concentração da proteína C reativa (PCR), um indicador de atividade inflamatória aguda; dentre outras (Quadros 4, 5 e 6) (Apêndices B, C e D). As características da terapia com tiopurina estão descritas no quadro 3 e detalhadas no quadro 5 (Apêndice C).

Quadro 3 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes do estudo

Características		nº (%) dos pacientes (n=150)
Dados demográficos		
Idade (Anos)*	Mediana (IIQ)	46 (18 a 66)
	Média ± DP	43,6 ± 13,1
Sexo	Feminino	90 (60,0%)
	Masculino	60 (40,0%)
Grupo Racial	Branco	115 (76,7%)
	Não Branco	35 (23,3%)
Dados clínicos		
Doença Inflamatória Intestinal	Doença de Crohn	120 (80,0%)
	Retocolite ulcerativa	30 (20,0%)
Doença em remissão	Doença em remissão	102 (68,0%)
	Doença em atividade	48 (32,0%)
Características	Ileocolite	53 (35,3%)
	Fístula	42 (28,0%)
	Ileíte	41 (27,3%)
	Pancolite	30 (20,0%)
	Colite	24 (16,0%)
Fenótipo	Inflamatório	48 (32,0%)
	Estenosante	20 (13,3%)
Farmacoterapia		
	AZA	99 (66,0%)
	AZA+ ALO	9 (6,0%)
	AZA + biológicos	38 (25,3%)
	AZA + ALO + biológicos	4 (2,7%)
Dosagem (mediana e IIQ)	AZA	150 mg/dia (25-250mg/dia)
	AZA+ ALO	50 mg/dia (25-200mg/dia)
	AZA + biológicos	100 mg/dia (50-300mg/dia)
	AZA + ALO + biológicos	50 mg/dia (25-50mg/dia)
Queixas relatadas	Artralgia	42 (28,0%)
	Linfopenia	18 (12,0%)
	Dor abdominal (severa/intensa)	16 (10,7%)
	Anemia	12 (8,0%)
	Neutropenia	9 (6,0%)
	Leucopenia	4 (2,7%)
Dados laboratoriais		
Metabólitos** (Mediana e IIQ)	6-TGN	140 (4,5 - 2455,8)
	6-MMP	1011 (25,8 - 97800,2)

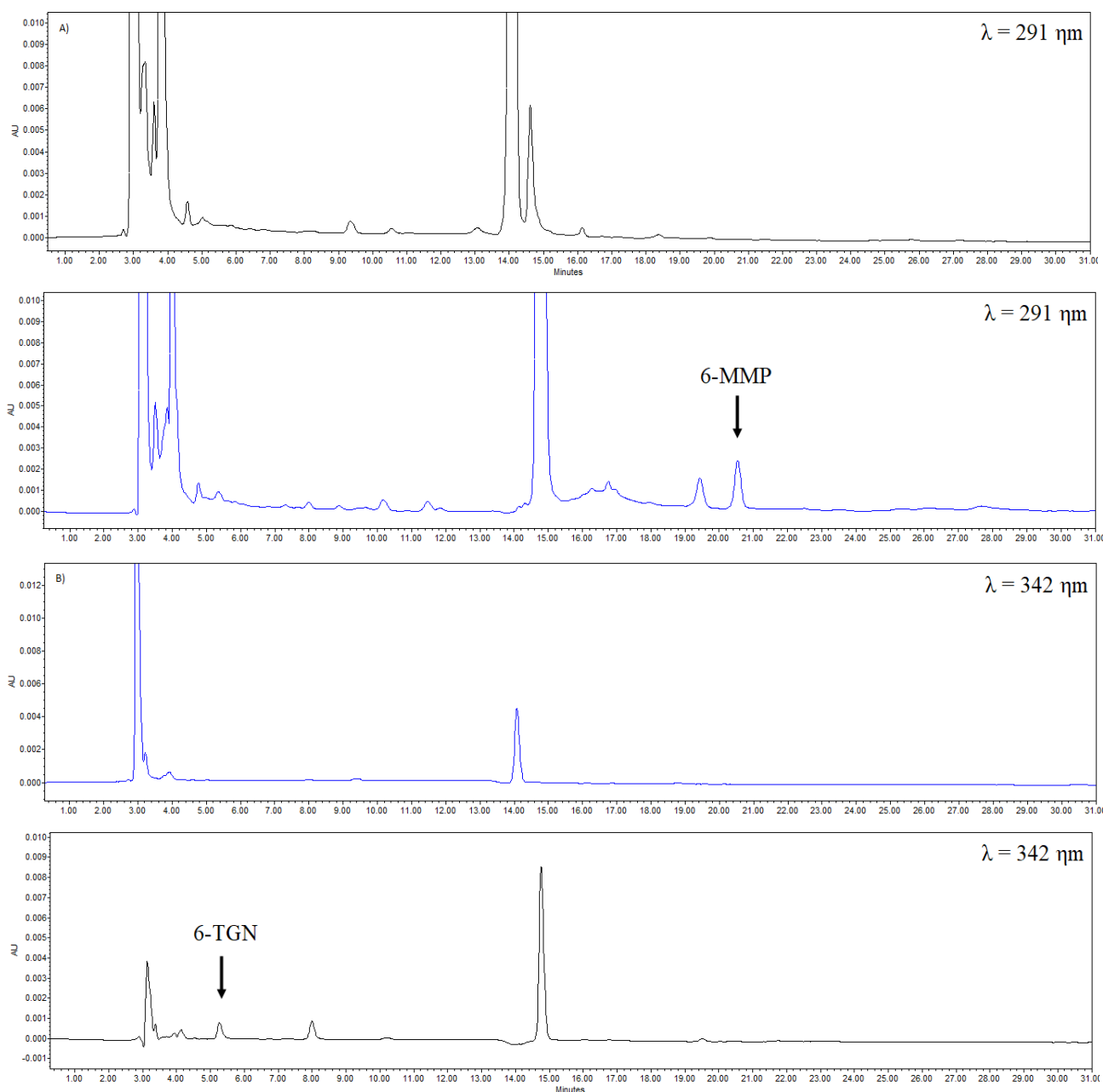
Nota: IIQ: intervalo interquartil; DP: desvio padrão; n: número absoluto; AZA: azatioprina; ALO: alopurinol; 6-TGN: 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptopurina. Resultados expressos em: *: anos; **: pmol/8x10⁸ eritrócitos

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.2.1 Análises de Amostras de Pacientes

Concentrações de 6-TGN e 6-MMP foram determinadas para os 150 pacientes do estudo, conforme metodologia (Ribeiro et al., 2022), com resultados variando de 4,5 a 2456,0 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para 6-TGN e de 25,8 a 97800,0 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para 6-MMP. As concentrações mediana de 140,0 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos (6-TGN) e 1011,0 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos (6-MMP), ambas dentro do intervalo terapêutico. Os cromatogramas de um dos paciente do estudo e da matriz biológica (eritrócitos) são mostrados na figura 6.

Figura 6 - Cromatogramas de um dos pacientes incluído no estudo e da matriz

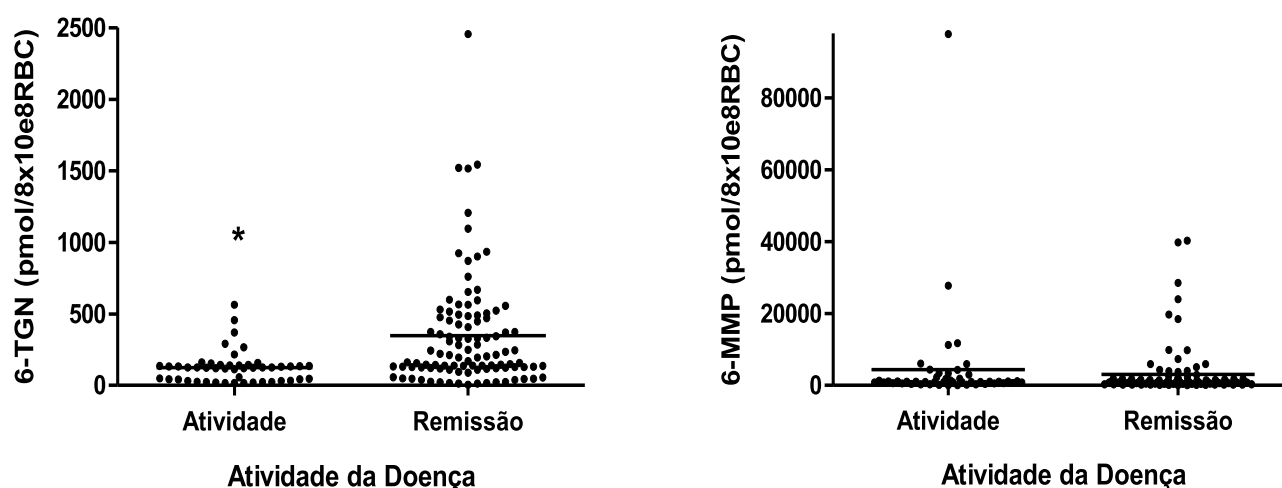


Nota: Condição cromatográfica: fase móvel: tampão fosfato:acetonitrila:metanol, eluição por gradiente, fluxo: 1 mL/min, temperatura: 40°C, injeção: 30 μL ; Cromatogramas da matriz (papa de hemácias) e de um paciente com (A) detecção do metabólito 6-MMP e (B) detecção do 6-TGN; λ : comprimento de onda.

Fonte: Ribeiro et al., 2022.

A avaliação dos pacientes com DII quanto à atividade ou remissão da doença, mostrou um aumento no valor da mediana do metabólito 6-TGN no grupo de pacientes com a doença em remissão (n=102 (68,0%) 207,5 pmol/8x10⁸ eritrócitos) em relação ao grupo com a doença em atividade (n=48 (32,0%) 125,8 pmol/8x10⁸ eritrócitos), com diferença estatística entre os grupos, evidenciando uma relação entre a remissão e o aumento das concentrações de 6-TGN (U de Mann-Whitney U=1332, p<0,001) (Gráfico 1 e Quadro 7). Em relação ao metabólito 6-MMP, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com a doença em remissão (n=102 (68,0%) 1050,6 pmol/8x10⁸ eritrócitos) e em atividade (n=48 (32,0%) 974,0 pmol/8x10⁸ eritrócitos) (U=2441, p=0,978).

Gráfico 1 - Avaliação das concentrações dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP em pacientes com doença em remissão (n=102) e em atividade (n=48) tratados com Azatioprina



Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina. Resultados expressos em mediana. Teste estatístico U de Mann-Whitney, p<0,001 (6-TGN) e p=0,978 (6-MMP).
Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Quadro 7 - Valores dos metabólitos relacionados à atividade ou remissão da DII

Atividade da Doença*		Metabólitos**				
		n	Média	DP	Mediana	IIQ
6-TGN	Doença em remissão	102	346,4	389,9	207,5	4,5 - 2455,8
	Doença em atividade	48	123,4	111,3	125,8	17,0 - 563,7
6-MMP	Doença em remissão	102	3047,3	6956,0	1050,6	25,8 - 40298,6
	Doença em atividade	48	4366,0	14484,5	974,0	36,8 - 97800,2

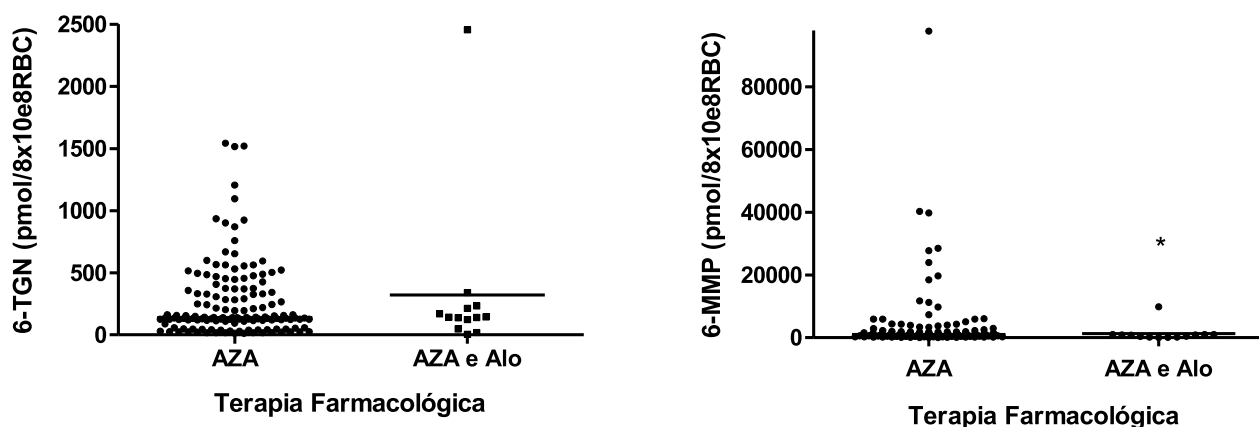
Nota: *Atividade da doença: de acordo com índice de *Harvey-Bradshaw* (≥ 5) e índice de *Truelove and Witts*; DII: doença inflamatória intestinal; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; **metabólitos expressos em pmol/8x10⁸ eritrócitos; n: número absoluto; DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Ao avaliar a atividade da doença com parâmetros hematológicos, observamos que houve diferenças estatísticas da leucometria global, do número de linfócitos e do número de plaquetas entre os grupos de pacientes com a doença em atividade e em remissão (leucometria global: 5908mm^3 versus 6925mm^3 , linfócitos: 1642mm^3 versus 1924mm^3 , plaquetas: 227.000mm^3 versus 253.500mm^3 , respectivamente) ($U=1828$, $p=0,012$; $U=1906$, $p=0,029$; $U=1783$, $p=0,007$).

A avaliação dos pacientes quanto à terapia com AZA ou terapia combinada com alopurinol 100mg, mostrou um aumento no valor da mediana do metabólito 6-MMP no grupo de pacientes com terapia com AZA ($n=137$; 91,3%; $1052,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) em relação ao grupo com a associação terapêutica ($n=13$; 8,7%, $802,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), havendo uma diferença estatisticamente significativa (U de Mann-Whitney $U=551$, $p=0,024$) e evidência da relação entre a terapia com alopurinol com diminuição das concentrações de 6-MMP (Gráfico 2 e Quadro 8). Tal evidência não foi observado com o metabólito 6-TGN (terapia com AZA, $n=137$; 91,3%; $139,4 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos; associação terapêutica, $n=13$; 8,7%, $143,4 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos; $U=853$, $p=0,805$).

Gráfico 2 - Avaliação das concentrações dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP quanto à terapia com Azatioprina ou terapia combinada com Alopurinol



Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: metabólito 6-metil-mercaptopurina; AZA: azatioprina; Alo: Alopurinol 100mg. Resultados expressos em mediana. Teste de Mann-Whitney, $p=0,805$ (6-TGN) e $p=0,024$ (6-MMP).

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Na interpretação dos demais resultados hematológicos e bioquímicos, não foram observadas diferenças estatísticas significativas com relação ao grupo em terapia com AZA ou terapia combinada AZA/ALO (Quadro 8) (Teste estatístico U de Mann-Whitney, $p>0,05$).

Quadro 8 - Valores dos metabólitos e dos parâmetros hematológicos relacionados à terapia com Azatioprina em pacientes com DII

Terapia	Mediana	Intervalo interquartil	Valor de p*
Azatioprina (n=137)			
6-TGN ^a	139,4	13,5 – 1542,8	0,805
6-MMP ^a	1052,8	25,8 – 97800,2	0,024
TGO/AST ^b	21,0	5,0- 87,0	0,758
TGP/ALT ^b	18,0	1,0 - 130,0	0,515
Leucometria global ^c	6340	2840 - 14750	0,413
Neutrófilos ^c	3647	1029 - 10730	0,754
Linfócitos ^c	1720	426 - 4759	0,894
Hemácias ^d	4,68	3,19 - 7,56	0,376
Hemoglobina ^e	13,9	7,1 - 21,5	0,093
Azatioprina associada ao Alopurinol 100mg (n=13)			
6-TGN ^a	143,4	4,5 – 2455,8	
6-MMP ^a	802,5	49,2- 9802,0	
TGO/AST ^b	21,0	13,0 - 106,0	
TGP/ALT ^b	18,0	12,0 - 67,0	
Leucometria global ^c	5718	2940 - 10700	
Neutrófilos ^c	4128	1808 - 7030	
Linfócitos ^c	1530	723 - 3113	
Hemácias ^d	4,49	2,93 - 6,67	
Hemoglobina ^e	12,7	10,5 - 18,2	

Nota: n: número absoluto; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; TGO / AST: transaminase glutâmico-oxalacética / transaminases aspartato aminotransferase; TGP / ALT: transaminase glutâmico-pirúvica / alanina aminotransferase. Resultados expressos em: ^a pmol/8x10⁸ eritrócitos; ^b U/L; ^c mm³ ou μ L; ^d milhões/mm³; ^e g/dL. *Teste estatístico U de Mann-Whitney.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

5.3 PERFIL GENÉTICO DOS PACIENTES TRATADOS COM AZA

As frequências genotípica e alélica na população estudada para 13 polimorfismos nos genes da TPMT, ITPA, HPRT e XO/XDH são descritas na tabela 3. Os polimorfismos avaliados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada, exceto para o SNP rs 1468266 do gene HPRT. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é um princípio genético que afirma que, em uma população ideal (onde não há mutação, seleção, migração e onde o acasalamento é aleatório), as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes de geração para geração. Se uma população está em EHW, as frequências genotípicas podem ser previstas com base nas frequências alélicas (Rodriguez; Gaunt; Day, 2009; Wigginton; Cutler; Abecasis, 2005).

Esse desvio para o SNP rs1468266 pode indicar que este polimorfismo está sob alguma pressão seletiva, ou pode refletir outros fatores como estrutura populacional ou problemas técnicos na coleta de dados (populações pequenas, migração ou fluxo gênico, ou erros de genotipagem ou estratificação populacional).

Tabela 3 - Frequência dos SNPs para os genes da TPMT, ITPA, HPRT e XO/XDH em pacientes com DII tratados com AZA atendidos no Hospital Universitário da UFJF

Gene/SNP	Genótipos	N	Frequência		EHW*
			Relativa ^a	Alelos	
TPMT (rs1800462/ rs1800460/ rs1142345)	*1/*1	137	91,3 %	TPMT*1 – 0,913	0,03
	*1/*2	4	2,7 %	TPMT*2 – 0,027	
	*1/*3A	4	2,7 %	TPMT*3A – 0,027	
	*1/*3C	5	3,3 %	TPMT*3C – 0,033	
ITPA rs9101					
(ITPA 224G>A)	GG	97	64,7 %	G – 0,76 A – 0,24	1,39
	AG	50	33,3 %		
	AA	3	2,0%		
ITPA rs8362					
(ITPA 138G>A)	GG	74	49,3 %	G – 0,67 A – 0,33	0,10
	AG	64	42,7 %		
	AA	12	8,0 %		
ITPA rs1127354					
(ITPA 94C>A)	CC	142	94,7 %	C – 0,80 A – 0,20	0,11
	AC	8	5,3 %		
ITPA rs7270101					
(IVS2c.124+21A>C)	AA	108	72,0 %	A – 0,94 C – 0,06	0,045
	AC	38	25,3 %		
	CC	4	2,7 %		
HPRT rs1468266					
	AA	8	5,3 %	T – 0,84 A – 0,16	14,35*
	AT	26	17,3 %		
	TT	116	77,3 %		
XO/XDH rs4407290					
	GG	146	97,3 %	G – 0,96 A – 0,04	0,03
	AG	4	2,7 %		
XO/XDH rs17323225					
	TT	141	94,0 %	T – 0,98 C – 0,02	0,14
	CT	9	6,0 %		
XO/XDH rs1884725					
	GG	97	64,7 %	G – 0,80 A – 0,20	0,16
	AG	48	32,0 %		
	AA	5	3,3%		
XO/XDH rs2295475					
	GG	91	60,7 %	G – 0,73 A – 0,27	0
	AG	47	31,3 %		
	AA	12	8,0 %		
XO/XDH rs17011368					
	TT	137	91,3 %	T – 0,95 C – 0,05	0,30
	CT	13	8,7 %		

Nota: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; N: número absoluto; ^a frequência alelica calculada; TPMT: tiopurina metiltransferase; ITPA: inosina trifosfatase; HPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase; XO/XDH: xantina oxidase ou xantina desidrogenase. *Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* considerando $p=0,05$; significativo se $X^2 \geq 3,84$.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Conforme apresentado na Tabela 3, 8,7% dos participantes do estudo possuem pelo menos uma das variantes alélicas da enzima TPMT, sendo que 3,3% dos pacientes apresentaram o genótipo TPMT*1/3C e nenhum paciente carregou o alelo TPMT*3B. No entanto, observou-se uma frequência elevada de polimorfismos nas enzimas ITPA (rs9101,

rs8362) e XO/XDH (rs1884725, rs2295475). A distribuição dos polimorfismos também foi analisada conforme a estratificação da população estudada pelos grupos raciais (Tabela 4), sem diferenças estatísticas observadas.

Quando os pacientes foram agrupados conforme a atividade da doença (em atividade ou remissão), de acordo com os resultados dos questionários, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na frequência dos polimorfismos da TPMT, ITPA, HPRT e XO/XDH (Tabela 4). Estes resultados podem ter ocorrido pois a frequência alélica é baixa e devido ao pequeno número amostral ($n < 30$) encontrado dos polimorfismos para TPMT, ITPA, HPRT e XO/XDH na população estudada (Tabela 4).

Tabela 4 - Associação dos genótipos relacionados ao grupo racial e quanto à atividade da doença

	Grupo racial		valor p*	DII		valor p*
	Branco	Não branco		Remissão	Atividade	
TPMT						
Selvagem	106 (70,7%)	31(20,7%)	0,521	93 (62,0%)	44 (29,3%)	0,833
Variante	9 (6,0%)	4 (2,7%)		9 (6,0%)	4 (2,7%)	
ITPA rs9101						
Selvagem	71 (47,3%)	26 (17,3%)	0,202	63 (42,0%)	34 (22,7%)	0,240
Variante	44 (29,3%)	9 (6,0%)		39 (26,0%)	14 (9,3%)	
ITPA rs8362						
Selvagem	55 (36,7%)	19 (12,7%)	0,580	44 (29,3%)	30 (20,0%)	0,009
Variante	60 (40,0%)	16 (10,7%)		58 (38,7%)	18 (12,0%)	
ITPA rs1127354						
Selvagem	108 (72,0%)	34 (22,7%)	0,461	94 (62,7%)	48 (32,0%)	0,047
Variante	7 (4,7%)	1 (0,7%)		8 (5,3%)	0 (0,0%)	
ITPA rs7270101						
Selvagem	83 (55,3%)	25 (16,7%)	0,930	72 (48,0%)	36 (24,0%)	0,498
Variante	32 (21,3%)	10 (6,7%)		30 (20,0%)	12(8,0%)	
HPRT rs1468266						
Selvagem	90 (60,0%)	26 (17,3%)	0,712	79 (52,7%)	37 (24,7%)	0,998
Variante	25 (16,7%)	9 (6,0%)		23 (15,3%)	11(7,3%)	
XO/XDH rs4407290						
Selvagem	112 (74,7%)	34 (22,7%)	0,943	100 (66,7%)	46 (30,7%)	0,440
Variante	3 (2,0%)	1 (0,7%)		2 (1,3%)	2 (1,3%)	
XO/XDH rs17323225						
Selvagem	107 (71,3%)	34 (22,7%)	0,376	95 (63,3%)	46 (30,7%)	0,521
Variante	8 (5,3%)	1 (0,7%)		7 (4,7%)	2 (1,3%)	
XO/XDH rs1884725						
Selvagem	76 (50,7%)	21 (14,0%)	0,304	63 (42,0%)	34 (22,7%)	0,326
Variante	39 (26,0%)	14 (9,3%)		39 (26,0%)	14(9,3%)	
XO/XDH rs2295475						
Selvagem	70 (46,7%)	21 (14,0%)	0,912	59 (39,3%)	32 (21,3%)	0,239
Variante	45 (30,0%)	14 (9,3%)		43 (28,7%)	16 (10,7%)	
XO/XDH rs17011368						
Selvagem	106 (70,7%)	31(20,7%)	0,511	94 (62,7%)	43 (28,7%)	0,605
Variante	9 (6,0%)	4 (2,7%)		8 (5,3%)	5 (3,3%)	

Nota: Resultados em número absoluto de pacientes e (%). DII: doença inflamatória intestinal; TPMT: tiopurina metiltransferase; ITPA: inosina trifosfatase; HPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase; XO/XDH: xantina oxidase ou xantina desidrogenase. *Teste estatístico U de Mann-Whitney.

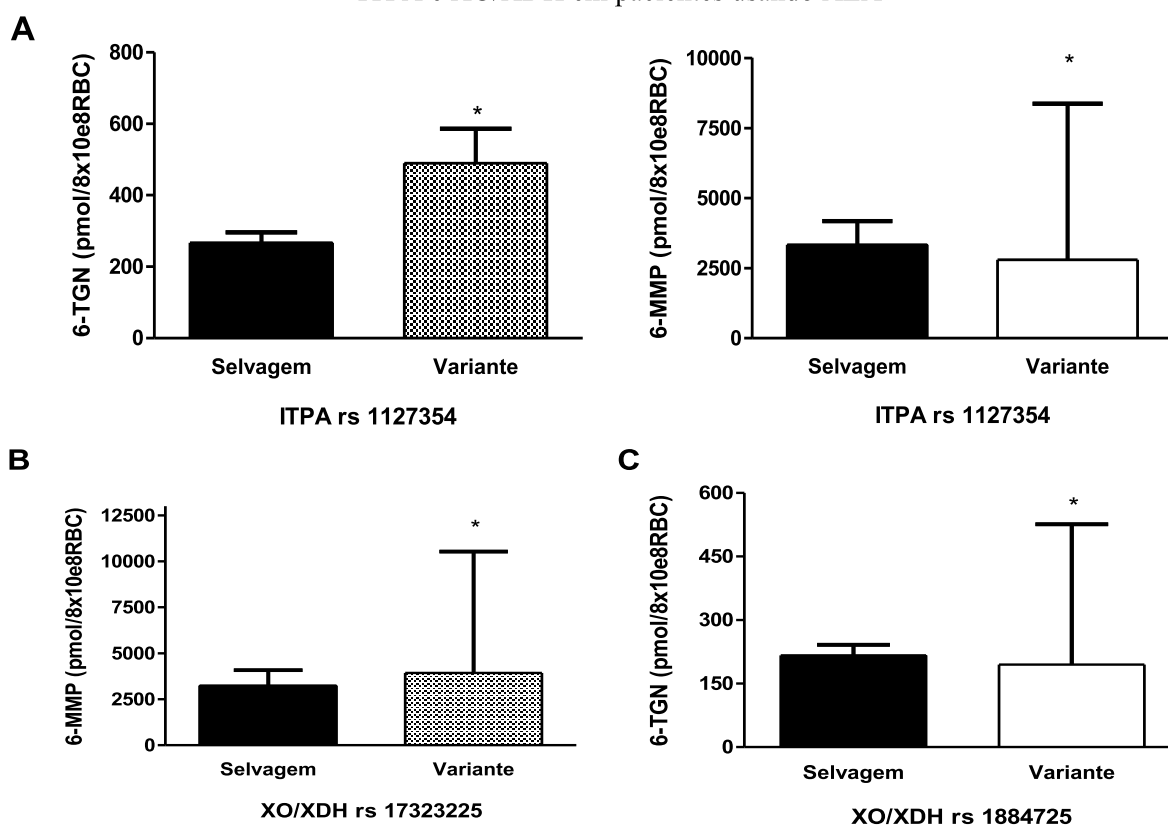
Fonte: Dados da pesquisa (2024).

5.3.1 Associação entre os polimorfismos e a terapia com AZA e seus metabólitos

Ao estratificar os pacientes quanto ao genótipo das enzimas e avaliar as concentrações dos metabólitos, observou-se que pacientes que carregavam pelo menos um alelo variante para enzima ITPA rs1127354 apresentaram concentrações medianas significativamente mais altas dos metabólitos 6-TGN ($489,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$ versus $139,2 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$) e 6-MMP ($2792,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$ versus $985,3 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$) em comparação aos pacientes com genótipo selvagem ($p=0,015$; $p=0,020$) (Gráfico 3A).

Resultados semelhantes foram observados em pacientes com pelo menos um alelo variante para enzima XO/XDH rs17323225 que apresentaram maior concentração mediana do metabólito 6-MMP ($3929,2 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$ versus $987,3 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$) ($p=0,016$) em relação aos pacientes tipo selvagem (Gráfico 3B). O mesmo evidenciado para enzima XO/XDH rs1884725 com concentração mediana mais altas do metabólito 6-TGN ($194,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$ versus $136,2 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ eritrócitos}$) ($p=0,023$) (Gráfico 3C).

Gráfico 3 - Concentrações de 6-TGN e 6-MMP conforme polimorfismos genéticos das enzimas ITPA e XO/XDH em pacientes usando AZA



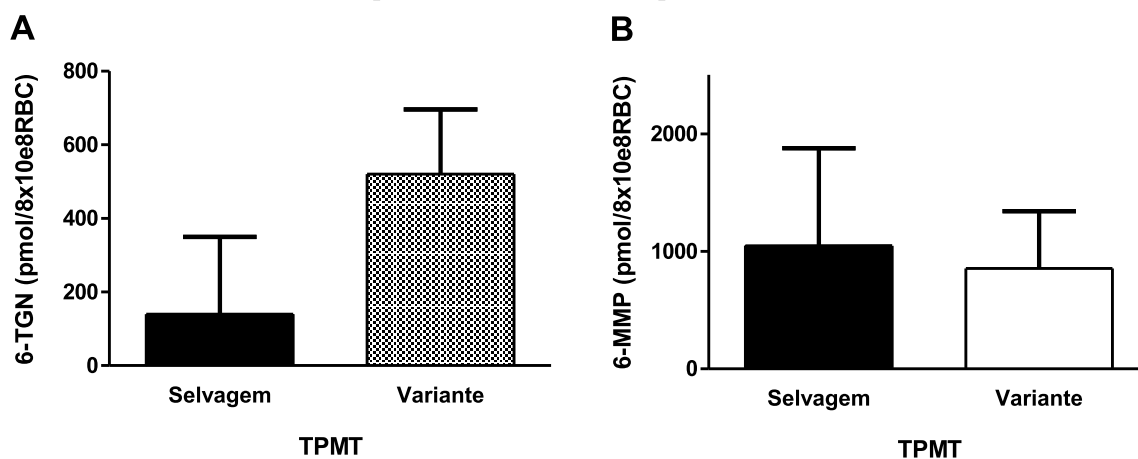
Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: metabólito 6-metil-mercaptopurina; ITPA: enzima inosina trifosfatase; XO/XDH: enzima xantina oxidase ou xantina desidrogenase; AZA: azatioprina. Resultados expressos em mediana. Teste U de Mann-Whitney ($p < 0,001$).

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Ao estratificar os pacientes quanto ao genótipo da TPMT e realizar as correlações com 6-TGN, observou-se que pacientes heterozigotos para o gene da TPMT, ou seja, com a presença de um dos alelos variantes (*2, *3A e *3C), apresentaram uma concentração mediana maior do metabólito 6-TGN (157,9 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) em comparação aos pacientes homozigotos para o tipo selvagem (TPMT *1/*1) (139,4 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), sem diferença significativa ($p=0,260$) (Gráfico 4A).

No que se refere à análise de 6-MMP, também não foi identificada diferença significativa entre os pacientes homozigotos para TPMT e aqueles carregando pelo menos uma cópia do alelo variante (*2, *3A e *3C), alelo relacionado com a redução da atividade enzimática e, conseqüentemente a diminuição das concentrações do metabólito inativo (1048,5 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos versus 852,8 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), e menor ocorrência de eventos adversos ($p=0,123$) (Gráfico 4B).

Gráfico 4 - Concentrações de 6-TGN e 6-MMP conforme polimorfismo genético da TPMT em pacientes usando Azatioprina



TPMT	Metabólitos	N	Metabólitos**			
			Média	DP	Mediana	IIQ
Selvagem	6-TGN	137	252,0	296,0	139,0	4,51 - 2456,0
Variante		13	521,0	633,0	158,0	26,3 - 1543,0
Selvagem	6-MMP	137	3724,0	10397,0	1049,0	25,8 - 97800,0
Variante		13	789,0	363,0	853,0	142,8 - 1341,0

Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; selvagem: paciente homozigoto; variante: paciente com pelo menos uma cópia de alelo variante; TPMT: tiopurina metiltransferase. N: número absoluto; DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil. **Resultados (medianos) expressos em $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Teste U de Mann-Whitney, $p>0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Foi realizada uma análise de regressão logística binomial para identificar fatores associados ao status clínico de remissão ou atividade da doença. Nenhum dos polimorfismos de TPMT, ITPA (rs9101, rs1127354, rs7270101) HPRT (rs1468266), XO/XDH (rs4407290,

rs17323225, rs1884725, rs2295475, rs17011368) mostrou associação significativa com o status clínico ($p>0,05$). No entanto, os níveis de 6-TGN foram fortemente associados à remissão ($p<0,001$) em todos os modelos, destacando-se como um preditor importante para a remissão da doença. Já os níveis de 6-MMP não apresentaram associações consistentes. O polimorfismo ITPA rs8362, especificamente, foi significativamente associado a uma maior probabilidade de remissão ($p=0,013$).

Os resultados avaliados quanto à terapia com AZA e terapias combinadas AZA/alopurinol (AZA/ALO), AZA/biológicos (AZA/BIO) e AZA/alopurinol/biológicos (AZA/ALO/BIO) estão expostos na tabela 5. Foram observadas diferenças estatísticas entre os valores medianos das doses diárias de AZA e as terapias medicamentosas (terapia com AZA e em terapia combinada com Alopurinol ($p<0,001$) e com medicamentos biológicos ($p<0,002$), mas não entre as associações alopurinol e biológico.

Foi observada uma correlação positiva fraca entre a dose de AZA e o uso de medicamentos biológicos ($\rho=0,257$, $p=0,002$), indicando que doses mais altas de AZA estão associadas ao uso concomitante de terapias biológicas. Por outro lado, foi encontrada uma correlação negativa moderada entre a dose de AZA e a terapia associada com ALO ($\rho=-0,378$, $p<0,001$), sugerindo que maiores doses de AZA estão associadas a uma menor utilização de terapias combinadas com ALO. Esses resultados indicam relações distintas entre a dose de AZA e as abordagens terapêuticas adotadas, refletindo a complexidade das estratégias de tratamento. Não foram observadas correlações entre as associações alopurinol com biológico (correlação de Spearman, $\rho=-0,019$, $p=0,818$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores medianos das doses de AZA nos pacientes com genótipo selvagem da TPMT (150 mg/dia) e nos heterozigotos portadores de alelos variantes (125 mg/dia) ($p>0,05$). Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas nas doses diárias medianas de AZA entre pacientes homozigotos e heterozigotos para as outras enzimas analisadas ($p>0,05$). No entanto, pacientes com genótipo selvagem da TPMT que estavam em tratamento com medicamentos biológicos apresentaram diferença significativa nos valores medianos das doses de AZA (100 mg/dia) quando comparados aos heterozigotos portadores de alelos variantes (125 mg/dia).

Em relação aos valores dos metabólitos, observou-se uma diferença entre os níveis de 6-TGN e 6-MMP na presença de polimorfismos da enzima ITPA (rs1127354) ($p=0,020$), assim como nos polimorfismos de XO/XDH (rs17323225) ($p=0,016$) e XO/XDH (rs1884725) ($p=0,023$). Além disso, os polimorfismos nos genes das enzimas analisadas foram avaliados em relação aos parâmetros hematológicos (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros hematológicos e concentração dos metabólitos relacionados aos SNPs e a terapia farmacológica utilizando AZA

Características	AZA (n=99) (150 mg/dia) ^a			AZA/ALO (n=9) (50 mg/dia) ^a p<0,001**			AZA/BIO (n=38) (100 mg/dia) ^a p=0,002**			AZA/ALO/BIO (n=4) (50 mg/dia) ^a			LG ^c	N ^c	L ^c	Hb ^d
	AZA ^a	6-TGN ^b	6-MMP ^b	AZA ^a	6-TGN ^b	6-MMP ^b	AZA ^a	6-TGN ^b	6-MMP ^b	AZA ^a	6-TGN ^b	6-MMP ^b				
TPMT																
Selvagem	150	152,0	1249,0	50	145,0	477,0	100*	120,0	798,0	50	140,0	983,0	6300,0	3647,0	1726,0	139,
Variante	125	626,0	836,0	-	-	-	125	135,0	967,0	25	169,0	143,0	6366,0	4080,0	1357,0	13,7
ITPA rs9101																
Selvagem	150	139,0	1169,0	62,5	190,0	663,0	100	116,0	800,0	50	142,0	893,0	6366,0	3843,0	1664,0	13,9
Variante	150	242,0	1422,0	50	20,4	184,0	150	143,0	838,0	-	-	-	6230,0	3588,0	1840,0	13,4
ITPA rs8362																
Selvagem	150	153,0	1169,0	75	288,0	663,0	150	122,0	680,0	50	143,0	983,0	6312,5	3602,5	1679,0	14,1
Variante	150	158,0	1220,0	50	49,0	213,0	100	127,0	860,0	50	124,0	803,0	6320,0	3836,0	1777,5	13,4
ITPA rs1127354																
Selvagem	150	146,0	1134,0	50	142,0	420,0*	100	124,0	807,0	50	142,0	893,0	6355,5	3652,0	1724,0	13,9
Variante	150	503,0	3929,0	100	214,0	1049,0	-	-	-	-	-	-	5659,0	3794,5	1594,5	13,7
ITPA rs7270101																
Selvagem	150	161,0	1020,0	75	214,0	477,0	125	124,0	754,0	50	140,0	983,0	6353,0	3673,0	1671,5	13,9
Variante	150	139,0	1625,0	25	94,0	531,0	100	123,0	862,0	25	169,0	143,0	6175,0	3602,5	1861,5	13,9
HPRT rs1468266																
Selvagem	150	203,0	1220,0	25	139,0	362,0	100	122,0	800,0	50	143,0	983,0	6312,5	3643,5	1745,5	14,0
Variante	138	138,0	1086,0	62,5	179,0	668,0	100	127,0	814,0	50	124,0	803,0	6320,0	3730,0	1690,0	13,4
XO/XDH rs4407290																
Selvagem	150	158,0	1211,0	50	142,0	420,0	100	127,0	814,0	50	142,0	893,0	6290,0	3638,5	1720,0	13,9
Variante	225	73,8	2245,0	200	235,0	9802,0	100	56,3	401,0	-	-	-	9430,0	7048,0	1534,5	14,5
XO/XDH rs17323225																
Selvagem	150	152,0	1156,0*	50	145,0	477,0	100	127,0	814,0	50	142,0	893,0	6340,0	3630,0	1729,0	13,9
Variante	150	343,0	5608,0	-	-	-	100	56,3	401,0*	-	-	-	5860,0	4067,0	1450,0*	14,0
XO/XDH rs1884725																
Selvagem	150	142,0	1182,0	50	139,0	362,0	100	127,0	860,0	50	142,0	893,0	6666,0	3961,0	1873,0	13,9
Variante	150	309,0*	1258,0	87,5	1335,0*	763,0	100	57,1*	519,0	-	-	-	5760,0	3366,0*	1502,0	13,9
XO/XDH rs2295475																
Selvagem	150	144,0	1220,0	75	214,0	477,0	150	122,0	800,0	50	142,0	893,0	6280,0	3522,0	1722,0	13,9
Variante	150	304,0	1134,0	37,5	142,0	606,0	100	127,0	860,0	-	-	-	6440,0	3961,0	1701,0	13,8
XO/XDH rs17011368																
Selvagem	150	154,0	1156,0	50	145,0	477,0	100	124,0	826,0	50	143,0	983,0	6280,0	3606,0	1722,0	13,9
Variante	150	218,0	3806,0	-	-	-	125	153,0	304,0	50	124,0	803,0	7270,0	4238,0	1502,0	14,0

Nota: SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; AZA: azatioprina; ALO: alopurinol; BIO: biológicos; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; LG: leucometria global; N: neutrófilos; L: linfócitos; Hb: hemoglobina; HPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase; XO/XDH: xantina oxidase ou xantina desidrogenase. Resultados das medianas em: ^a mg/dia; ^b pmol/8x10⁸ eritrócitos; ^c mm³ ou μ L; ^d g/dL. **Teste U de Mann-Whitney, *p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

5.3.2 Associações dos SNPs com Eventos Adversos e Intolerâncias nas terapias com AZA

Foram avaliadas as associações entre os genótipos e as terapias medicamentosas na população estudada (n=150) com base nos parâmetros clínicos relatados durante as entrevistas. Dentre os participantes, 22,0% apresentaram estado de saúde considerado “muito bom”, enquanto 25,4% relataram dor abdominal de intensidade moderada a intensa.

Uma parte significativa dos sujeitos da pesquisa (n=68; 45,3%) relatou complicações associadas à doença DII. As complicações mais frequentemente mencionadas foram artralgia (n=42; 28,0%), presença de fissuras, fístulas e estenoses (n=50; 33,3%), além de outras manifestações, como artrite, uveíte, varizes, cólicas abdominais e intestinais, dores ósseas, fezes líquidas e pastosas, com frequência inferior a 5% cada. As complicações mais comuns e descritas na literatura estão representadas na Tabela 6.

Em relação às complicações associadas ao uso da azatioprina (AZA), as queixas mais frequentes incluíram linfopenia (n=18; 12,0%), dor abdominal (n=16; 10,7%), anemia (n=12; 8,0%), neutropenia (n=9; 6,0%), leucopenia (n=4; 2,7%) e náuseas/vômitos (n=4; 2,7%). Outras complicações, como queda de cabelo, dor de cabeça, pele ressecada, lesões cutâneas, evacuações líquidas e fibromialgia, foram mencionadas por menos de 4% dos pacientes. Essas informações estão detalhadas na Tabela 6. Entre os pacientes em uso de AZA, não foram registrados óbitos nem efeitos adversos graves associados ao fármaco durante o período do estudo.

Ao analisar as queixas dos pacientes relacionadas aos efeitos adversos ou quanto às complicações da doença, observamos que pacientes que relataram artralgia, dor abdominal, uveíte, náuseas, anemia, vômitos e perda de apetite eram maioria autodeclarados brancos e carregavam alelo selvagem para todas as enzimas analisadas. A maioria fazia uso de terapia com AZA, sem associação com Alopurinol.

Avaliando os possíveis fatores capazes de influenciar na atividade da doença (DII), observamos que pacientes homocigotos para o alelo mais frequente para os genes das enzimas analisadas apresentaram mais frequência de complicações atribuídas aos medicamentos e à DII, como queixas relacionadas à uveíte e artralgia (Tabela 6).

Tabela 6 - Eventos adversos, complicações da doença e intolerâncias associadas com as terapias medicamentosas e os polimorfismos genéticos

	Complicações atribuídas aos medicamentos						Complicações atribuídas à DII				
	Anemia	Alteração de transaminases	Neutropenia	Leucopenia	Febre, náusea, vômito, dor de cabeça	Lesões na face Pele ressecada	Artralgia	Estenose	Fístulas	Fissuras	Uveíte
Doença											
DC (n=120)	4,0%	6,8%	5,3%	2,7%	2,0%	2,7%	22,0%	4,0%	26,0%	0,7%	1,3%
RCU (n=30)	4,0%	0,7%	0,7%	-	0,7%	0,7%	6,0%	-	2,0%	0,7%	0,7%
Terapia											
AZA (n=137)	6,0%	6,8%	4,7%	2,0%	2,0%	2,7%	26,0%	3,3%	26,7%	0,7%	0,7%
AZA/ALO (n=13)	2,0%	0,7%	1,3%	0,7%	0,7%	0,7%	2,0%	0,7%	21,3%	0,7%	1,3%
TPMT											
Selvagem (n=137)	8,0%	6,1%	4,7%	2,0%	2,7%	2,7%	25,3%	4,0%	24,7%	1,3%	2,0%
Variante (n=13)	-	2,0%	1,3%	0,7%	-	0,7%	2,7%	-	3,3%	-	-
ITPA rs9101											
Selvagem (n=97)	7,3%	4,1%	3,3%	1,3%	1,3%	3,4%	15,3%	2,7%	14,7%	0,7%	2,0%
Variante (n=53)	0,7%	3,4%	2,7%	1,3%	-	-	12,7%	1,3%	13,3%	0,7%	-
ITPA rs8362											
Selvagem (n=74)	5,3%	2,7%	3,3%	1,3%	1,3%	2,7%	14,7%	3,3%	12,0%	-	2,0%
Variante (n=76)	2,7%	4,7%	2,7%	1,3%	-	0,7%	13,3%	0,7%	16,0%	1,3%	-
ITPA rs1127354											
Selvagem (n=142)	8,0%	7,4%	6,0%	2,7%	2,0%	3,4%	27,3%	4,0%	24,7%	1,3%	2,0%
Variante (n=8)	-	-	-	-	0,7%	-	0,7%	-	3,3%	-	-
ITPA rs7270101											
Selvagem (n=108)	6,7%	4,7%	5,3%	2,7%	0,7%	2,0%	22,0%	3,3%	18,7%	1,3%	2,0%
Variante (n=42)	1,3%	2,7%	0,7%	-	2,0%	1,3%	6,0%	0,7%	9,3%	-	-
HPRT rs1468266											
Selvagem (n=116)	5,3%	5,4%	4,0%	0,7%	2,0%	3,4%	18,0%	3,3%	21,3%	0,7%	2,0%
Variante (n=34)	2,7%	2,0%	2,0%	2,0%	0,7%	-	10,0%	0,7%	6,7%	0,7%	-
XO/XDH rs4407290											
Selvagem (n=146)	8,0%	7,4%	6,0%	2,7%	2,7%	2,7%	27,3%	4,0%	27,3%	1,3%	1,3%
Variante (n=4)	-	-	-	-	-	0,7%	0,7%	-	0,7%	-	0,7%
XO/XDH rs17323225											
Selvagem (n=141)	7,3%	6,8%	6,0%	2,7%	2,7%	3,4%	28,0%	3,3%	26,7%	1,3%	2,0%
Variante (n=9)	0,7%	0,7%	-	-	-	-	-	0,7%	1,3%	-	-
XO/XDH rs1884725											
Selvagem (n=97)	3,3%	6,8%	3,3%	1,3%	2,0%	2,0%	20,7%	2,0%	20,0%	1,3%	1,3%
Variante (n=53)	4,7%	0,7%	2,7%	1,3%	0,7%	1,3%	7,3%	2,0%	8,0%	-	0,7%
XO/XDH rs2295475											
Selvagem (n=91)	7,3%	3,4%	4,7%	2,0%	1,3%	2,0%	19,3%	2,7%	20,0%	1,3%	1,3%
Variante (n=59)	0,7%	4,1%	1,3%	0,7%	1,3%	1,3%	8,7%	1,3%	8,0%	-	0,7%
XO/XDH rs17011368											
Selvagem (n=137)	7,3%	7,4%	6,0%	2,7%	2,7%	3,4%	26,0%	3,3%	26,0%	1,3%	2,0%
Variante (n=13)	0,7%	0,7%	-	-	-	-	2,0%	0,7%	0,2%	-	-

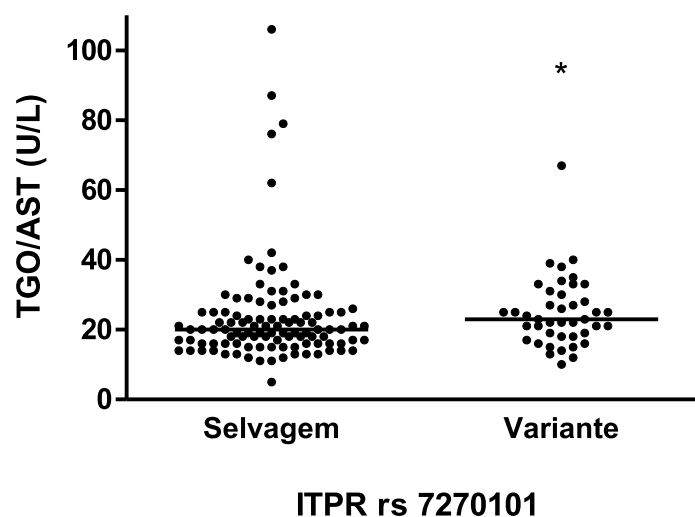
Nota: Número de participantes em porcentagem; DII: doença inflamatória intestinal; DC: doença de Crohn; RCU: retocolite ulcerativa; AZA: azatioprina; AZA/ALO: terapia associada azatioprina/alopurinol; TPMT: tiopurina metiltransferase; ITPA: inosina trifosfatase; HPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase; XO/XDH: xantina oxidase ou xantina desidrogenase.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

A enzima hepática (TGO/AST) apresenta valores aumentados em pacientes que carregam pelo menos um gene variante na enzima ITPA (rs7270101) e uma correlação com polimorfismo

TPMT ($\rho=0,268$; $p<0,001$), evidenciando que valores altos de TGO/AST estão relacionados com pacientes carregando genótipo variante em comparação com pacientes que apresentam alelos selvagens, corroborando que pacientes com polimorfismos retêm purinas na forma de 6-TITP, metabólito tóxico, durante o metabolismo de 6-MP. No entanto, os valores enzimáticos estão dentro dos parâmetros normais (homens 38 U/L; mulheres 32 U/L) (valor mediano 23U/L versus 20U/L; $p=0,049$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Relação entre a enzima hepática TGO/AST e genótipos da enzima ITPA (rs 7270101)



Nota: ITPA: inosina trifosfatase; selvagem: paciente homocigoto; variante: paciente que carrega pelo menos uma cópia de alelo variante; TGO/AST: transaminases aspartato aminotransferase / transaminase glutâmico-oxalacética. Teste U de Mann-Whitney, $*p<0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Em relação à neutropenia, observamos que pacientes com polimorfismos na enzima XO/XDH rs1884725 apresentaram neutropenia em relação aos pacientes sem polimorfismos, o que é esperado visto que a enzima com polimorfismo apresenta atividade reduzida, metabolizando menos 6-MP em 6-TU ($p=0,035$). Avaliando os fatores que podem ou não influenciar na linfopenia, observamos que pacientes com polimorfismo na enzima XO/XDH rs17323225 apresentaram linfopenia ($p=0,034$) em relação aos pacientes homocigotos. Não houve associações estatisticamente significativas entre genótipos TPMT e neutropenia ou linfopenia, o que foi observado pela ausência de relatos clínicos ou evidências bioquímicas de mielossupressão. O mesmo foi observado ao analisarmos os genótipos das demais enzimas com os mesmos parâmetros.

Ao buscar associação entre os genótipos investigados e os eventos desfavoráveis associados ao tratamento com AZA, observou-se que os pacientes com genótipo do tipo selvagem e variantes (heterocigotos e homocigotos) apresentaram números semelhantes de queixas relacionadas à terapia sem correlação com polimorfismos (Tabela 6). No entanto, ocorrência de artralgia foi predominante em pacientes com alelos do tipo selvagem para todos os genótipos investigados.

6 DISCUSSÃO

O estudo para a escrita do artigo de revisão sistemática investigou a variabilidade no metabolismo de tiopurinas em pacientes com DII, com destaque da influência de polimorfismos do TPMT na resposta terapêutica e nos eventos adversos associados ao uso de AZA. É fundamental destacar a relação entre variabilidade genética dos pacientes, concentrações de metabólitos de tiopurinas, resposta terapêutica e ocorrência de eventos adversos, como a mielossupressão. De acordo com a revisão sistemática, a ocorrência de efeitos adversos está fortemente associada à atividade do TPMT, mas também a fatores ambientais e terapêuticos. Isso aponta para a necessidade de ajustes terapêuticos, considerando que interações medicamentosas podem afetar a segurança do tratamento.

A revisão sistemática também evidenciou a heterogeneidade nas recomendações de dosagem de AZA. As diretrizes para o tratamento de DII em pacientes caucasianos recomendam doses diárias de 2 a 3 mg/kg, baseadas na atividade normal de TPMT. No entanto, a aplicação dessas diretrizes a outras etnias, como as populações japonesas, exige uma avaliação mais aprofundada, já que essas populações podem requerer doses menores de AZA para alcançar eficácia clínica e concentrações terapêuticas de 6-TGN, refletindo a necessidade de protocolos de tratamento mais personalizados. Esse aspecto foi relevante para nossa pesquisa, pois reforçou a ideia de que a aplicação de doses padrão de AZA pode não ser adequada em todas as populações, sendo essencial um ajuste de dose individualizado para otimizar o tratamento em diferentes contextos.

Outro ponto importante destacado pela revisão é o papel da genotipagem do TPMT como ferramenta crucial para prever a toxicidade da AZA. Nossa pesquisa confirma que a inclusão da genotipagem TPMT na prática clínica poderia reduzir substancialmente o risco de efeitos adversos, como mielossupressão grave ou hepatotoxicidade, leucopenia, pancreatite, náuseas e vômitos, principalmente em pacientes com variantes do TPMT, que estão em maior risco. Estudos incluídos na revisão indicam que cerca de 52% das pesquisas correlacionaram diretamente os polimorfismos do TPMT com a ocorrência desses efeitos. No entanto, alguns pesquisadores sugerem que outros mecanismos, como reações de hipersensibilidade, podem ser responsáveis por eventos adversos, como febre e erupção cutânea, em pacientes que conseguem tolerar a AZA em doses terapêuticas.

A revisão também destaca a importância do monitoramento dos níveis de 6-TGN e 6-MMP, já que níveis elevados de 6-TGN estão associados a uma maior resposta clínica, mas também a um risco aumentado de leucopenia, enquanto níveis elevados de 6-MMP estão ligados a hepatotoxicidade. A quantificação dos metabólitos surge como uma ferramenta clínica valiosa para personalizar o tratamento e otimizar os resultados terapêuticos, além de prevenir ocorrência de efeitos adversos. No entanto, autores apontam que, embora o genotipagem do TPMT seja útil para

determinar a dose inicial e prever a toxicidade, ela não substitui a necessidade de monitoramento contínuo dos parâmetros hematológicos e bioquímicos durante o tratamento com tiopurinas.

Em conclusão, o artigo reforça a importância de um monitoramento rigoroso dos níveis de 6-TGN e 6-MMP, especialmente em pacientes com DII que utilizam AZA ou 6-MP, para garantir a eficácia do tratamento e minimizar os riscos de toxicidade. O genotipagem de TPMT antes ou durante a fase inicial do tratamento pode ser um fator preditivo importante para a resposta clínica e a prevenção de mielossupressão, mas deve ser complementada por exames periódicos para garantir a segurança do paciente (Ribeiro et al., 2023).

Esse monitoramento rigoroso e a genotipagem genética são particularmente relevantes considerando a longa utilização de imunossupressores da classe das tiopurinas, AZA e 6-MP, que têm sido amplamente utilizados há mais de 30 anos para o tratamento das DII, prescritos principalmente para manter a remissão e prevenir a recorrência da doença (Colli et al., 2008; Iborra et al., 2019). Sousa e colaboradores (2014), em seus achados clínicos, mostraram que 23,6% dos doentes iniciaram a imunossupressão com AZA, onde 66,7% apresentaram eficácia terapêutica (Sousa et al., 2014). Tais resultados corroboram nossos achados na população atendida no hospital universitário, onde encontramos uma taxa de remissão de 68,0%, destacando a eficácia dessa terapia no tratamento da DII. Por outro lado, observou-se a alta incidência de complicações decorrentes da DII ou do tratamento com tiopurinas (22,0%), o que evidencia os desafios contínuos enfrentados pelos pacientes e profissionais de saúde no manejo dessa condição crônica.

Ademais, pode-se observar que a ocorrência dos eventos adversos devido à AZA, no presente estudo, foi semelhante às relatadas em estudos prévios (Broekman et al., 2017; Kim; Choe, 2013; Leite et al., 2009). Os eventos adversos relacionados ao uso da AZA são bem conhecidos e documentados. Dezenas de trabalhos clínicos e de revisão de literatura descrevem eventos desfavoráveis associados, principalmente, aos níveis intraeritrocitários elevados de 6-TGN e 6-MMP. A mielotoxicidade é o principal evento adverso dose-dependente relacionado à 6-TGN. No entanto, já foram observados eventos inesperados menos frequentes, como as leucemias e linfomas. Em relação à 6-MMP, o principal efeito tóxico conhecido é a hepatotoxicidade, contudo, sua relação com os níveis de 6-MMP não está completamente esclarecida (Czaja, 2020; Dillon et al., 2020; Liu et al., 2015; Shin et al., 2016; Van Gennep et al., 2019).

Os eventos adversos significativos observados em nosso estudo, como artralgia (28,0%), linfopenia (12,0%), dor abdominal (10,7%), anemia (8,0%), neutropenia (6,0%) e leucopenia (2,7%) não levaram à retirada definitiva da AZA, apenas ajustes de dose e/ou associação com alopurinol 100mg, não interrompendo o tratamento com este fármaco. Todos os eventos adversos relatados no estudo foram avaliados e acompanhados periodicamente pela equipe médica. Vários

estudos apontaram ocorrência de náuseas/vômitos incoercíveis (10 a 28%), levando à interrupção da terapia, seguidas por dor abdominal e pancreatite (Colli et al., 2008).

Não ocorreu nenhum caso de malignidade em nossos achados, tal como tem sido constatado em alguns estudos que sugerem uma relação (controversa) entre as tiopurinas e linfoma ou outros tipos de câncer (Leite et al., 2009; Wilson et al., 2021). Não se verificou, igualmente, a ocorrência de nenhum caso de pancreatite aguda, o que tem sido observado em estudos com população submetida a esta terapêutica (Leite et al., 2009; Wilson et al., 2021). A falta de modificação ou suspensão da dose de AZA, apesar da ocorrência de manifestações clínicas, levanta questões sobre a tolerabilidade da terapia e a necessidade de avaliação personalizada dos riscos e benefícios.

A observação de que 22,0% dos pacientes apresentaram efeitos adversos relacionados à terapia com AZA ressalta a importância da monitorização cuidadosa dos pacientes durante o tratamento. A importância da monitorização dos níveis intraeritrocitários de 6-TGNs, com objetivo de reduzir a toxicidade dose-dependente, foi avaliada por diversos pesquisadores, demonstrando que a quantificação dos metabólitos da AZA exerce um papel importante no acompanhamento clínico de pacientes submetidos à terapia com AZA (Kirchherr et al., 2013; Srinivasan; de Cruz; Van Langenberg, 2019; Yao et al., 2021).

Ao contrário da dose padronizada em mg/kg de massa corporal, a individualização da dose é realizada pela MTF, o que possibilita adequação dos níveis do metabólito 6-TGN à faixa terapêutica, a manutenção das concentrações de 6-TGN e de 6-MMP em níveis em que os eventos adversos sejam minimizados, além de possibilitar a identificação de casos de não adesão ao tratamento (Wilson et al., 2021).

Em algumas regiões, como nos Estados Unidos, em alguns países europeus, no Reino Unido e no Japão, a MTF é uma prática rotineira que envolve os mais variados medicamentos, inclusive a AZA. No Brasil, ainda são poucos os laboratórios que realizam o monitoramento de fármacos, talvez devido à falta de equipamentos adequados, de profissionais qualificados ou, ainda, devido ao desconhecimento desta ferramenta (Ribeiro et al., 2022; Ribeiro et al., 2023). Até o presente momento, identificamos apenas onze laboratórios brasileiros que realizam essa rotina de monitorização de fármacos, e destes, somente nove realizam o monitoramento da AZA, localizados nos estados do Amazonas, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul e São Paulo.

A primeira metodologia descrita para a monitorização terapêutica dos níveis intraeritrocitários de 6-TGN foi desenvolvida por Lennard e Maddocks, em 1983, e serviu como base para o desenvolvimento de outros métodos e determinação dos intervalos terapêuticos no tratamento com a AZA (Dervieux; Lennard, 1998). Alguns métodos já foram descritos para dosagem da 6-TGN e 6-MMP, porém essas metodologias apresentam algumas variações entre si (Binscheck et al., 1996;

Dervieux; Boulieu, 1998; Hawwa et al., 2009; Kirchherr et al., 2013; Naik; Nandibewoor, 2013; Oliveira et al., 2004; Pacheco-Neto, 2010; Stefan et al., 2004; Vicha et al., 2015).

Baseado nos métodos já descritos na literatura para a determinação dos metabólitos, nosso grupo de estudos do laboratório LaFaCE desenvolveu, validou e otimizou as condições analíticas para a quantificação dos metabólitos da AZA, 6-TGN e 6-MMP, permitindo determinar suas concentrações intraeritrocitárias em 150 pacientes tratados com AZA e correlacioná-las com os efeitos terapêuticos e adversos, bem como com os genótipos para 13 SNPs em 4 importantes enzimas envolvidas na metabolização dessa tiopurina.

Comparando os nossos resultados de validação analítica com a outros estudos, observamos que o nosso método cromatográfico, empregado para a realização da quantificação de 6-TGN e 6-MMP, é específico e sensível para a determinação simultânea de concentrações dos metabólitos da AZA, conferindo confiabilidade nos resultados e constituindo-se em uma importante ferramenta na rotina de monitorização terapêutica de pacientes com DII (Ribeiro et al., 2022).

Os métodos desenvolvidos na década de 80 não avaliaram os níveis de 6-MMP e apresentaram intervalo para os níveis de 6-TGN entre 30 e 30000 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Lennard & Singleton (1992) realizaram um estudo com menor intervalo para 6-TGN – 30 a 900 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos – e, pela primeira vez, quantificaram a 6-MMP, com intervalo entre 300 e 3000 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Em outros estudos, nota-se que as concentrações de 6-TGN apresentaram ampla variação, desde valores com intervalo de 41-8114 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para 6-TGN e entre 244-32453 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para 6-MMP (Dervieux; Boulieu, 1998; Lennard; Singleton, 1992; Naidu et al., 2014; Oliveira et al., 2004).

Séverine e colaboradores (2020), semelhante ao observado em outros estudos clínicos e de revisão, estabeleceram a associação da remissão da doença à faixa terapêutica da tiopurina, cujos níveis de 6-TGN permaneceram entre 235-400 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos, enquanto níveis superiores a 450 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos se correlacionaram com aumento da toxicidade e sem ganho terapêutico adicional (Gearry; Barclay, 2005; Lin et al., 2021; Séverine et al., 2020; Turbayne; Sparrow, 2022). No entanto, essas descobertas foram inconsistentes com as de outros estudos, incluindo uma revisão sistemática de Konidari et al. (2014), que não detectaram tal correlação entre estar em remissão e apresentar concentrações elevadas de 6-TGN (Konidari et al., 2014).

Concentrações de 6-TGN e 6-MMP fornecem informações sobre a exposição do paciente à AZA e podem ser úteis na predição da resposta ao tratamento e na otimização da terapia. Nossas análises mostraram que pacientes com DII em remissão apresentaram um aumento significativo no valor da mediana do 6-TGN (207,5 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) em relação àqueles com doença em atividade (125,8 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), semelhantes aos achados da revisão conduzida por Magro

et al. (2020). A correlação significativa entre a remissão da doença e aumento das concentrações de 6-TGN sugere que o monitoramento desses metabólitos pode ser útil nas decisões clínicas.

Em outro estudo clínico, foi apontado que as concentrações médias de 6-TGN foram significativamente maiores em pacientes em remissão clínica ($342,8 \pm 184,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) quando comparados aos pacientes com a doença em atividade ($232,9 \pm 159,7 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) (Andoh et al., 2008). Tal observação nos fornece evidências adicionais do papel potencial desse metabólito como marcador de resposta ao tratamento.

Jonason et al (2020) encontraram valores de 6-TGN próximos aos nossos em pacientes com remissão ($254 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) e maiores do que em pacientes que não estavam em atividade ($177 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), embora não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p=0,08$) (Jonason et al., 2020). Tais resultados foram semelhantes a um estudo de metanálise, que demonstrou pacientes em remissão clínica com níveis de 6-TGN acima de 230 e 260 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e ao estudo conduzido por Mallick e Malik (2022), onde a eficácia terapêutica da AZA tem sido associada a níveis de 6-TGN $> 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos, enquanto o risco de leucopenia está associado a níveis de 6-TGN $> 450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos, e a hepatotoxicidade se desenvolve em níveis de 6-MMP $> 5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos (Kopylov; Ben-Horin; Seidman, 2014; Mallick; Malik, 2022).

Apesar da literatura trazer uma padronização da faixa terapêutica recomendável de 6-TGN (230 a 400 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), o limite superior de 450 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos não está bem corroborado por dados experimentais e, recentemente, foi observado que concentrações mais altas de 6-TGN estiveram associadas com cicatrização da mucosa intestinal em pacientes com DII, por isso a importância de atingir uma concentração sérica específica para remissão da doença e a melhora dos sintomas, minimizando a ocorrência de eventos adversos (Jonason et al., 2020; Magro et al., 2020; Kopylov; Ben-Horin; Seidman, 2014; Mallick; Malik, 2022). Em nosso estudo, 22,0% dos pacientes apresentaram concentrações acima desse limite, entretanto, com boa tolerância ao tratamento, apresentando poucos ou nenhum relato de evento adverso.

A ausência de diferença estatisticamente significativa nas concentrações de 6-MMP entre os grupos de pacientes com a doença em remissão e em atividade sugere que esse metabólito pode não ser um indicador direto da atividade da DII. Isso contrasta com os achados relacionados ao metabólito 6-TGN, que mostrou uma correlação significativa com a remissão da doença.

Estudos observacionais de pacientes com DII têm demonstrado consistentemente que pacientes com maior concentração de 6-TGN apresentam maior remissão da DII, no entanto, níveis elevados deste metabólito estão associados ao aumento do risco de complicações da farmacoterapia, como infecção e mielossupressão. Portanto, torna-se importante a personalização da dose, na qual é

possível prescrever a dose mais apropriada de AZA para maximizar a eficácia e minimizar o risco de toxicidade (Dillon et al., 2020; Morales et al., 2007; Van Gennepe et al., 2019).

Em concordância com relatos anteriores, houve uma leve linfopenia (12,0%), neutropenia (6,0%) e leucopenia (2,7%) relacionadas ao aumento da concentração de 6-TGN, porém, não houve registro de mielossupressão ($< 3000 \text{ mm}^3$ ou μL) dos pacientes e nem a necessidade de suspensão do medicamento, semelhantes a achados de outros autores (Rashid et al., 2020; Wilson et al., 2021).

Estudos mostraram ocorrências de 5 a 51% de leucopenia, 27 a 33% de neutropenia e 1,5% dos pacientes com linfopenia (Abuelsoud et al., 2021; Jonason et al., 2020; Kopylov; Ben-Horin; Seidman, 2014; Zaman et al., 2019). A observação de diferenças significativas nos parâmetros hematológicos, como leucometria global e número de neutrófilos, entre os grupos de pacientes com a doença em atividade e em remissão, destaca a importância de uma abordagem multifacetada na avaliação da atividade da DII, considerando não apenas marcadores bioquímicos, mas também características clínicas e hematológicas.

Numa compilação de resultados de estudos sobre a quantificação dos metabólitos 6-MMP e hepatotoxicidade induzida por tiopurinas, foi proposto o limiar de referência para hepatotoxicidade em $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. O efeito adverso hepatotoxicidade foi definido através dos valores da enzima alanina aminotransferase (TGP/ALT), num valor de 2 a 5 vezes superior ao limite de normal (valor normal até 36 U/L) (Broekman et al., 2017; Chen et al., 2020; Kopylov; Ben-Horin; Seidman, 2014; Singh et al., 2020; Turbayne; Sparrow, 2022; Van Asseldonk et al., 2012; Yarur et al., 2018;).

Dos paciente analisados, 11,3% apresentaram níveis de 6-MMP acima do limiar de referência e destes, nenhum paciente apresentou valores acima do limite para TGP/ALT, não ocorrendo, em nosso estudo, relato de hepatotoxicidade. Existem muitos fatores envolvidos no desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida por tiopurina, incluindo a dose de tiopurina, peso corporal, sexo e idade. Em seu estudo, Broeman et al. (2017) observaram a incidência de hepatotoxicidade de 15,8%, o que está dentro da faixa de incidência altamente variável relatada em estudos anteriores. Esta ampla variação (4 a 17%) é provavelmente resultado de diferenças nos protocolos de estudo, nas terapias e nas definições de toxicidade hepática induzida por medicamentos (Broekman et al., 2017).

Outro dado observado na população incluída no presente estudo foi a diminuição da transaminase TGO/AST ($22,0 \pm 10,4 \text{ U/L}$) no grupo de pacientes que apresentavam a doença em atividade, com os níveis máximos de 6-TGN a $564,0 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e de 6-MMP a $97800,0 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Entretanto, não houve significância estatística e os valores de TGO/AST dos pacientes se mantiveram dentro dos valores de referência (valor normal até 40 U/L), não sendo necessária alteração na dose da AZA (Yarur et al., 2018).

No nosso estudo, 13 pacientes (8,7%) estavam em terapia combinada AZA e alopurinol, e foi possível observar a remissão clínica, a diminuição da dose de AZA (terapia com AZA: 150 mg/dia, terapia associada: 50,0 mg/dia) e a diminuição significativa dos níveis de 6-MMP (802,5 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) em comparação com o grupo de pacientes sob terapia com AZA (1052,8 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos). Tais resultados confirmam os achados de vários autores sobre a inibição da enzima xantina oxidase (XO) e, conseqüentemente, a diminuição dos níveis do metabólito 6-MMP e possíveis reduções nas ocorrências de hepatotoxicidade, permitindo aos pacientes a continuidade da terapia com tiopurinas (Czaja, 2020; Thomsen et al., 2020; Van Gennepe et al., 2019; Wilson et al., 2021).

Assim como em outros estudos, foi possível observar uma ampla variação interindividual nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em todos os intervalos de 6-TGN (4,5 a 2455,8 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) e de 6-MMP (25,8 a 97800,2 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), permanecendo, a grande maioria dos indivíduos com parâmetros normais, conforme os valores limítrofes definidos pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (Dacie, 2017; Smith et al., 2012). É importante ressaltar que não foram observadas diferenças estatísticas significativas em outros resultados hematológicos e bioquímicos entre os grupos de terapia com AZA e terapia combinada, indicando que o aumento nas concentrações de 6-MMP não se refletiu em outras medidas clínicas avaliadas.

Em muitos estudos, as diferenças na eficácia terapêutica ou na toxicidade das tiopurinas são parcialmente explicadas pela formação variável de metabólitos ativos devido a polimorfismos em genes que codificam enzimas cruciais para o metabolismo desses fármacos (Ding et al., 2021). As variações enzimáticas individuais da TPMT, uma das enzimas mais importantes no metabolismo da AZA, da ITPA, XO/XDH e HPRT parecem influenciar de forma variável na concentração dos metabólitos das tiopurinas, correlacionando-se com a eficácia e os efeitos adversos (Abuelsoud et al., 2021; Graham; Xavier, 2020; Van Den Bosch; Coenen, 2021; Zaman et al., 2019). Estudos que avaliaram os efeitos adversos e a atividade da TPMT mostram uma frequência em 0,3% da população de baixa ou nenhuma atividade enzimática ao passo que 11% apresentam atividade reduzida, apontando para a importância da avaliação das variantes genéticas de enzimas com preditora dos desfechos relacionados à farmacoterapia e, portanto, a genotipagem como uma ferramenta útil antes de se iniciar a terapia com AZA (Czaja, 2020; Dillon et al., 2020; Van Gennepe et al., 2019).

Em nosso estudo, os três alelos variantes da enzima TPMT, TPMT *2 (rs1800462: c.238G>C; p.[Ala80Pro]), TPMT *3A (rs1800460; rs1142345: c.[460G>A; 719A>G]; p.[Ala154Thr; Tyr240Cys]) e TPMT *3C (rs1142345: c.719A>G; p.[Tyr240Cys]), os quais se associam com atividades reduzidas da enzima quando comparadas ao alelo TPMT *1, estiveram presentes em uma frequência total de 8,7% da população de pacientes com DII incluídos no estudo. Tais achados da

distribuição dos alelos de menor frequências são semelhantes àqueles encontrados em outras populações, incluindo a brasileira (Tabelas 2 e 7 (Apêndice E)).

De maneira importante, nossos achados apontaram para níveis mais altos de 6-TGN em pacientes carregando pelo menos 1 cópia desses alelos variantes, quando comparado os pacientes TPMT*1/*1, ainda que tratados com doses usuais de AZA (Gráfico 4A). Esses resultados são compatíveis com os estudos funcionais que apontam que a presença de pelo menos um alelo variante (*2, *3A e *3C) da TPMT associa-se à redução na atividade enzimática, resultando em um aumento, não significativo, nas concentrações de 6-TGN. Esses dados corroboram os de outros autores, onde pacientes com alelos variantes podem metabolizar a AZA de forma mais lenta, levando a níveis mais elevados de 6-TGN, o que pode estar relacionado a uma melhor resposta terapêutica (Abuelsoud et al., 2021; Graham; Xavier, 2020; Van Den Bosch; Coenen, 2021; Zaman et al., 2019).

É bem conhecido que o fenótipo de baixa atividade TPMT altera o metabolismo da AZA, aumentando concentrações de 6-TGN e, também, o risco de mielossupressão. Desse modo, autores afirmam que a atividade normal ou alta TPMT leva a menores concentrações de 6-TGN devido ao aumento metabolismo e desvio para produção do metabólito 6-MMP. Em seus estudos, Jonason e colaboradores (2020) não encontraram correlação entre a atividade normal a alta da enzima TPMT e concentração dos metabólitos 6-TGN ou 6-MMP. Adicionalmente, não houve correlação com a dose de AZA (mg/kg) (Jonason et al., 2020). Achados semelhantes ao nosso estudo.

Quanto ao metabólito 6-MMP, observou-se que a presença de pelo menos um alelo variante da TPMT (*2, *3A e *3C) parece relacionar-se à diminuição nas concentrações de 6-MMP quando comparado aos pacientes homocigotos para o tipo selvagem, no entanto, não se alcançou nível de significância estatística (Gráfico 4B). Ademais, não foram encontradas diferenças significativas nos valores medianos de doses diárias de AZA entre os pacientes com genótipo selvagem da TPMT e aqueles com alelos variantes, indicando que a presença desses polimorfismos pode não afetar a dose de AZA necessária para atingir concentrações terapêuticas. Isso sugere que, embora os polimorfismos na TPMT influenciem a metabolização da AZA, outros fatores também podem contribuir para a resposta ao tratamento.

Nos pacientes com fenótipo de alta atividade enzimática de TPMT, há o favorecimento da produção de 6-MMP, com concentrações reduzidas de 6-TGN. Bradford e Shih (2011) e Wilson et al (2021) demonstraram, através de revisões e achados clínicos, que a adição de um inibidor da enzima XO, como por exemplo, o alopurinol, pode contribuir para a produção de 6-TGN sobre 6-MMP, resultando em atividade melhorada de doença, conforme medido pelo índice de *Harvey-Bradshaw* e índice de *Truelove and Witts* (Bradford; Shih, 2011; Wilson et al., 2021). Neste sentido, nossos resultados também destacam diferenças nas concentrações de metabólitos entre pacientes

tratados com AZA e aqueles que receberam terapia combinada com alopurinol ou medicamentos biológicos, como infliximabe. Essas diferenças sugerem que a combinação de AZA com outros medicamentos pode modular a metabolização das tiopurinas e, portanto, influenciar a eficácia e segurança do tratamento.

Sabe-se que grande variabilidade individual na atividade da enzima TPMT pode afetar vários padrões de metabólitos e resultados de tratamento farmacológico. Em populações brancas, a atividade intermediária ou baixa da TPMT foi associada à presença dos alelos TPMT *2, TPMT *3A e TPMT *3C. Em populações afro-americanas e asiáticas, TPMT *3C foi o alelo polimórfico predominante, com redução de 48,5% na produção de 6-TGN, sendo a atividade TPMT 17% menor em pretos americanos do que em brancos (Czaja, 2020; Lin et al., 2021).

Essas descobertas são consistentes com os resultados de muitos outros estudos, como o estudo clínico conduzido por Hamdy et al. (2003), que concluiu que a frequência do alelo do tipo selvagem foi de 97%. O genótipo TPMT *1/*3A foi detectado em um paciente, enquanto TPMT *1/*3C foi detectado em cinco indivíduos. Assim como o nosso estudo, Hamdy et al. (2003) não encontraram nenhum paciente carregando o alelo TPMT*3B nem pacientes homocigotos para os alelos variantes (Hamdy et al., 2003).

Em nosso estudo, 91,3% dos participantes apresentaram genótipo TPMT*1/*1 (possivelmente com atividade normal da enzima), ao passo que 8,7% exibiram genótipo heterocigoto (possivelmente com atividade intermediária ou baixa da enzima). Esses resultados corroboram o estudo clínico realizado por Reis et al. (2003) que quantificou a atividade enzimática TPMT em 306 brasileiros e observou-se uma distribuição trimodal normal (89,9%), intermediária (9,8%) e genótipos de baixa atividade TPMT (0,3%), sendo este com risco muito elevado de toxicidade grave quando exposto às doses padrão de tiopurinas (Reis et al., 2003).

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre os valores medianos das doses de AZA dos pacientes com genótipo homocigoto selvagem da TPMT (150 mg/dia) e os heterocigotos com alelo variante (125 mg/dia). Também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação aos valores medianos das doses diárias de AZA dos pacientes com genótipo homocigoto e heterocigoto para as demais enzimas analisadas.

Além das variações genéticas da TPMT, um polimorfismo no gene da XO/XDH (rs17323225) também mostrou uma associação significativa com as concentrações de 6-MMP. A presença do alelo variante neste gene resultou em concentrações mais elevadas deste metabólito em comparação aos pacientes com o genótipo selvagem. Da mesma forma, outro polimorfismo no gene da XO/XDH (rs1884725) mostrou uma associação significativa com as concentrações de 6-TGN, onde a presença do alelo variante também foi associada a níveis mais elevados desse metabólito, quando comparado aos pacientes com o genótipo selvagem. Esses resultados sugerem que a atividade da

XO possa ser influenciada pelo polimorfismo genético estudado, podendo impactar na metabolização da AZA e, conseqüentemente, a resposta ao tratamento.

Esse dado torna-se particularmente interessante, visto que a frequência do alelo polimórfico no rs1884725 da XO (A=20%) na população estudada é substancialmente superior à frequência dos alelos variantes da TPMT (Tabela 3). Embora esses achados sejam interessantes, estudos de replicação com amostras maiores de pacientes são necessários para confirmar esses resultados.

A XO está entre as principais enzimas para o catabolismo das tiopurinas, mas sua influência na resposta metabólica não foi estudada extensivamente. XO/XDH é provavelmente a enzima mais importante que determina a biodisponibilidade da tiopurina, 16% a 72% para AZA e 5% a 37% para 6-MP, e é responsável por sua alta variação (Ding et al., 2021).

Polimorfismos no gene que codifica para essa enzima XO/XDH têm sido pouco estudados em pacientes com DII. No entanto, foi demonstrado em estudo clínico de Ding e colaboradores (2021) que a influência de dois polimorfismos de nucleotídeo único (T1936C and T2107C) no gene XO/XDH tem efeito na toxicidade, nos parâmetros hematológicos e nos níveis do metabólito tiopurina em pacientes com DII. Dos 92,5% dos pacientes com DII, três eram heterozigotos para ambos os alelos XO/XDH (T1936C e T2107C) e apresentaram dois ou mais efeitos adversos simultaneamente. Autores ressaltam que os polimorfismos genéticos de XO/XDH e outros fatores que também possam afetar a atividade enzimática devem ser considerados em estudos futuros (Ding et al., 2021).

Ainda que exista razoabilidade quanto ao papel dos polimorfismos genéticos na atividade da XO e na metabolização das tiopurinas, sabe-se que a oxidação do MP é significativamente influenciada não apenas pelo estado de atividade individual da XO, mas também, pela ingestão dietética de purinas, da dose de tiopurina e do uso de medicamentos complementares; portanto, a medição da atividade XO não parece ser o fator determinante da oxidação real da tiopurina e, portanto, até o momento, não é possível prever com segurança a resposta e a toxicidade da tiopurina com base exclusivamente no genótipo para XO ou na fenotipagem da enzima (Moon; Loftus, 2016).

Além das variações genéticas mencionadas, um polimorfismo no gene da ITPA (rs1127354) também demonstrou uma associação significativa com as concentrações de 6-TGN. A presença do alelo variante neste gene foi associada a concentrações mais elevadas deste metabólito em comparação aos pacientes com o genótipo selvagem. Em relação à outra enzima analisada, a HPRT, não foram encontradas associações significativas dos genótipos e as concentrações de metabólitos da AZA.

A análise dos 13 polimorfismos genéticos relacionados às enzimas de metabolização não revelou diferenças estatisticamente significativas na frequência desses polimorfismos entre os grupos de pacientes com a doença em atividade e em remissão. No entanto, é importante considerar

que a frequência alélica baixa para alguns polimorfismos e o tamanho da amostra podem ter influenciado esses resultados, destacando a necessidade de estudos adicionais com amostras maiores para elucidar o papel dos polimorfismos genéticos neste desfecho clínico avaliado (remissão x atividade da doença).

Em uma análise de regressão logística binomial para identificar fatores associados ao status clínico de remissão ou atividade da doença, nenhum dos polimorfismos de TPMT, ITPA (rs9101, rs1127354, rs7270101) HPRT (rs1468266), XO/XDH (rs4407290, rs17323225, rs1884725, rs2295475, rs17011368) apresentou associação significativa com o status clínico. No entanto, os níveis de 6-TGN foram fortemente associados à remissão, destacando-se como um preditor importante para a remissão da doença. Em contraste, os níveis de 6-MMP não apresentaram associações consistentes. Além disso, o polimorfismo ITPA rs8362 foi significativamente associado a uma maior probabilidade de remissão, sugerindo que, entre os fatores genéticos analisados, este polimorfismo, juntamente com os níveis de 6-TGN, pode desempenhar um papel relevante na modulação do status clínico da doença.

No que se refere aos estudos envolvendo os polimorfismos no gene da ITPA, nossos achados na população atendida no ambulatório do HU/UFJF, aproxima-se das frequências encontradas na população americana (Tabela 7 (Apêndice E)). Estudos funcionais apontam que as variantes no gene ITPA estão associadas à diminuição da atividade para 25 a 60% da atividade normal, com frequências homozigotas de 9,3 a 13,6% ITPA rs1127354; 19,8 a 25,3% ITPA rs7270101, e 68,9% para genótipo ITPA selvagem (Palmieri et al., 2007; Peltenburg et al., 2015; Van Den Bosch; Coenem, 2020; Zaman et al., 2019).

Em seus estudos clínicos, Peltenburg et al. (2015) encontraram distribuição diferente àquelas encontradas em nosso estudo quanto aos alelos selvagens rs9101 (76%), variantes alélicas relacionados com o polimorfismo rs7270101 (6%) e variantes rs1127354 (20%). Os autores não pesquisaram o polimorfismo ITPA c.138G>A (Peltenburg et al., 2015). Em relação à atividade normal de ITPA associada à redução de hemoglobinas, Peltenburg et al. (2015) encontraram 38,8% de pacientes com atividade normal com redução da hemoglobina com 18% dos pacientes anêmicos. Outros estudos evidenciaram a relação do polimorfismo ITPA rs1127354 e a redução significativamente menor de hemoglobinas (27,1%) em comparação com o genótipo selvagem ITPA (91,5%), o mesmo observado com o polimorfismo ITPA rs7270101 porém sem diferença na frequência de anemia ($p=0,32$), evidenciando a relação entre atividade normal da enzima ITPA com anemia, além da relação com leucopenia e mielossupressão (El Raziky et al., 2017; Eltantawy et al., 2023; Peltenburg et al., 2015).

Em estudos de revisão, a diminuição da atividade de ITPA (rs9101, rs8362, rs1127354, rs7270101) foi associada a efeitos adversos como febre, leucopenia, neutropenia e toxicidade

hepática com aumento de TGP/ALT, durante o tratamento com AZA e 6-MP, enquanto outros estudos não conseguiram reproduzir este achado. As toxicidades de AZA e 6-MP tendem a ser maiores entre os pacientes carregando alelos variantes em comparação com o tipo selvagem (Czaja, 2020; Van Den Bosch; Coenen, 2021).

Em um estudo com 120 pacientes com DII investigando se a atividade do HPRT estava correlacionada com o metabolismo e a toxicidade da tiopurina, foi apontado que a atividade enzimática foi significativamente maior em pacientes com leucopenia do que sem essa reação. Uma correlação positiva entre a atividade do HPRT e a concentração de 6-TGN foi encontrada em pacientes com leucopenia, mostrando que a atividade do HPRT está relacionada ao metabolismo da tiopurina e à leucopenia no tratamento da DII. No entanto, o estado de conhecimento ainda é insuficiente para determinar a importância do HPRT para prever e evitar efeitos adversos relacionados à tiopurina (Moon; Loftus, 2016).

Em relação às complicações quanto ao uso da AZA, detectamos queixas como artralgia, dor abdominal, linfopenia, neutropenia, leucopenia, enjoos/náuseas/vômitos, e em menor porcentagem anemia, queda de cabelo, dor de cabeça e dor no abdômen, pele ressecada. Apesar da ocorrência das manifestações clínicas, nenhum paciente, durante o estudo, teve a dose de AZA modificada ou suspensa e não ocorreu nenhum caso de malignidade em nossos achados.

Os pacientes que relataram efeitos adversos eram predominantemente do grupo com genótipo selvagem para todas as enzimas analisadas. Além disso, a maioria desses pacientes estava em terapia com AZA. Isso sugere que pacientes com genótipo selvagem podem estar mais suscetíveis a certos efeitos adversos do tratamento com AZA. Por outro lado, pacientes com alelos variantes podem apresentar menos queixas relacionadas à terapia, indicando uma possível relação entre os polimorfismos genéticos investigados e a tolerância ao tratamento.

Ao analisar as queixas dos pacientes quanto aos efeitos terapêuticos e adversos ou quanto à intolerância ao tratamento, observou-se correlação entre a enzima hepática (TGO/AST) com polimorfismos na enzima ITPA (rs7270101) e a terapia farmacológica, evidenciando que valores altos da enzima TGO/AST estão correlacionados com pacientes carregando pelo menos um gene variante na enzima ITPA em comparação com os pacientes que apresentam alelo selvagem, corroborando que pacientes com polimorfismos retêm purinas na forma de 6-TITP, metabólito tóxico. Ressaltamos que esses valores enzimáticos estão dentro dos parâmetros normais e nenhum paciente relatou hepatotoxicidade.

Jonason e colaboradores (2020) não identificaram, em seus achados clínicos, correlação dos níveis de metabólitos 6-TGN ou 6-MMP com série branca, ALT ou creatinina. Isso pode estar relacionado ao viés de seleção como aqueles que desenvolveram leucopenia ou ALT elevada no início do tratamento provavelmente sofreram redução da dose ou descontinuação antes das

avaliações dos metabólitos do fármaco. No geral, a elevada taxa de leucopenia e transaminases foram pouco frequentes, limitando nossa capacidade para detectar uma correlação (Jonason et al., 2020).

Houve associações entre os polimorfismos nos genes da XO/XDH e os parâmetros hematológicos, como linfopenia e neutropenia. Pacientes com o alelo polimórfico relataram mais queixas relacionadas à terapia com AZA em comparação com aqueles com alelos selvagens, o que é esperado visto que a enzima com polimorfismo apresenta atividade reduzida, metabolizando menos 6-MP em 6-MMP. Ademais, observamos que pacientes com polimorfismo na enzima XO/XDH (rs1884725 e rs17323225) apresentaram linfopenia e neutropenia. Embora tenha havido relatos de neutropenia e linfopenia induzidas por tiopurina, nenhum paciente teve interrupção do tratamento com AZA, havendo ajuste de dose e dois casos de associação com alopurinol.

Em seus achados clínicos, Ding et al (2021) evidenciaram que quatro pacientes apresentaram dois ou mais efeitos adversos simultaneamente relacionados à influência do polimorfismo no gene XO (rs17323225 e rs17011368). Dois deles apresentavam leucopenia acompanhada de intolerância gastrointestinal, um deles tinha alopecia acompanhada pela leucopenia, outro paciente teve alopecia acompanhada de problemas gastrointestinais intolerância e um último paciente apresentou três efeitos adversos simultaneamente leucopenia, sintomas semelhantes aos da gripe e intolerância gastrointestinal (Ding et al., 2021).

Estudos clínicos ressaltaram que a frequência dos genótipos polimórficos da TPMT aumentaram significativamente no grupo de pacientes com efeitos adversos (11%) em comparação com grupo de pacientes saudáveis (4,1%), onde os genótipos polimórficos da TPMT foram significativamente mais frequente em pacientes que apresentaram leucopenia (26,1%). Dois pacientes homocigotos para TPMT *3A apresentaram mielossupressão induzida por tiopurinas (Leucócitos < 1000 mm³) com apenas duas semanas de terapia. Em relação ao polimorfismo rs1127354 do gene ITPA, a frequência de eventos adversos (13,6%) não foi significativamente diferente do grupo saudável (11,4%) (Abuelsoud et al., 2021; Lee et al., 2021; Palmieri et al., 2007).

Em uma revisão sistemática, nove estudos sobre ITPA e o risco de leucopenia induzida por tiopurinas foram incluídos, com um total de 1862 pacientes e apenas um estudo evidenciou um risco limítrofe significativo de 3,5 vezes maior para os pacientes carregadores da variante ITPA rs1127354 desenvolverem leucopenia. Nos demais estudos, nenhuma associação entre os polimorfismos ITPA rs1127354 ou rs7270101 e leucopenia foi encontrada (Van Gennepe et al., 2019). Eltantawy et al (2023) relataram em uma revisão de literatura que pacientes com deficiência de ITPA experimentaram mais toxicidade relacionada às tiopurinas. A ITPA converte 6-TIMP em 6-tio IMP fosforilado, um metabólito intermediário de AZA/6-mercaptopurina, assim, em pacientes

com deficiência de ITPA, o 6-TITP é acumulado, levando a RAMs como mielossupressão (Eltantawy et al., 2023)

Correlacionando os genótipos da ITPA e as complicações relatadas, observou-se que os pacientes com genótipo do tipo selvagem e os polimórficos (heterozigotos e homozigotos) apresentaram números semelhantes de queixas relacionadas à terapia AZA sem correlação com os polimorfismos genéticos investigados. No entanto, a ocorrência de artralgia foi predominante em pacientes com genótipo do tipo selvagem para os genes IPTA (rs9101, rs8362, rs1127354 e rs7270101), achados semelhantes a dados clínicos já descritos na literatura (El Raziky et al., 2017; Palmieri et al., 2007).

Em relação à enzima HPRT (rs 1468266), observou-se leucometria normal nos pacientes com genótipo selvagem, ou seja, possivelmente com atividade normal a alta da enzima. Tal fenótipo da enzima eleva a síntese de 6-TGN, substratos antagonistas da enzima HPRT, que são incorporados ao DNA como falsos metabólitos (antimetabólitos), interferindo na síntese proteica, prejudicando a replicação do DNA, resultando assim em parada do ciclo celular e apoptose, levando à mielossupressão causada por leucopenia (Turbayne; Sparrow, 2022).

No que se refere aos aspectos farmacogenéticos investigados em nosso estudo, vale destacar que este é o primeiro trabalho conduzido com os pacientes atendidos pelo Centro de DII do HU/CAS-UFJF. Tal Centro possui ampla abrangência, atendendo a microrregião de Juiz de Fora, além de outras cidades próximas do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Assim, as frequências alélicas e genóticas dos 13 SNPs investigados associados à farmacocinética das tiopurinas, contribui para ampliar as informações genéticas referentes à população brasileira.

Dentre as limitações do nosso estudo, destacam-se o poder de associação estatística em relação ao tamanho da amostra e a natureza retrospectiva dos dados, fatores que podem influenciar a interpretação dos resultados e destacam a necessidade de estudos envolvendo maior número de participantes. Assim, estudos de replicação em outras populações devem considerar o aumento do número de pacientes com DII avaliados.

Ademais, análises considerando haplótipos foram realizadas, além de análises multivariadas que consideraram as diversas variáveis coletadas. Em suma, os resultados do estudo fornecem uma visão abrangente sobre o tratamento da DII com AZA, enfatizando a importância da avaliação clínica, genética e farmacocinética na personalização da terapia. Esses achados têm implicações significativas para a prática clínica e reforçam a necessidade contínua de abordagens individualizadas e baseadas em evidências no manejo da DII.

7 CONCLUSÃO

A aplicabilidade do método desenvolvido pela equipe permitiu a determinação das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e 6-MMP de modo preciso e confiável, tendo os valores obtidos neste estudo corroborados pela literatura científica relatada. Observamos ainda que os pacientes que estavam em terapia combinada AZA e alopurinol apresentaram melhor remissão clínica, com diminuição da dosagem de AZA e diminuição significativa dos níveis de 6-MMP em comparação com o grupo de pacientes sob terapia com AZA, confirmando os achados de vários autores sobre a inibição da enzima XO, e conseqüentemente a diminuição dos níveis do metabólito 6-MMP. Outra evidência observada foi a de que pacientes em remissão apresentaram níveis significativamente mais altos de 6-TGN do que aqueles com doença em atividade.

Os resultados destacam a complexidade do manejo da DII e a importância de uma abordagem que leve em consideração não apenas a eficácia terapêutica, mas também a segurança e a tolerabilidade do tratamento. Fornecem ainda uma visão abrangente do tratamento da DII com AZA, destacando a importância da avaliação clínica, genética e farmacocinética na personalização da terapia.

Esses achados têm implicações significativas para a clínica e destacam a necessidade contínua de abordagens individualizadas e baseadas em evidências no manejo da DII, detacando a importância do monitoramento cuidadoso dos pacientes em tratamento com AZA, incluindo a avaliação de efeitos adversos, as concentrações de metabólitos e a atividade da doença. Essas informações podem orientar a prática clínica, permitindo uma abordagem mais personalizada e eficaz no manejo dessa condição complexa. No entanto, são necessárias mais pesquisas para validar esses achados e determinar seu impacto clínico a longo prazo.

Os polimorfismos genéticos, especialmente aqueles relacionados à TPMT e XO/XDH, desempenham um papel importante na metabolização das tiopurinas e na resposta ao tratamento em pacientes com DII. Além disso, a combinação de AZA com outros medicamentos pode influenciar a metabolização das tiopurinas, destacando a importância de uma abordagem personalizada no manejo terapêutico da DII.

Ressanta-se ainda a importância dos polimorfismos genéticos na metabolização das tiopurinas e na resposta ao tratamento em pacientes com DII. Além disso, fornecem *insights* sobre como esses polimorfismos podem influenciar a ocorrência de reações adversas, a tolerância ao tratamento e os parâmetros hematológicos dos pacientes. Essas informações podem ser úteis para desenvolver estratégias de tratamento mais personalizadas e eficazes para indivíduos com DII.

8 AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Ministério da Saúde do Brasil e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro (PPSUS/FAPEMIG - Número do subsídio # APQ-03823-17), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa .

REFERÊNCIAS

- ABUELSOUD, N.; FAYED, H.; ELKATEEB, E. The Association Between Azathioprine Genetic Polymorphisms, Clinical Efficacy and Adverse Drug Reactions Among Egyptian Patients with Autoimmune Diseases. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, v. 14, p. 179, 2021.
- AL MARUF, A.; WAN, L.; O'BRIEN, J. Evaluation of Azathioprine - Induced Cytotoxicity in an In Vitro Rat Hepatocyte System, Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Article ID 379748, 7 pages, 2014.
- ANANDI, P. et al. Combining clinical and candidate gene data into a risk score for azathioprine-associated leukopenia in routine clinical practice. *The pharmacogenomics journal*, v. 20, n. 5, p. 736-745, 2020.
- ANDOH, A. et al. Immunomodulator and inflammation Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 23, p. 1373–1377, 2008.
- ANDOH, A.; KAWAHARA, M.; IMAI, T.; TATSUMI, G.; INATOMI, O.; KAKUTA, Y. Thiopurine pharmacogenomics and pregnancy in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.*, v. 56, n. 10, p.881-890, 2021.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consultas em Bulário eletrônico, [20--?]. Disponível em:<<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario>> Acessado em: 09 de junho 2021.
- BANGMA, A., et al. Predicted efficacy of a pharmacogenetic passport for inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 51, n. 11, p. 1105–1115, 2020.
- BATRA, A., et al. Genetic Variants and Thiopurine Metabolism in Inflammatory Bowel Disease: A Focus on TPMT, ITPA, and XO Polymorphisms. *Journal of Clinical Gastroenterology*. V. 57, n. 2, p. 112-121, 2023.
- BEAUGERIE, L.; RAHIER, J. F.; KIRCHGESNER, J. Predicting, preventing, and managing treatment-related complications in patients with inflammatory bowel diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 18, n. 6, p. 1324-1335. e2, 2020.
- BECHARA, C. S.; FILHO, A. L.; FERRARI, M. L. F.; ANDRADE, D. A. R.; LUZ, M. M. P.; SILVA, R. G. Caracterização de pacientes operados por DC pela classificação de Montreal e identificação de fatores preditores de sua recorrência cirúrgica. *Rev. Col. Bras. Cir.*; v. 42, n. 2, p. 097-105, 2015a.
- BERÁNEK, M. et al. Preparing Triple-Compound Heterozygous Control Material for Molecular Diagnostics of TPMT Allelic Variants. *Folia Biologica (Praha)*, v. 61, p. 91-96, 2015.
- BEST, W. R. Predicting the Crohn's disease activity index from the *Harvey-Bradshaw* Index. *Inflamm Bowel Dis*, v. 12, n. 4, p. 304-10, 2006.
- BINSHECK, T.; MEYER, H.; WELLHÖNER, H. H. High-performance liquid chromatographic assay for the measurement of azathioprine in human serum samples. *Journal of chromatography B: Biomedical sciences and Applications*, v. 675, n. 2, p. 287-294, 1996.

- BOTTON, M. R. et al. Pharmacogenomics in Latin American Populations. *Pharmacogenomics*, p. 329-368, 2019.
- BRADFORD, K.; SHIH, D. Q. Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, v. 17, n. 37, p. 4166-73, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Crohn [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 604 p., 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Retocolite Ulcerativa [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 44 p., 2020.
- BROEKMAN, M. M T. J., et al. More Dose-dependent Side Effects with mercaptopurine over Azathioprine in IBD Treatment Due to Relatively Higher Dosing. *Inflamm Bowel Dis*, v. 0, n. 0, 2017.
- BROEKMAN, M. M.; ROELOFS, H. M.; WONG, D. R.; KERSTHOLT, M.; LEIJTEN, A.; HOENTJEN, F.; PETERS, W. H.; WANTEN, G. J.; DE JONG, D. J. Allopurinol and 5-aminosalicylic acid influence thiopurine-induced hepatotoxicity in vitro. *Cell Biol Toxicol*, v. 31, n. 3, p. 161-71, 2015.
- BRUNTON, L.L.; GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.
- BURGIS, N. E. et al. An ITPA Enzyme with Improved Substrate Selectivity. *The Protein Journal*, p. 1-10, 2023.
- BURISCH, J.; MUNKHOLM, P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, v. 50, n. 8, p. 942-51, 2015.
- CARD, T. R.; LANGAN, S. M.; CHU, T. P. Extra-Gastrointestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease May Be Less Common Than Previously Reported. *Dig Dis Sci*, 2016.
- CARVALHO, A. T. et al. Thiopurine-methyltransferase variants in inflammatory bowel disease: prevalence and toxicity in Brazilian patients. *World J Gastroenterol*, v. 20, n. 12, p. 3327-34, 2014.
- CHANG, J. Y. et al. Genotype-based treatment with thiopurine reduces incidence of myelosuppression in patients with inflammatory bowel diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 18, n. 9, p. 2010-2018. e2, 2020.
- CHEBLI, J. M. et al. Hypertransaminasemia following withdrawal of thiopurine therapy in an ulcerative colitis patient: mind looking the small bowel! *Int J Colorectal Dis*, v. 30, n. 12, p. 1737-8, 2015.
- CHEBLI, J. M. et al. Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 22, n. 2, p. 268-74, 2007.

- CHEN, S. et al. An intronic FTO variant rs16952570 confers protection against thiopurine-induced myelotoxicities in multiethnic Asian IBD patients. *The pharmacogenomics journal*, v. 20, n. 3, p. 505-515, 2020.
- CHEN, Z. Y. et al. Association between genetic polymorphisms of metabolic enzymes and azathioprine-induced myelosuppression in 1,419 Chinese patients: A retrospective study. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 672769, 2021.
- CHOUNG, R. S. et al. Serologic microbial associated markers can predict Crohn's disease behaviour years before disease diagnosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 43, n. 12, p. 1300-1310, 2016.
- COLLI, M. V.; AMARO, T. A.; PINTO, A. L.; GABURRI, P. D.; CHEBLI, J. M. Azathioprine toxicity in Crohn's disease: incidence, approach and course. *Rev Assoc Med Bras*. n. 54(5): p. 415-421, 2008.
- COLOMBEL, J. F. et al. Outcomes and strategies to support a treat-to-target approach in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 14, n. 2, p. 254-266, 2020.
- CRAVO, M. et al. Clinical and genetic factors predicting response to therapy in patients with Crohn's disease. *United European gastroenterology journal*, v. 2, n. 1, p. 47-56, 2014.
- CROHN, B. B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G. D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med*, v. 67, n. 3, p. 263-8, 2000.
- CROHN, Burrill B.; GINZBURG, Leon; OPPENHEIMER, Gordon D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *The American Journal of Medicine*, v. 13, n. 5, p. 583-590, 1952.
- CUFFARI, C. Azathioprine/6-Mercaptopurine Metabolism in Ulcerative Colitis: A Guide to Metabolite Assessment - An Evidence-Based Approach. In: *Medical Therapy of Ulcerative Colitis*. Springer New York, p. 145-151, 2014.
- CURKOVIC, I. et al. Low allopurinol doses are sufficient to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease patients with inadequate thiopurine metabolite concentrations. *European journal of clinical pharmacology*, v. 69, n. 8, p. 1521-1531, 2013.
- CZAJA, A. J. opportunities to improve and expand thiopurine therapy for autoimmune hepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 51, n. 12, p. 1286-1304, 2020.
- DA ROCHA, C. A. M.; BURBANO, R. Gene HPRT1: metabolismo de purinas e síndrome de Lesch-Nyhan. *Genética na Escola*, v. 10, n. 2, p. 178-185, 2015.
- DA SILVA VENITO, Lucas; SANTOS, Mila Schiavini Beiriz; FERRAZ, Adriana Rodrigues. Doença de Crohn e retocolite ulcerativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 15, n. 7, p. e10667-e10667, 2022
- DACIE, J.V. Dacie and Lewis practical haematology. Adaptado para o Programa Nacional de Controle de Qualidade Brasileiro (PNCQ). Elsevier Health Sciences, 12th Edition, 2017.
- DERVIEUX, T.; BOULIEU, R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clinical Chemistry*, v. 44, n. 3, p. 551-555, 1998.

- DILLON, D. L.; CRIMALDI, J. E. Pathway-Driven Management of Inflammatory Bowel Disease. *The Journal for Nurse Practitioners*, v. 16, n. 7, p. 493-497, 2020.
- DING, L. et al. Xanthine oxidase activity in thiopurine curative Chinese inflammatory bowel disease patients. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 9, n. 3, p. e00764, 2021.
- DUBINSKY, M. C. et al. A cost-effectiveness analysis of alternative disease management strategies in patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. 2005.
- DUIJVESTIEN, M. et al. Novel therapies and treatment strategies for patients with inflammatory bowel disease. *Current treatment options in gastroenterology*, v. 16, n. 1, p. 129-146, 2018.
- EL RAZIKY, M. et al. ITPA gene polymorphism (94C>A) effects on ribavirin-induced anemia during therapy in Egyptian patients with chronic hepatitis C. *Journal of medical virology*, v. 89, n. 10, p. 1823-1829, 2017.
- ELTANTAWY, N. et al. Azathioprine and biological treatment genetic association with clinical response and toxicity in inflammatory bowel disease patients. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences. Assiut*, v. 46, n. 1, p. 305-330, 2023.
- FERREIRA, G. S.; DE DEUS, M. H. A.; JUNIOR, E. A. Fisiopatologia e etiologias das doenças inflamatórias intestinais: uma revisão sistemática de literatura Pathophysiology and etiologies of the inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 4, p. 17061-17076, 2021.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling. Disponível no endereço: <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>. Acesso em: 23 de maio de 2024.
- FRANCA, R.; ZUDEH, G.; PAGARIN, S.; RABUSIN, M.; LUCAFÒ, M.; STOCCO, G.; DECORTI, G. Pharmacogenetics of thiopurines. *Cancer Drug Resist*, v. 2, p. 256-270, 2019.
- FRANCONI, F. et al. Gender differences in drug responses. *Pharmacological research*, v. 55, n. 2, p. 81-95, 2007.
- GEARRY, R. B.; BARCLAY, M. L. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 20, n. 8, p. 1149-57, 2005.
- GELLER, S. A.; DE CAMPOS, F. P. Crohn disease. *Autops Case Rep*, v. 5, n. 2, p. 5-8, 2015.
- GRAHAM, D. B.; XAVIER, R. J. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 578, n. 7796, p. 527-539, 2020.
- GREUTER, T.; VAVRICKA, S. R. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease—epidemiology, genetics, and pathogenesis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, v. 13, n. 4, p. 307-317, 2019.
- GUAN, Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of immunology research*, v. 2019, 2019.
- HAMDY, S. I. et al. Genotype and allele frequencies of TPMT, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 55, n. 6, p. 560–569, 2003.

- HANDE, S. et al. 5-aminosalicylate therapy is associated with higher 6-thioguanine levels in adults and children with inflammatory bowel disease in remission on 6-mercaptopurine or azathioprine. *Inflammatory bowel diseases*, v. 12, n. 4, p. 251-257, 2006.
- HAWWA, A. F. et al. Development and validation of an HPLC method for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma and red blood cells. *J Pharm Biomed Anal*, v. 49, n. 2, p. 401-9, 2009.
- HAZEL, K.; O'CONNOR, A. Emerging treatments for inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in chronic disease*, v. 11, p. 2040622319899297, 2020.
- HOUWEN, J.P.A.; EGBERTS, A.C.G.; DE BOER, A.; VAN MAARSEVEEN, E.M.; HOUWEN, R.H.J.; LALMOHAMED, A. Influence of allopurinol on thiopurine associated toxicity: A retrospective population-based cohort study. *Br J Clin Pharmacol.*, v. 87, n. 5, p. 2333-2340, 2021.
- HUANG, Z.; LIU, X.; YANG, F.; WANG, G.; GE, N.; WANG, S.; GUO, J.; SUN, S. Diagnostic efficacy of double-balloon enteroscopy in patients with suspected isolated small bowel Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.*, v. 20, n. 1, p.42, 2020.
- IBORRA, M. et al. Withdrawal of Azathioprine in inflammatory bowel disease patients who sustain remission: new risk factors for relapse. *Digestive diseases and sciences*, v. 64, n. 6, p. 1612-1621, 2019.
- ITAGAKI, M. et al. Infliximab and immunosuppressant-resistant Crohn's disease successfully treated with adsorptive granulocyte apheresis combined with prednisolone. *Case Rep Gastroenterol*, v. 6, n. 1, p. 118-23, 2012. ISSN 1662-0631.
- JONASON, D. E. et al. Normal ranges of thiopurine methyltransferase activity do not affect thioguanine nucleotide concentrations with azathioprine therapy in inflammatory bowel disease. *Crohn's & Colitis 360*, v. 2, n. 3, p. otaa058, 2020.
- KARMIRIS, K. et al. Prevalence and Characteristics of Extra-intestinal Manifestations in a Large Cohort of Greek Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, v. 10, n. 4, p. 429-36, 2016.
- KIM, M. J.; CHOE, Y. H. Monitoring and safety of azathioprine therapy in inflammatory bowel disease. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, v. 16, n. 2, p. 65-70, 2013.
- KIRCHHERR, H.; SHIPKOVA, M.; VON AHSEN, N. Improved method for therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine in whole-blood by LC/MSMS using isotope-labeled internal standards. *Therapeutic drug monitoring*, v. 35, n. 3, p. 313-321, 2013.
- KOH, S.J.; HONG, S.N.; PARK, S.K.; YE, B.D.; KIM, K.O.; SHIN, J.E.; YOON, Y.S.; LEE, H.S.; JUNG, S.H.; CHOI, M.; NA, S.Y.; CHOI, C.H.; KIM, J.S.; IBD Research Group of the Korean Association for the Study of Intestinal Diseases. Korean clinical practice guidelines on biologics for moderate to severe Crohn's disease. *Intest Res.*, v. 21, n. 1, p.43-60, 2023.
- KONIDARI, A.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; BONNETT, L. J., et al. Thiopurine monitoring in children with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol.*, v. 78, n. 3, p. 467-476, 2014.

- KOPYLOV, U.; BEN-HORIN, S.; SEIDMAN, E. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, v. 27, n. 4, p. 304, 2014.
- LEE, J. M. et al. The Effect of NUDT15, TPMT, APEX1, and ITPA Genetic Variations on Mercaptopurine Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Children*, v. 8, n. 3, p. 224, 2021.
- LEE, Y. et al. Effect of ITPA polymorphism on adverse drug reactions of 6-mercaptopurine in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 4, p. 416, 2022.
- LEE, J. M.; LEE, K. M. Endoscopic Diagnosis and Differentiation of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Endosc*, v. 49, n. 4, p. 370-5, 2016.
- LEITE, S. et al, Azatioprina na doença inflamatória intestinal, *Acta Med Port.*; v. 22, n. 1, pg. 33-40. 2009.
- LENNARD, L., SINGLETON, H. J. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 583, n. 1, p. 83-90, 1992.
- LIN, R. et al. Population pharmacokinetics of azathioprine active metabolite in patients with inflammatory bowel disease and dosage regimens optimisation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 128, n. 3, p. 482-492, 2021.
- LIU, Y. P.; XU, H. Q.; LI, M.; YANG, X.; YU, S.; FU, W. L.; HUANG, Q. Association between Thiopurine S-Methyltransferase Polymorphisms and Azathioprine-Induced Adverse Drug Reactions in Patients with Autoimmune Diseases: A Meta-Analysis. *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0144234, 2015.
- MAGRO, F. et al. Inflammatory Bowel Disease-non-biological treatment. *Pharmacological Research*, p. 105075, 2020.
- MALLICK, B.; MALIK, S. Use of azathioprine in ulcerative colitis: a comprehensive review. *Cureus*, v. 14, n. 5, 2022.
- MATSUOKA, K. et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*, v. 53, n. 3, p. 305-353, 2018.
- MAK, W. Y. et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease: east meets west. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 35, n. 3, p. 380-389, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 184, de 3 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil. *Diário Oficial da União*, 2011.
- MISDAQ, M. et al. Thiopurines induce oxidative stress in T-lymphocytes: a proteomic approach. *Mediators Inflamm*, v. 2015, p. 434825, 2015.
- MOON, W.; LOFTUS JR, E. V. Recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 43, n. 8, p. 863-883, 2016.

- MORADVEISI, B. et al. ITPA, TPMT, and NUDT15 genetic polymorphisms predict 6-mercaptopurine toxicity in middle eastern children with acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in pharmacology*, v. 10, p. 916, 2019.
- MORALES, A.; SALGUTI, S.; CHUAN L. M.; LEWIS, J. D. Relationship Between 6-Mercaptopurine Dose and 6-Thioguanine Nucleotide Levels in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, v. 13, n. 4, p: 380–385, 2007.
- MULDER, D. J. et al. A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, v. 8, n. 5, p. 341-8, 2014.
- NAIDU et al. Validated stability-indicating rp-hplc assay method for azathioprine in pharmaceutical dosage form according to ich guidelines. *Int J Pharm Pharm Sci*, v. 6, n. 10, p: 301-307, 2014.
- NAIK, K. M.; NANDIBEWOOR, S. T. RP-HPLC Method for the Estimation of 6-Mercaptopurine in spiked human plasma and pharmaceutical formulations. *Journal of analytical chemistry*, v. 68, n. 12, p. 1085-1088, 2013.
- NAVRÁTIL, V.; CVEKOVÁ, S.; SLODIČKA, P.; AIGLOVÁ, K.; PIPEK, B.; FALT, P. Extraintestinal complications of inflammatory bowel diseases. *Vnitr Lek.*, v. 67, n. 2, p. 92-96, 2021.
- NEURATH, M. F. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 17, n. 2, p. 76-77, 2020.
- NO SUS–CONITEC, Incorporação de Tecnologias. Abatacepte para o tratamento da Artrite Reumatoide Moderada a Grave–1ª linha de tratamento com biológicos após falha a MMCDs sintéticos. 136, 2014.
- OLIVEIRA, B. M. et al. An improved HPLC method for the quantitation of 6-mercaptopurine and its metabolites in red blood cells. *Braz J Med Biol Res*, v. 37, n. 5, p. 649-58, 2004.
- PACHECO NETO, M. P. Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
- PACHECO NETO, M. P. et al. Pharmacokinetics of 6-thioguanine nucleotide and 6-methyl-mercaptopurine in a case of inadvertent combination therapy of azathioprine with allopurinol. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, n. suppl. 1, p. 14-17, 2012.
- PALMIERI, O. et al. Sequential evaluation of thiopurine methyltransferase, inosine triphosphate pyrophosphatase, and HPRT1 genes polymorphisms to explain thiopurines' toxicity and efficacy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 26, n. 5, p. 737-745, 2007.
- PAPACOSTA, N. G.; NUNES, G. M.; PACHECO, R. J.; CARDOSO, M. V.; GUEDES, V. R. Doença de Crohn: um artigo de revisão. *Revista de Patologia do Tocantins*, 4(2): 25-35, 2017.
- PAPALIA, I.; TJANDRA, D.; QUAH, S.; TAN, C.; GORELIK, A.; SIVANESAN, S.; MACRAE, F. Colon Capsule Endoscopy in the Assessment of Mucosal Healing in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.*, v. 15, n. 27, supplement 2, p. S25-S32, 2021.

PARIENTE, B.; LAHARIE, D. Review article: why, when and how to de-escalate therapy in inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 338-353, 2014.

PELTENBURG, N. C. et al. Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase activity: more accurate predictor for ribavirin-induced anemia in hepatitis C infected patients than ITPA genotype. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, v. 53, n. 12, p. 2021-2029, 2015.

PEREIRA, C. et al. DNA Damage and Oxidative DNA Damage in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 2016.

PETER, W. H. et al., Ensembl 2024, *Nucleic Acids Research*, Volume 52, Issue D1, 5 January 2024, Pages D891–D899, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1049>. Acesso em: 12 de julho de 2024.

PETIT, E; LANGOUET, S; AKHDAR, H; NICOLAS-NICOLAZ, C; GUILLOUZO, A; MOREL, F. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, n.22, p.632–642, 2008.

PICHE, T. et al. Impact of functional bowel symptoms on quality of life and fatigue in quiescent Crohn disease and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, v. 22, n. 6, p. 626-e174, 2010.

PIZZI, M. et al. Gastrointestinal Crohn-like disease following BCG therapy. *Int J Colorectal Dis*, v. 30, n. 12, p. 1745-6, 2015.

POCHARD, C. et al. The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 315, n. 1, p. G1-G11, 2018.

PREFONTAINE, E. et al. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 1, 2009.

RAMOS, G. P.; PAPADAKIS, K. A. Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, p. 155-165, 2019.

RASHID, M. M. U. et al. Influence of TPMT polymorphisms on azathioprine-induced myelosuppression in Bangladeshi patients with systemic lupus erythematosus. *Drugs & Therapy Perspectives*, p. 1-6, 2020.

RAZA, M. et al. A comparison of hepatoprotective activities of aminoguanidine and N-acetylcysteine in rat against the toxic damage induced by azathioprine. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 134, n. 4, p. 451-6, 2003.

REIS, M.; SANTORO, A.; SUAREZ-KURTZ, G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics*, v. 13, n. 6, p. 371–373, 2003.

RELLING, M. V. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 89, n. 3, p. 387-391, 2011.

RIBEIRO, A.C.; BARROSO, L.H.F.; MOURAO-JUNIOR, C.A.; CHEBLI, J.M.F.; NASCIMENTO, J.W.L. Simultaneous Monitoring of Azathioprine Metabolites in Erythrocytes of Crohn's Disease Patients by HPLC-UV. *J Chromatogr Sci.*, v. 60, n. 6, p. 518-524, 2022.

- RIBEIRO, A.C.; GERHEIM, P.S.A.S.; CHEBLI, J.M.F.; NASCIMENTO, J.W.L.; DE FARIA PINTO, P. The Role of Pharmacogenetics in the Therapeutic Response to Thiopurines in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *J Clin Med.*, v. 12, n. 21, p. 6742, 2023.
- RODRIGUEZ, S., GAUNT, T.R., DAY, I.N.M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American Journal of Epidemiology*, v. 169, n. 4, p. 505-514, 2009.
- ROMAN, M. et al. Validation of a genotyping method for analysis of TPMT polymorphisms. *Clin Ther*, v. 34, n. 4, p. 878-84, 2012.
- RUIZ, M.A.; JUNIOR, R.L.K.; PIRON-RUIZ, L.; SARAN, P.S.; CASTIGLIONI, L.; DE QUADROS, L.G.; PINHO, T.S.; BURT, R.K. Medical, ethical, and legal aspects of hematopoietic stem cell transplantation for Crohn's disease in Brazil. *World J Stem Cells.*, v. 12, n. 10, p. 1113-1123, 2020.
- SCHIRMER, Melanie et al. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2019.
- SÉVERINE, W.; XAVIER, D. K.; JEAN-CHARLES, C. A rare case of Azathioprine-induced leukopenia in an European woman. *Acta Clinica Belgica*, p. 1-5, 2020.
- SHI, H. Y. et al. Low-dose azathioprine is effective in maintaining remission in steroid-dependent ulcerative colitis: results from a territory-wide Chinese population-based IBD registry. *Therap Adv Gastroenterol*, v. 9, n. 4, p. 449-56, 2016.
- SHIN, J. Y. et al. Thiopurine Prodrugs Mediate Immunosuppressive Effects by Interfering with Rac1 Protein Function. *J Biol Chem*, v. 291, n. 26, p. 13699-714, 2016.
- SIMMONS, J.; JEWELL, D. Crohn Disease and Ulcerative Colitis. In: (Ed.). eLS: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- SINGH, A.; GUPTA, Y.K.; DHALIWAL, A.S.; KAHLON, B.K.; BANSAL, V.; MAHAJAN, R.; MEHTA, V.; SINGH, D.; KAUR, R.; BANSAL, N.; MIDHA, V.; SOOD, A. Inflammatory bowel disease (IBD)-disk accurately predicts the daily life burden and parallels disease activity in patients with IBD. *Intest Res.*, v. 21, n. 3, p. 375-384, 2023.
- SINGH, M. et al. Role of therapeutic drug monitoring of azathioprine and thiopurine methyltransferase enzyme status in patients with inflammatory bowel disease: Indian scenario. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, v. 9, n. 10, p. 1618, 2020.
- SMITH, M. A. et al. Optimising outcome on thiopurines in inflammatory bowel disease by co-prescription of allopurinol. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 6, n. 9, p. 905-912, 2012.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (47: 2013: São Paulo) Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica. – Barueri, SP. Manole, 2014.
- SOUSA, A. L. et al. Azatioprina na doença inflamatória intestinal: fatores preditivos da resposta sustentada a longo prazo. *GE Jornal Português de Gastrenterologia*, v. 21, n. 4, p. 147-154, 2014.

SPARROW, M. P. et al. Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathioprine or 6-mercaptopurine. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 5, n. 2, p. 209-214, 2007.

SRINIVASAN, A.; DE CRUZ, P.; VAN LANGENBERG, D. Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease: Optimising Therapeutic Effectiveness of Thiopurines. In: *Biomarkers in Inflammatory Bowel Diseases*. Springer, Cham, p. 233-241, 2019.

STEFAN, C. et al. Improved HPLC methodology for monitoring thiopurine metabolites in patients on thiopurine therapy. *Clinical Biochemistry*, 37, p. 764–771, 2004.

SUAREZ-KURTZ, G. et al. Implementation of a pharmacogenomic program in a Brazilian public institution. *Pharmacogenomics*, v. 21, n. 8, p. 549-557, 2020.

THOMSEN, S. B. et al. Outcome of concomitant treatment with thiopurines and allopurinol in patients with inflammatory bowel disease: A nationwide Danish cohort study. *United European gastroenterology journal*, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2020.

TRINDADE, M.; MORCERF, C. C. P.; ESPASANDIN, V. L. Terapia biológica na doença de Crohn: quando iniciar? *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2019.

TURBAYNE, A. K.; SPARROW, M. P. Low-dose azathioprine in combination with allopurinol: the past, present and future of this useful duo. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 67, n. 12, p. 5382-5391, 2022.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Health Sciences Libraries - Bio-Medical Library University of Minnesota. Disponível em: <<http://www-micromedexsolutions-com.ez>> 25. periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/CS/B599F9/ND_PR/

VAN ASSELDONK, D. P.; SEINEN, M. L.; DE BOER, N. K. H.; VAN BODEGRAVEN, A. A.; MULDER, C. J. Hepatotoxicity associated with 6-methyl mercaptopurine formation during azathioprine and 6-mercaptopurine therapy does not occur on the short-term during 6-thioguanine therapy in IBD treatment. *J Crohns Colitis*, v. 6, p. 95–101, 2012.

VAN DEN BOSCH, B. J.C.; COENEN, M. J. H. Pharmacogenetics of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics*, v. 22, n. 1, p. 55-66, 2021.

VAN GENNEP, S. et al. Systematic review with meta-analysis: risk factors for thiopurine-induced leukopenia in IBD. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 50, n. 5, p. 484-506, 2019.

VERMEIRE, S. et al. Correlation Between the Crohn's Disease Activity and Harvey–Bradshaw Indices in Assessing Crohn's Disease Severity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 8, n. 4, p.357–363, 2010.

VICHA, A. et al. A Pharmacokinetic Analysis and Pharmacogenomic Study of 6-mercaptopurine. *Int J Pharm Sci Dev Res* 1 (1): 002, v. 7, n. 002, 2015.

WIGGINTON, J.E., CUTLER, D.J., ABECASIS, G.R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics*, v. 76, n. 5, p. 887-893, 2005.

WILSON, L. et al. Real-World Use of Azathioprine Metabolites Changes Clinical Management of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*, v. 4, n. 3, p. 101-109, 2021.

WITTE, T. N.; GINSBERG, A. L. Use of allopurinol with low-dose 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease to achieve optimal active metabolite levels: a review of four cases and the literature. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 22, n. 2, p. 181-185, 2008.

YAO, J.; JIANG, X.; YOU, J. H. S. A systematic review on cost-effectiveness analyses of therapeutic drug monitoring for patients with inflammatory bowel disease: from immunosuppressive to anti-TNF therapy. *Inflammatory bowel diseases*, v. 27, n. 2, p. 275-282, 2021.

YARUR, A. J. et al. Higher thioguanine nucleotide metabolite levels are associated with better long-term outcomes in patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 52, n. 6, p. 537-544, 2018.

YESHI, K. et al. Revisiting inflammatory bowel disease: pathology, treatments, challenges and emerging therapeutics including drug leads from natural products. *Journal of clinical medicine*, v. 9, n. 5, p. 1273, 2020.

ZAMAN, S. et al. TPMT and ITPA Gene Polymorphism and Their Adverse Events during Chemotherapy of Acute Lymphoblastic Leukemia among Bangladeshi Children. *Iranian Journal of Blood and Cancer*, v. 11, n. 3, p. 96-100, 2019.

ZEGLAM, H. B. et al. Polymorphisms of the thiopurine S-methyltransferase gene among the Libyan population. *Libyan J Med*, v. 10, p. 27053, 2015. ISSN 1819-6357.

ZOCHOWSKA, D. et al. Determination of Concentrations of Azathioprine Metabolites 6-Thioguanine and 6-Methylmercaptopurine in Whole Blood With the Use of Liquid Chromatography Combined With Mass Spectrometry. *Transplant Proc*, v. 48, n. 5, p. 1836-9, 2016.

APÊNDICE A

Article

Simultaneous Monitoring of Azathioprine Metabolites in Erythrocytes of Crohn's Disease Patients by HPLC-UV

Aline Correa Ribeiro¹, Luciane Henriques Furtado Barroso¹, Carlos Alberto Mourao-Junior², Julio Maria Fonseca Chebli³, and Jorge Willian Leandro Nascimento^{1,*}

¹Laboratory of Clinical and Experimental Pharmacology, Department of Pharmacology, Federal University of Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, s/n°, 36360-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, ²Department of Physiology, Federal University of Juiz de Fora, José Lourenço Kelmer, s/n°, 36360-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, and ³Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora and Monte Sinai Hospital, Eugênio do Nascimento s/n°, 36038-330, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: jorge.willian@ufjf.edu.br

Received 2 March 2021; Editorial Decision 2 June 2021

Abstract

The conversion of azathioprine (AZA) to active 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) is essential for its clinical efficacy; however, another metabolite formed, 6-methylmercaptopurine (6-MMP), is related to hepatotoxicity. Blood samples were collected from 37 patients under AZA's treatment, and a new HPLC-UV method was validated and applied for simultaneous quantification of 6-TGN and 6-MMP in erythrocytes of Crohn's disease (CD) patients. The concentration of 6-TGN and 6-MMP found ranged from 4.5 to 2,456 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ red blood cells (RBCs) for 6-TGN and from 170 to 53,951 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBCs for 6-MMP. Reduced levels of 6-MMP in patients into combo therapy with AZA and allopurinol (2,031 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBCs) have been observed when compared to patients undergoing monotherapy with AZA (9,098 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBCs). Additionally, there was a negative correlation ($r = -83.7\%$, $P < 0.05$) between lymphocyte count and 6-TGN levels. The method developed is reliable, accurate and reproducible and can be used as an important tool in the monitoring routine of patients with CD under AZA treatment, allowing the individualization of the dose, monitoring adherence to the treatment and the evaluation of the clinical outcome of these patients.

Introduction

Crohn's disease (CD) is an immune-mediated chronic inflammatory bowel disease (IBD) of unknown etiology, which can affect any segment of the digestive tract (1, 2). Despite the proven efficacy of azathioprine (AZA) in the treatment of CD, adverse effects such as hepatotoxicity, gastrointestinal disorders and myelosuppression are observed in ~30% of patients, often leading them to discontinue the treatment (3).

The mechanism of cytotoxicity and immunosuppressive activity of AZA occurs due to the action of its metabolites, the 6-thioguanine

nucleotides (6-TGN), produced by the enzyme hypoxanthine-phosphoribosyl transferase, that are incorporated into DNA as false metabolites (4). Another metabolite, 6-methylmercaptopurine (6-MMP), generated by the enzyme thiopurine-methyltransferase, can cause hepatotoxicity, myalgias and asthenia in some patients (Figure S1) (5, 6).

To improve treatment adherence and to reduce the adverse effects of AZA, it is common to combine allopurinol (a xanthine oxidase inhibitor) in the treatment, as recommended by the Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines-DC-Ordinance SAS/MS No. 966, of 10

February 2014, with the objective of increasing the production of the active nucleotides 6-TGN and to reduce the formation of 6-MMP, reducing the risk of hepatotoxicity (7). However, to avoid myelotoxicity, a reduction in AZA dose is necessary, which often occurs empirically (8–10).

Therapeutic drug monitoring of intraerythrocyte levels of 6-TGN has great applicability for personalized pharmacological treatment, adjusting 6-TGN levels to the therapeutic range and reducing the occurrence of adverse reactions and toxicity (11). Thus, in this study, we developed a chromatographic method for the simultaneous determination of the intraerythrocyte concentration of 6-TGN and 6-MMP of patients under AZA therapy, in order to contribute to an optimum and rational pharmacological therapy, enabling to customize the doses of AZA.

Experimental

Materials

Solvents and reference standards

6-MMP was purchased from Acros Organics (Canada), 6-TGN and d-1-dithiothreitol (DTT) were obtained from Sigma-Aldrich Brazil Ltda (Brazil), anhydrous caffeine was purchased from Valdequímica Produtos Químicos (Brazil). The potassium phosphate monobasic reagents used (Sigma-Aldrich, Vetec, Brazil), hydrochloric acid (37%) (LabSynth, Brazil), perchloric acid (70–72%) (Merck, Brazil), orthophosphoric acid (85%) and physiological solution (0.9%) (Farmax, Brazil) were analytical grade. Acetonitrile and methanol used were HPLC grade (J. T. Baker/Avantor, Brazil) and 1 N sodium hydroxide solution was analytical grade (Neon, Brazil). HPLC grade water (ultrapure) was obtained in Milli-Q purification system.

Patients

Blood samples were obtained from 37 patients diagnosed with CD who had been receiving AZA daily (dose range 25 mg/day to 200 mg/day) for at least 3 months, cared for in the Center for Inflammatory Bowel Disease, at the University Hospital/UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil. The study was conducted following the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital-UFJF/MG/Brazil (# 1633090). An informed consent form was obtained from all patients.

The Harvey–Bradshaw Index (HBI) was used to quantify CD activity (12). An HBI score of ≥ 5 indicated active disease while remission was defined by HBI lower than 5 (12). Blood samples were collected from all patients, on the same day of the interview, for determination of hepatic profile (AST, ALT), quantification of C-reactive protein and hematological evaluations (hemogram and leukogram).

Blood aliquots from each patient were separated and sent to the Laboratory of Clinical and Experimental Pharmacology (LaFaCE/UFJF) for quantification of the intraerythrocyte metabolites 6-TGN and 6-MMP by HPLC.

Sample preparation

Blood samples (3 mL) were collected in EDTA anticoagulant tubes. The samples were immediately centrifuged at 3,000 r.p.m. for 10 min at room temperature. Plasma, leukocytes and the upper layer of the RBCs were removed. The remaining RBCs were washed twice in saline. An aliquot of 200 μ L of each sample was separated and transferred to a 1.5 mL microtube, to which 200 μ L of saline was added for dilution and the erythrocyte counting and standardization procedure (RBC). The collection and processing time did not exceed 2 h. The isolated RBCs were stored at -80°C until further analysis.

For analyses, we based the extraction procedure on Dervieux and Boulieu study (13). Briefly, a 200 μ L aliquot was transferred to a tube containing 100 μ L DTT 3 mg/mL to protect the thiol group from oxidation, 50 μ L of caffeine 4 μ g/mL (internal standard [IS]) and 50 μ L of 70% perchloric acid (for deproteinization). The deproteinized samples were centrifuged at 10,000 r.p.m. for 15 min at room temperature (14, 15). The supernatant was heated for 45 min at 100°C to hydrolyze the thiopurine nucleotides, and after cooling, it was analyzed by liquid chromatography.

Instrumental

Analytical procedures

The concentrations of 6-TGN and 6-MMP obtained from RBCs, usually expressed as $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ erythrocytes, were determined by HPLC. The method was developed in Waters system equipped with Alliance e2695 Separation Module, quaternary pump, autosampler, degasser, column heater and a double channel UV–Vis detector (Milford, USA). The Empower 3 software was used for system control, peak integration and data analysis. The separation was carried out in X-Bridge C18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; Waters, Milford, USA), with gradient elution of the mobile phase composed of (i) potassium phosphate buffer (pH = 3; 0.02 mol/L), (ii) acetonitrile and (iii) methanol, at a flow rate of 1 mL/min. The column heater was maintained at 40°C and a dual-wavelength UV detector was set at 342 nm (6-TGN) and 291 nm (6-MMP). An injection volume of 30 μ L was established (13, 15).

Validation of the analytical method

Method validation followed orientations of the guidance for bioanalytical method validation from the Food and Drug Administration (16). Selectivity was assessed by comparing RBC samples obtained from untreated healthy subjects with erythrocyte samples spiked with standards of 6-TGN, 6-MMP and caffeine (IS).

Linearity was evaluated over the range of 146–4,877 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC (6-TGN) and 147–4,906 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC (6-MMP), using the internal standardization method. The calibration curves were constructed plotting peak area ratios (analyte peak area/IS peak area) versus RBC concentration, at seven concentration levels of 6-TGN and 6-MMP ($n = 3$). A new calibration curve was prepared for each day of analysis. The lower limit of quantification (LOQ) was investigated by analyzing five replicates of the lowest concentration of these analytes with acceptable accuracy and precision ($<20\%$), and the limit of detection (LOD) was determined as a concentration with a signal-to-noise ratio >5 .

Precision and accuracy (intraday and interday) were assessed by quantification of five replicates prepared at low (245 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and 6-MMP), medium (975 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and 982 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-MMP) and high (3,901 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and 3,926 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-MMP) concentrations of the analytes. Method precision and accuracy were expressed as coefficient of variation (CV%) and relative error (RE%), respectively. Recovery was determined by comparing the peak area ratio of extracted quality control samples with standard samples of the same concentrations prepared in RBC. Stability studies evaluated three replicates of quality control samples (245 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC, 975 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC and 3,901 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and 245 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC, 982 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC and 3,926 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-MMP) at room temperature, in the autosampler (13 h) and after three successive freeze and thaw cycles (4 days).

Table I. Demographic and Clinical Characteristics of Patients with Crohn's Disease on AZA Treatment

Characteristic	
Gender (F, M)	28, 9
Age (years) ^a	46.2 ± 12.8
White	29 (78%)
Non-white	8 (22%)
Disease location, <i>n</i> (%), L1/L2/L3	13 (35%)/9 (24%)/12 (32%)
HBI score ^b	2 (0–8)
C-reactive protein levels (mg/L) ^a	8.2 ± 11.3
Therapy, <i>n</i> (%)	
AZA (100–200 mg AZA per day)	31 (83.7%)
AZA + Allopurinol (25–200 mg AZA per day)	6 (16.3%)
Remission group	30 (81.1%)
Active group	7 (18.9%)

Note: L1, ileal; L2, colonic; L3, ileocolonic. ^aMean ± standard deviation. ^bMedian and range.

Statistical analysis

For descriptive and inferential statistical analysis of the results, specific statistical software (SPSS-Statistical Package for the Social Sciences™, version 23.0) was used. Inferences were performed using the Pearson correlation test and differences between means were assessed by the two-tailed *t*-test. All values were expressed as mean ± standard deviation. The level of significance was 5% in all tests ($P < 0.05$).

Results

Patient disposition and participant characteristics

Sixty adult CD patients were screened to participate in the study. Among them, 23 declined due to lack of interest; therefore, 37 adult CD patients were included in the study. Baseline characteristics of the participants are shown in Table I. The average (±SD) age was 46.2 (±12.8), and 28 were females. The dose range of AZA for the patients was 25–200 mg/day and the allopurinol dose was 100 mg/day. The most common locations of CD were ileocolonic (32%), colonic (24%) and ileo terminal (35%). Among them, 21 patients (56.7%) had at least one adverse effect related to AZA therapy during the treatment, which could lead to non-compliance and, therefore, the activity of the disease or no therapeutic efficacy. The most commonly reported adverse events were mild-to-moderate abdominal pain ($n = 26$, 70.3%) and nausea/vomiting ($n = 4$, 10.8%). At baseline, 83.7% were on monotherapy (AZA) and 16.3% on associated therapy with allopurinol. Since the adverse effects were mild, there was no need to reduce the dose or withdraw AZA. Of the total population, 30 (81.1%) patients achieved AZA-induced remission, while 7 (18.9%) were with active CD despite AZA therapy (Table I).

Validation of the analytical method

The method used was selective for quantification of the metabolites with satisfactory separation without peak interferences. 6-TGN and 6-MMP were detected in 6.2 and 23.1 min, respectively.

After successive dilutions, the concentration of 146 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC (CV = 13.7%) for 6-TGN and 147 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC (CV = 11.6%) for 6-MMP were determined as limits of quantification of the method. The established LOD was 47.3 $\rho\text{mol}/8 \times$

10^8 RBC and 48.9 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and 6-MMP, respectively. The linearity for 6-TGN was defined between 146 and 4,877 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC ($R^2 = 0.999$) and between 147 and 4,906 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC ($R^2 = 0.998$) for 6-MMP (Figure 1). The data obtained in the validation of the analytical method are summarized in Table II.

In a total of 37 patients with CD, 30 were in remission. Considering the pharmacotherapeutic protocol, 16.3% were using the association of AZA with allopurinol for the treatment of CD. The mean dose of AZA was 150 mg/day (2.5 mg/kg/daily) in monotherapy and 80 mg/day (1.2 mg/kg/daily) in combo therapy with allopurinol 100 mg/day. The dosage range of AZA for these patients was 25–200 mg/day.

Concentrations of 6-TGN and 6-MMP were determined for all patients enrolled in the study. As commonly used in previous studies, we used $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC as the unit for 6-TGN and 6-MMP in washed RBC instead of $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5, 6, 11). The values obtained ranged from 4.5 to 2,456 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and from 170 to 53,951 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-MMP.

Patients' assessment of disease activity or remission showed an increase in the mean values of 6-TGN in the remission group (590 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) compared to the active group (328 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) ($P = 0.039$) (Figure 2). Concerning the 6-MMP metabolite, there was no statistically significant difference between the groups with the disease in remission (7,883 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) and in activity (8,250 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) ($P > 0.05$).

In patients with active disease, a negative correlation (Pearson's test, $r = -83.7\%$, $P < 0.05$) was found between lymphocyte count and 6-TGN concentration (Figure 3). In the group with the disease in remission, no correlation was found. There was no statistically significant difference in other hematological or biochemical parameters evaluated (data not shown) ($P > 0.05$).

The assessment of monotherapy or combination therapy with 100 mg allopurinol showed a significant increase of the 6-MMP metabolite in the monotherapy group (9,098 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) compared to the group with the therapeutic combination (2,031 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) ($P < 0.05$) (Figure 4).

Discussion

The first methodology described for the therapeutic drug monitoring of intraerythrocyte levels of 6-TGN was developed by Lennard and Maddocks (19) and was the basis for the development of other methods and the determination of AZA therapeutic ranges. Other methodologies described for the determination of 6-TGN and 6-MMP used acid hydrolysis, with heating in a dry water bath, for the conversion of 6-TGN and 6-MMP nucleotides into their respective free bases (6, 13–15, 17–19).

Based on other studies, we developed and applied an analytical methodology for the quantification of intraerythrocyte metabolites, 6-MMP and 6-TGN, allowing the simultaneous evaluation of their concentrations and the correlations of intraerythrocyte concentrations in patients treated with AZA monotherapy or AZA associated with allopurinol (13–15, 20–22).

The methods developed in the 1980s did not evaluate 6-MMP levels and used a range between 30 and 30,000 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN. Lennard and Singleton (22) performed a study with a shorter linear range for 6-TGN (30–900 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) and for the first time quantified 6-MMP with a range between 300 and 3,000 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC (23). In other study, we noticed that the linearity obtained

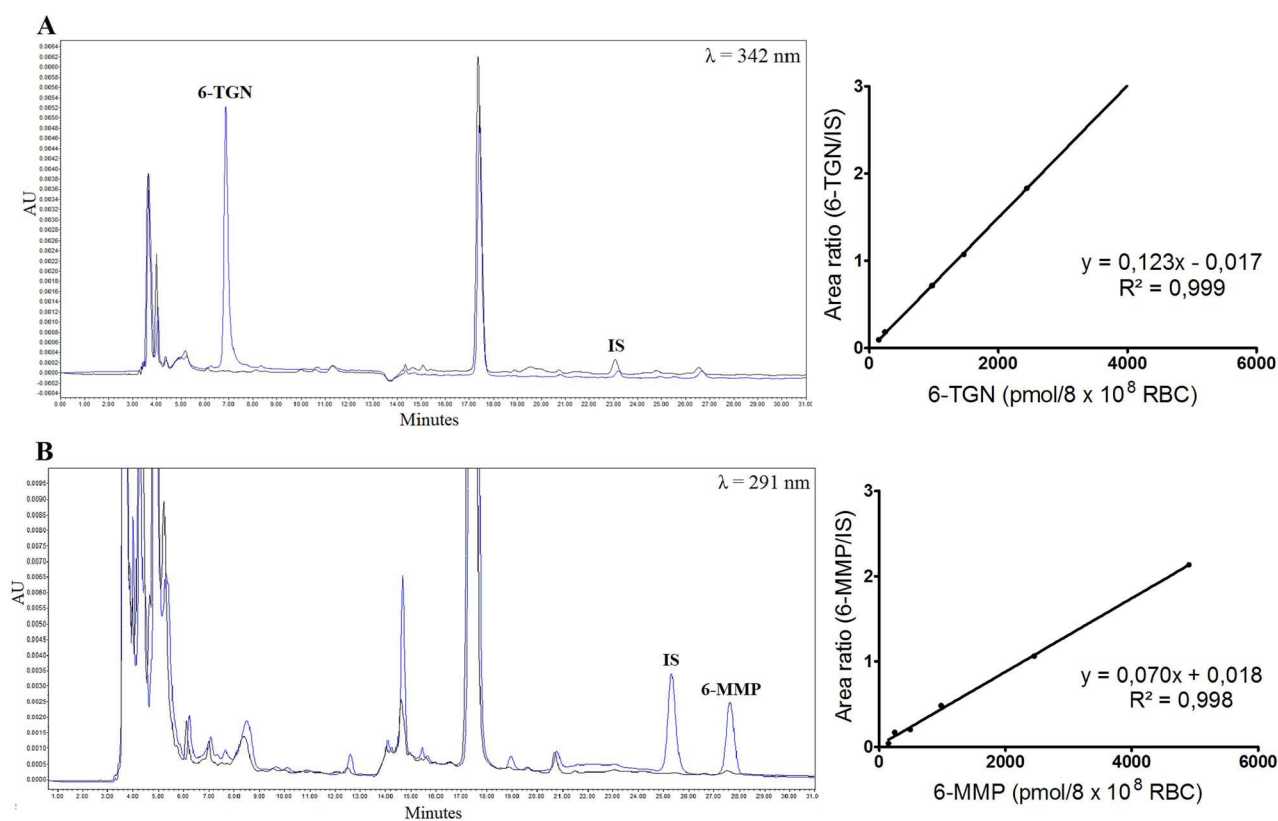


Figure 1. Chromatogram of 6-TGN (A) and 6-MMP (B) compared to blank RBC and linearities. IS, Internal standard (caffeine); λ , wavelength.

Table II. Validation of the Intraerythrocyte Metabolites of AZA

Parameter	6-TGN ^a	6-MMP ^b
Linearity	146–4,877 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC	147–4,906 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC
Correlation coefficient	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.998$
LOQ	146 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC	147 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC
LOD	47.3 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC	48.9 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC
Stability		
Short term	101.6–107.7%	92.9–103.4%
Freezing cycles	90.5–107.1%	95.7–100.8%
In the gun tray	86.9–100.6%	94.2–99.6%
Precision (CV%)		
Intraday	4.36/5.45/6.63	12.13/8.92/10.38
Interday	6.83/7.09/13.77	9.98/9.07/11.65
Accuracy (RSE%)		
Intraday	12.37/5.78/15.92	11.67/12.65/5.24
Interday	9.20/11.31/10.93	8.51/8.87/4.58
Recovery (%)	87.9	91.9

Note: Precision and accuracy values are expressed as average values of the low, mid and high concentrations, intraday and interday tests. ^aNucleotides 6-thioguanine, ^b6-methylmercaptapurine.

for 6-TGN levels were quite variable, with intervals between 2.5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and between 0.01 and 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (14). The linearity of our method shows a linear response from 146 to 4,877 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-TGN and from 147 to 4,906 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC for 6-MMP. Similar linearities were used by Dervieux and Boulieu (13).

The values of LOQ and LOD for 6-TGN were 146 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC and 47.3 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC, whereas the values for 6-MMP

were 147 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC and 48.9 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC, respectively. In our study, no patient presented 6-TGN values higher than the upper LOQ and four patients presented results below the lower limit of quantification. However, this is probably due to the incorrect use of the medicines or non-adherence to the treatment by some patients (14, 23). For 6-MMP, 12 patients presented values higher than the upper LOQ and no patient presented values lower than the

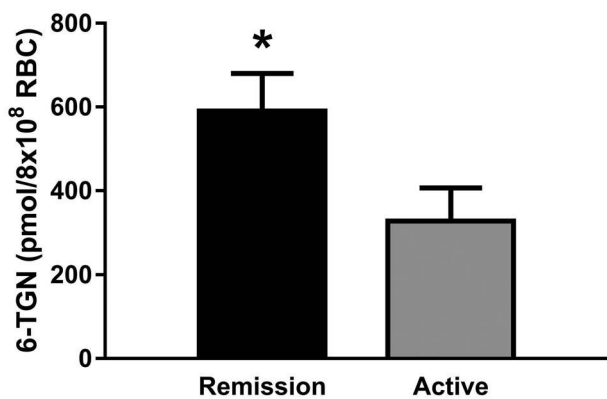


Figure 2. Evaluation of the activity of the disease according to the concentration of the metabolite 6-TGN (* $P \leq 0.05$).

lower LOQ. The method developed shows adequate repeatability and reproducibility, and optimum recovery, between 80.7 and 94.1% for 6-TGN and between 82.0 and 97.1% for 6-MMP.

In the method described by Dervieux and Boulieu, the mean recovery was 73.1% for 6-TGN and 84% for 6-MMP, whereas in the method reported by Oliveira *et al.* the mean recovery was 73.2 and 97.4%, respectively (6, 13, 14). To date, the studies described in the literature indicate only the mean recovery obtained, while our study indicates the recovery values for each concentration analyzed (Table II). In addition, it is possible to observe that in previous studies, recovery of 6-MMP was superior to 6-TGN, similar to that found in our study (13, 15).

The quantification of 6-TGN and 6-MMP in whole blood by HPLC-UV showed a high specificity at wavelengths 291 and 342 nm, assuring reliability in the quantification of these metabolites. Linearity is adequate for the working range with high sensitivity. The method is robust and is within the values set for recovery. The results of precision, accuracy and stability attest to the reliability required for the use of this methodology safely and can be used as an important tool in the routine of therapeutic drug monitoring of patients with CD.

The method developed by HPLC has advantages when compared to UPLC, because of the low cost of the equipment and maintenance,

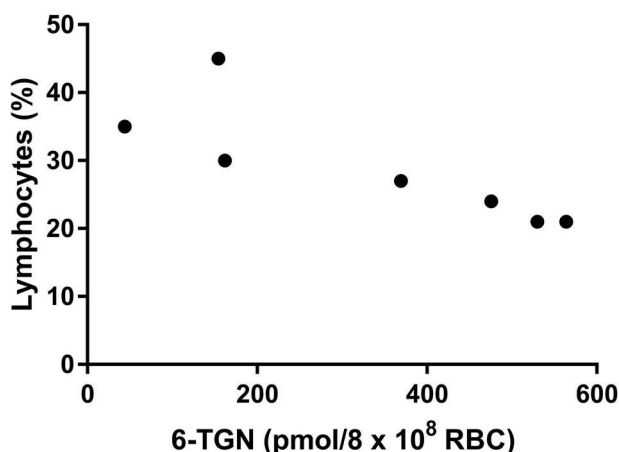


Figure 3. Correlation between lymphocyte count and 6-TGN concentration in patients with active disease. ($r = -83.7\%$, $P < 0.05$).

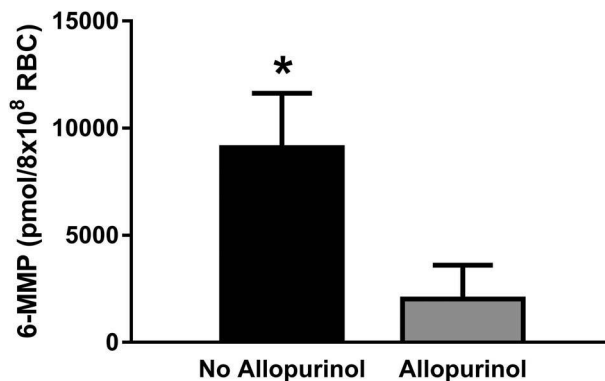


Figure 4. Concentration of 6-MMP in patients treated with AZA or with AZA + allopurinol combination (* $P \leq 0.05$).

which allows the technique to be applied by several laboratories. Furthermore, this HPLC methodology allows a suitable measurement of the metabolites using small amounts of erythrocytes (200 μ L). The small volume of blood required together with the simplicity of the analytical technique makes this a useful procedure for monitoring the metabolites. The disadvantages of this methodology would be less sensitivity and selectivity, peaks with lower resolution and longer run time when compared to UPLC.

Currently, the dose adjustment of AZA in clinical practice is often performed by mg/kg. AZA monitoring allows the adaptation of the levels of its metabolites to the therapeutic range, potentially reducing adverse reactions, toxicity and identifying cases of no adherence to treatment (6, 11). The evaluation of the clinical efficacy of thiopurines in a real-life setting is performed based on clinical, biomarkers and endoscopic criteria and can lead to a biased interpretation of the results. In the literature, there is great variability in 6-TGN levels among patients treated with similar doses of AZA. This could be observed in our study, in which there was a low correlation between the daily AZA doses (1.2 mg/kg/day–2.5 mg/kg/day) and the intraerythrocytic concentrations of 6-TGN of patients (4.5–2,456 ρ mol/8 \times 10⁸ RBC).

The active drug, 6-MP, has an oral bioavailability between 47.4 and 60%, with maximum blood levels reached in 1–2 h after administration. 6-MP is rapidly removed from the blood in the liver or by erythrocytes, with an intraerythrocyte nucleotide half-life between 3 and 13 days. Due to this pharmacokinetic characteristic, the time of the daily dose does not represent a great influence on the time of blood collection (20, 21).

Dubinsky (23) conducted a study on patients who had AZA metabolites monitored, and assessed the clinical usefulness of 6-TGN monitoring and thiopurine methyltransferase (TPMT) genotyping of pediatric patients with IBD undergoing AZA treatment. The authors demonstrated that 6-TGN levels were associated with the therapeutic response and suggested that the response to AZA could be optimized with 6-TGN levels of around 235 ρ mol/8 \times 10⁸ RBC (14, 23).

Patients with high TPMT enzymatic activity tend to convert AZA more into 6-MMP rather than to 6-TGN. However, the addition of an inhibitor of the xanthine oxidase enzyme, such as allopurinol, allows the increase of 6-TGN production, without increasing the level of 6-MMP, 6-methylmercaptapurine ribose (6-MMPR) or its associated hepatotoxicity (24). In our study, this association resulted in a decreased AZA dosage and in lower 6-MMP production, from 9,098 ρ mol/8 \times 10⁸ RBC (monotherapy group) to 2,031 ρ mol/8 \times 10⁸ RBC ($P \leq 0.05$).

In addition, we observed that patients with IBD in remission had significantly higher levels of 6-TGN ($590 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) than those with active disease ($328 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) ($P < 0.05$). Similar studies have shown that the mean concentration of 6-TGN was significantly higher in patients in clinical remission than in those with active disease (11, 23–25). In contrast to these reports, another study did not detect a correlation between being in remission and having high concentrations of 6-TGN (25). Goldenberg *et al.* analyzed 74 patients with IBD but failed to find a correlation between remission and values of 6-TGN $> 235 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (25, 26). Gupta *et al.* (27) evaluated 101 children and showed an insignificant trend towards higher concentrations of 6-TGN in patients in remission. A recent meta-analysis demonstrated that patients with 6-TGN levels between 230 and $450 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ had clinical remission, while 6-TGNs levels lower than $230 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ and higher than $450 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ were considered associated with an increased likelihood of suboptimal response and myelotoxicity, respectively (25, 28).

In previous studies, 6-MMP levels above $5,700 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ were correlated with hepatotoxicity (25, 28). However, in this study, ~33% of the investigated patients had levels of 6-MMP above $5,700 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ and did not present hepatotoxicity (data not shown), as shown in other reports (6, 25).

The recommended therapeutic range of 6-TGN is 235–500 $\rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$; however, this issue is controversial in the scientific field, and the upper limit of $500 \text{ } \rho\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ is not well corroborated by experimental data (8, 28). Our findings showed that 38% of patients had concentrations above this limit. The wide dosage range (25 mg/day–200 mg/day) used currently in clinical practice could contribute to the additional variability of the data collected and possible interference in the results. A limitation of this study is the small number of patients studied, which reduces the strength of the findings regarding their clinical implications. However, the results are in agreement with previous reports, where there was a mild lymphopenia related to the increase of 6-TGN concentration, but this was unable to lead to myelosuppression or the need to withdraw the medication. Previous reports have shown occurrences of lymphopenia in <1% of patients (28–30).

This analytical methodology will be used in our ongoing clinical study to analyze 150 samples from patients with IBD to evaluate the interference of pharmacogenetics during AZA therapy, allowing individual dose adjustments.

Conclusion

The analytical methodology proposed for the detection and quantification of the intraerythrocyte metabolites of AZA by HPLC-UV was specific, sensitive, accurate and linear in the concentration ranges studied, being suitable for the monitoring in patients with CD treated with AZA. The potential employment of these analyzes in clinical routine may become an important tool for pharmacotherapy, which will allow “optimizing the therapeutic” potential of AZA/6-MP in the treatment of IBD. Indeed, it will allow the individualization of doses of these drugs, the monitoring of adverse effects related to pharmacological therapy, the monitoring of adherence to the treatment and the evaluation of the clinical outcome of the patient.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Journal of Chromatographic Science* online.

Acknowledgments

The authors are grateful to Brazilian Ministry of Health and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais for financial support (PPSUS/FAPEMIG-Grant number # APQ-03823-17), as well as to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship.

Conflict of interest statement

None declared.

References

1. Crohn, B.B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G.D.; Regional ileitis: a pathologic and clinical entity; *JAMA*, (1932); 99: 1323–1329.
2. Chebli, J.M.F., Gaburri, P.D., de Souza, A.F.M., Pinto, A.L.T., Chebli, L.A., Felga, G.E.G., et al.; Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study; *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2007); 22: 268–274.
3. Broekman, M.M.T.J., Coenen, M.J.H., Marrewijk, C.J.V., Wanten, G.J.A., Wong, D.R., Verbeek, A.L.M., et al.; More dose-dependent side effects with mercaptopurine over azathioprine in IBD treatment due to relatively higher dosing; *Inflammatory Bowel Diseases*, (2017); 23: 1873–1881.
4. Prefontaine, E., Sutherland, L.R., MacDonald, J.F., Cepoiu, M.; Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease; *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2009); 1: CD000067.
5. Geary, R.B., Barclay, M.L.; Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease; *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2005); 20: 1149–1157.
6. Kirchherr, H., Shipkova, M., Von Ahsen, N.; Improved method for therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine in whole-blood by LC/MSMS using isotope-labeled internal standards; *Therapeutic Drug Monitoring*, (2013); 35: 313–321.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. *Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: Volume 3/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Brasília. 604* (2014). http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_clinicos_diretrizes_terapeuticas_v3.pdf.
8. Curkovic, I., Rentsch, K.M., Frei, P., Fried, M., Rogler, G., Kullak-Ublick, G.A., et al.; Low allopurinol doses are sufficient to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease patients with inadequate thiopurine metabolite concentrations; *European Journal of Clinical Pharmacology*, (2013); 69: 1521–1531.
9. Pacheco-Neto, M., Alves, A.N.L., Fortini, A.S., Sumita, N.M., Mendes, M.E., Torres, L.H.L., et al.; Pharmacokinetics of 6-thioguanine nucleotide and 6-methyl-mercaptopurine in a case of inadvertent combination therapy of azathioprine with allopurinol; *Revista da Associação Médica Brasileira*, (2012); 58: 39–41.
10. Misdaq, M., Ziegler, S., Ahsen, N.V., Oellerich, M., Asif, A.R.; Thiopurines induce oxidative stress in T-lymphocytes: a proteomic approach; *Mediators of Inflammation*, (2015); 2015: 434825.
11. Andoh, A., Tsujikawa, T., Ban, H., Hashimoto, T., Bamba, S., Ogawa, A., et al.; Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease; *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2008); 23: 1373–1377.
12. Best, W.R.; Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index; *Inflammatory Bowel Diseases*, (2006); 12: 304–310.
13. Dervieux, T., Bouliou, R.; Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC; *Clinical Chemistry*, (1998); 44: 551–555.
14. Oliveira, B.M., Romanha, A.J., Alves, T.M.A., Viana, M.B., Zani, C.L.; An improved HPLC method for the quantitation of 6-mercaptopurine and its

- metabolites in red blood cells; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (2004); 37: 649–658.
15. Hawwa, A.F., Millership, J.M., Collier, P.S., McElnay, J.C.; Development and validation of an HPLC method for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma and red blood cells; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009); 49: 401–409.
 16. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CMV), May (2018). Document available at <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf>
 17. Breithaupt, H., Goebel, G.; Quantitative High Pressure Liquid Chromatography of 6-Thioguanine in Biological Fluids; *Journal of Chromatographic Science*, (1981); 19(10): 496–499.
 18. Dogra, A., Sharma, A., Mandal, U.K., Kotwal, P., Bhatt, S., Nandi, U.; Liquid chromatography based methods for analysis of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) in biological matrices; *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (2019); 49(3): 224–242.
 19. Lennard, L., Maddocks, J.L.; Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells; *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (1983); 35: 15–18.
 20. Adam, L., Phulukdaree, A., Soma, P.; Effective long-term solution to therapeutic remission in inflammatory bowel disease: role of azathioprine; *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2018); 100: 8–14.
 21. Lennard, L., Brown, C.B., Fox, M., Maddocks, J.L.; Azathioprine metabolism in kidney transplant recipients; *British Journal of Clinical Pharmacology*, (1984); 18(5): 693–700.
 22. Lennard, L., Singleton, H.J.; High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample; *Journal of Chromatography*, (1992); 583: 83–90.
 23. Dubinsky, M.C.; Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease; *Current Gastroenterology Reports*, (2003); 5: 506–511.
 24. Bradford, K., Shih, D.Q.; Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease; *World Journal of Gastroenterology*, (2011); 17: 4166–4173.
 25. Hadithy, A.F.Y.A.L., de Boer, N.K.H., Derijks, L.J.J., Escher, J.C., Mulder, C.J.J., Brouwers, J.R.B.J.; Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations; *Digestive and Liver Disease*, (2005); 37: 282–297.
 26. Goldenberg, B.A., Rawsthorne, P., Bernstein, C.N.; The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease; *The American Journal of Gastroenterology*, (2004); 99: 1744–1748.
 27. Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S., Guandalini, S.; Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study; *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, (2000); 31: 453–457.
 28. Kopylov, U., Ben-horin, S., Seidman, E.; Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease; *Annals of Gastroenterology*, (2014); 27: 304–312.
 29. Cheifetz, A.S.; Management of active Crohn disease; *JAMA*, (2013); 309: 2150–2158.
 30. Kopylov, U., Battat, R., Benmassaoud, A., Paradis-Surprenant, L., Seidman, E.G.; Hematologic indices as surrogate markers for monitoring thiopurine therapy in IBD; *Digestive Diseases and Sciences*, (2015); 60: 478–484.

Systematic Review

The Role of Pharmacogenetics in the Therapeutic Response to Thiopurines in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review

Aline C. Ribeiro ¹, Pâmela S. A. S. Gerheim ², Julio Maria Fonseca Chebli ³, Jorge Willian L. Nascimento ^{4,*} 
and Priscila de Faria Pinto ^{5,*} 

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Minas Gerais, Brazil; alinecorrearibeiro@yahoo.com.br

² Department of Pharmacology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Minas Gerais, Brazil; pamela.souza@ufff.br

³ Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Minas Gerais, Brazil; julio.chebli@medicina.ufff.br

⁴ Laboratory of Clinical and Experimental Pharmacology, Department of Pharmacology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Minas Gerais, Brazil

⁵ Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Minas Gerais, Brazil

* Correspondence: jorge.willian@ufff.br (J.W.L.N.); priscila.faria@ufff.br (P.d.F.P.)

Abstract: This study focuses on the use of thiopurines for treating inflammatory bowel diseases (IBD). These drugs undergo enzymatic changes within the body, resulting in active and inactive metabolites that influence their therapeutic effects. The research examines the role of genetic polymorphisms in the enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in predicting the therapeutic response and adverse effects of thiopurine treatment. The TPMT genotype variations impact the individual responses to thiopurines. Patients with reduced TPMT activity are more susceptible to adverse reactions (AEs), such as leukopenia, hepatotoxicity, pancreatitis, and nausea, which are common adverse effects of thiopurine therapy. The therapeutic monitoring of the metabolites 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and 6-methyl mercaptopurine (6-MMP) is proposed to optimize treatment and minimize AEs. Patients with higher 6-TGN levels tend to have better clinical responses, while elevated 6-MMP levels are linked to hepatotoxicity. Genotyping for TPMT before or during treatment initiation is suggested to tailor dosing strategies and enhance treatment efficacy while reducing the risk of myelosuppression. In conclusion, this study highlights the importance of considering genetic variations and metabolite levels in optimizing thiopurine therapy for IBD patients, focusing on balance therapeutic efficacy with the prevention of adverse effects and contributing to personalized treatment and better patient outcomes.

Keywords: inflammatory bowel diseases; azathioprine; 6-mercaptopurine; pharmacogenetics; thiopurine S-methyl transferase



Citation: Ribeiro, A.C.; Gerheim, P.S.A.S.; Chebli, J.M.F.; Nascimento, J.W.L.; de Faria Pinto, P. The Role of Pharmacogenetics in the Therapeutic Response to Thiopurines in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 6742. <https://doi.org/10.3390/jcm12216742>

Academic Editor: Uri Kopylov

Received: 4 September 2023

Revised: 26 September 2023

Accepted: 7 October 2023

Published: 25 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Thiopurines, specifically azathioprine (AZA) and 6-mercaptopurine (6-MP) are, respectively, a prodrug and drug frequently used in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). Such medicines undergo enzymatic modifications intracellularly, leading to the formation of active metabolites, 6-thioguanine nucleotides (6-TGN), and a major inactive metabolite, 6-methyl mercaptopurine (6-MMP), which is related to hepatotoxicity [1,2].

Thiopurines are effective for maintaining remission and as a steroid-sparing agent in the medium- and long-term in IBD, particularly when 6-TGN levels remain above 235 pmol/8 × 10⁸ RBC (red blood cells). However, the non-adherence rate of patients to

therapy is around 17%, as shown by the undetectable or low intraerythrocytic levels of the metabolites [3–6].

Despite the beneficial effects of thiopurines on treating IBD, therapy is often limited by common adverse effects (AEs) inherent to the drugs or their metabolites. Around 10% to 30% of patients cannot tolerate therapy due to AEs such as myelotoxicity, hepatotoxicity, pancreatitis, and nausea. Some authors suggest that the by-product of the conversion of AZA to 6-MP, a nitroimidazole derivative, may be the primary cause of some of these AEs [3,7–10].

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is a crucial enzyme involved in the metabolism of thiopurines; it catalyzes the S-methylation of the aromatic and heterocyclic sulfhydryl groups. Although the mechanism of action of thiopurines is not yet entirely clear, it is proposed that it can result from the incorporation of the 6-TGN metabolite into the cell's DNA, impairing DNA synthesis and leading to cell apoptosis [1,2]. The gene encoding TPMT exhibits genetic heterogeneity, resulting in vast interindividual differences when considering clinical efficacy and toxicity profiles during treatment with thiopurines [1,11]. Several studies have pointed out that patients with polymorphisms in the TPMT gene related to decreased enzymatic activity are at greater risk of thiopurine-induced leukopenia [2,9].

These changes in TPMT activity have a significant population distribution profile. Approximately 0.3% of individuals in the general population have TPMT with low activity, while 10% have moderate activity, which leads to higher concentration of 6-TGN and an increased risk of severe myelosuppression or other toxic effects related to thiopurine treatment [3,6,8,12,13].

So far, three wild-type alleles and 39 variant alleles of this gene have been identified, most of which are associated with the decreased enzymatic activity of TPMT. Four genotypes, TPMT * 2, * 3A, * 3B, and * 3C, have been intensively investigated because they represent more than 95% of mutations and are associated with various degrees of reduction in enzyme activity. The TPMT * 3A is a haplotype that contains two non-synonymous SNPs: * 3B and * 3C [11], and the TPMT * 3A genotype is the most prevalent genotype in Caucasians (3.2–5.7%) and White Americans, followed by the TPMT * 3C genotype (0.5–1.5%). This genotype is also the most common variant in Africa, Ghana, and Asia, and the main variant type in Japan, with enzyme activity reduced by approximately 25% compared to the non-polymorphic allele [9,11,14–19]. The TPMT * 2 genotype, with a prevalence of 0.2–0.5%, is significantly more associated with AZA-induced leukopenia, followed by an unusual prevalence of TPMT * 3B, found in Chinese, Ghanaian, and Japanese populations. The TPMT * 3D and TPMT * 4 are found in a northern European family. The TPMT * 5 and TPMT * 6 are expressed in Koreans, the TPMT * 7 is found in European Caucasians, and the TPMT * 8 is found in African Americans [9,11,14–19].

Therefore, this study aims to conduct a systematic review to analyze the influence of the genetic polymorphisms of the TPMT enzyme on the therapeutic response related to thiopurine (azathioprine or mercaptopurine) in patients with IBD.

2. Materials and Methods

The systematic review was conducted according to the eligibility criteria (Table 1) and described following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA 2020) [20,21]. The protocol is registered in the International prospective register of systematic reviews PROSPERO (# CRD42023397307).

2.1. Research Strategies and Sources of Information

Medical literature research was performed using MEDLINE, Scielo, Scopus, BVS Lilacs, and the Cochrane Library. The analysis included English, Portuguese, and Spanish articles published until October 2022 without ethnic restriction. Only original studies published in article format with an approach to the influence of genetic polymorphisms of the TPMT enzyme on the response to thiopurine therapy in patients with IBD were included.

We considered controlled and randomized clinical trials and retrospective or prospective multicenter studies using thiopurines to treat patients with IBD. We addressed the genetic variations related to the TPMT enzyme that metabolizes the drugs of interest.

Animal-related studies, in vitro studies, or studies unrelated to pharmacogenetics using thiopurines, case reports, and articles containing incomplete information, as judged by the reviewers, were excluded from this research. The research strategy used the following keywords: polymorphism genetic, pharmacogenetic, drug effects, azathioprine, thiopurine, and inflammatory bowel diseases.

Table 1. Eligibility criteria of included studies.

Eligibility Criteria
Kind of study: <ul style="list-style-type: none"> • clinical studies; • controlled and randomized clinical trials; • comparative studies; • multicentric studies; • observational and cross-sectional studies; • genetic variations related to the enzyme that metabolizes the drugs of interest (AZA or 6-MP); • TPMT enzyme genotype availability.
Search: <ul style="list-style-type: none"> • MedLine; • BVS Lilacs; • Cochrane Library; • Scopus; and • Scielo; • Main keywords (pharmacogenetic; polymorphism; thiopurine; inflammatory bowel diseases).
Population: <ul style="list-style-type: none"> • patients diagnosed with Inflammatory Bowel Disease.
Intervention: <ul style="list-style-type: none"> • on treatment with thiopurines for at least three months.
Language: <ul style="list-style-type: none"> • originally in English.

2.2. Selection Process

Three researchers independently reviewed all articles by screening their titles and abstracts to assess their relevance. A second confirmatory screening was performed using the Rayyan App (<http://rayyan.qcri.or>, accessed on 3 September 2023).

Search terms were constructed based on PICOT. Terms related to Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel diseases, azathioprine, 6-mercaptopurine or thiopurine, 6-methyl mercaptopurine, 6-thioguanine, genetic polymorphism, allelic variants, pharmacokinetic analysis, pharmacogenetics, genetic mutations, genotype, drug effects, therapy, immunosuppressive agents, adverse drug reactions, and metabolite monitoring were applied using free text and appropriate controlled vocabulary. Furthermore, search terms were combined within the same domain using 'OR' and across domains using 'AND'.

2.3. Assessment of Risk of Bias

Two independent reviewers assessed the risk of bias in the included studies. The studies were classified as "low risk" and "concerning" (22 articles that did not make clear for how long the follow-up of patients occurred or had subjects that were lost during the studies, probably not introducing bias in the study), "moderate risk with some concerns"

(14 articles with a short follow-up time of patients or had a follow-up rate of around 70–80% of patients recruited), and “high risk” (4 articles that were not blinded to interventions or had subjects lost for follow-up, likely introducing bias). This assessment was conducted for both the study and primary outcomes.

3. Results

3.1. Selection and Characteristics of the Studies

The broad search strategy identified 1134 studies involving genetic polymorphisms related to drug therapy with thiopurines in patients with IBD. From the application of the inclusion and exclusion criteria previously defined, 662 articles were initially excluded (Figure 1). A total of 472 papers were evaluated in detail, and of these, 432 were excluded for different reasons, leaving 40 articles eligible for inclusion.

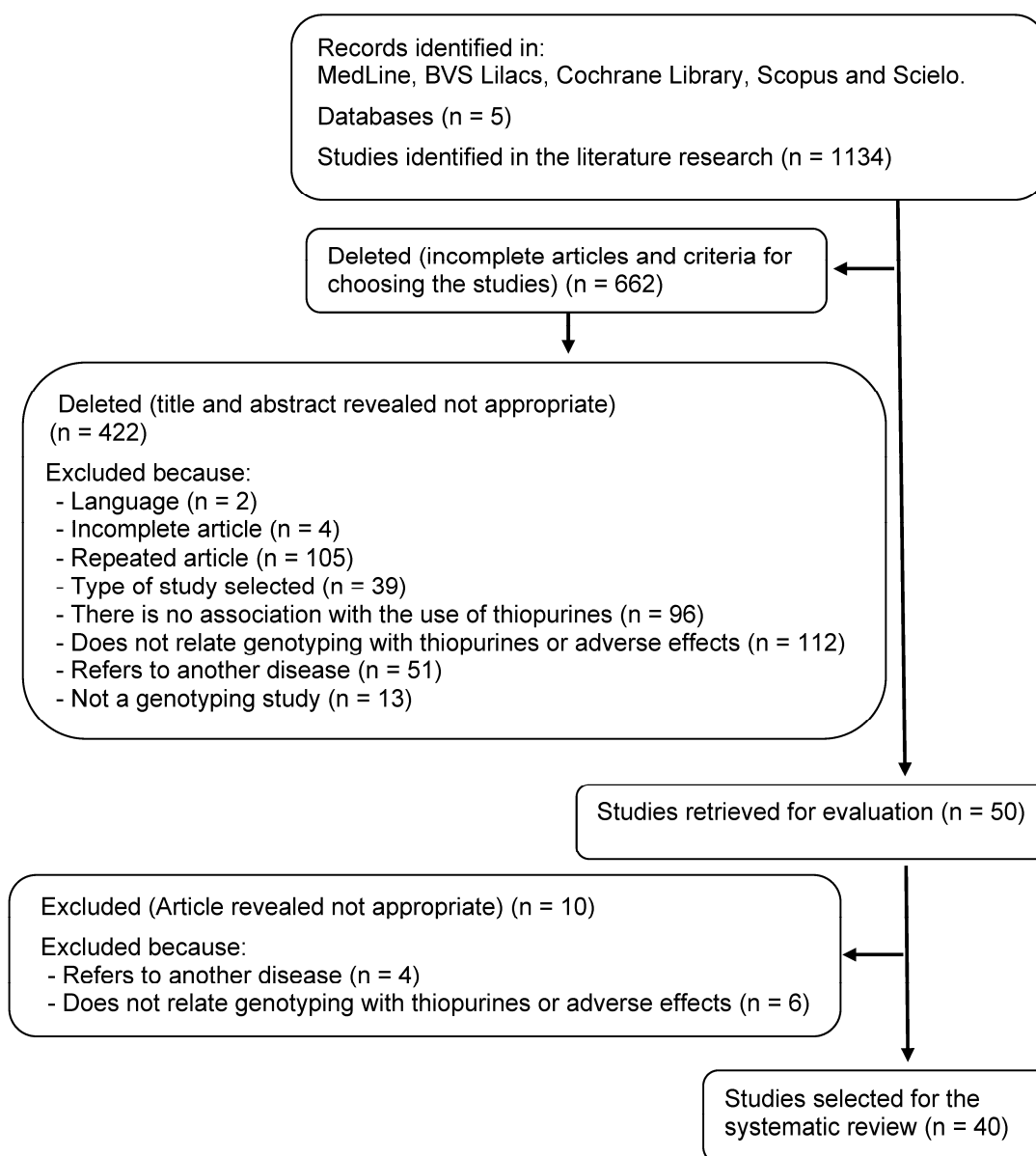


Figure 1. Flowchart of the article selection process.

Figure 1 shows the flowchart used to select the analyzed articles, and Table 2 summarizes the detailed characteristics of the studies included in this systematic review.

Table 2. Characterization of the selected studies regarding the evaluated clinical outcome (adverse effects and clinical response).

Authors (Year)	Country	Sample (n)	DII CD/UC	Gender M/F	Age (Years)	Dose of AZA or 6-MP (Lowest–Highest Dose)	TPMT Alleles Evaluated	Metabolites Evaluated
AL-Judaibi et al. (2016) [22]	England	53	35/18	32/21	41.0 (19–80)	1.5 mg/Kg/day	*1, *3A	-
Ansari et al. (2008) [23]	England	207	117/90	92/115	40.3 (18–80)	2.0 (1.88–2.38) mg/Kg/day	*1, *3A, *3B, *3C	6-TGN
Ban et al. (2008) [24]	Japan	70	20/70	47/23	38.3 (17–79)	50 mg/day	*1, *3C	-
Bayoumy et al. (2021) [10]	Netherlands and UK	316	154/147/15 ^a	121/195	45 (34–58)	20 (10–40) mg/day	*1, *2, *3A	-
Chang et al. (2019) [2]	Japan	164	85/68	98/66	38.7 (20–80)	1.7 (1.1–2.3) mg/Kg/day	*1, *2, *3B, *3C	-
Coelho et al. (2016) [1]	England	78	67/23	56/44	<18 anos	1–5.2 mg/Kg/day	*1, *3A, *39	-
Coenen et al. (2015) [6]	Netherlands	783	356/253	354/429	41.0 ± 15.8	6-MP: 1–1.5 mg/Kg/day	*1, *2, *3A, *3C	-
Coucoutsis et al. (2017) [11]	Greece	223	113/110	126/97	53.0 (16–90)	2.0 (0.5–3.01) mg/Kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Dubinsky et al. (2002) [25]	USA	51	35/16	30/21	36.6 (14–65)	2.5 (0.5–8.0) mg/Kg/day	-	6-TGN
Dubinsky et al. (2000) [26]	USA	92	79/13	41/51	11.5 (1–18)	6-MP: 1.3 (0.4–2.4) mg/Kg/day	*1, *3A, *3B, *3C	6-TGN
Fangbin et al. (2012) [14]	China	199	160/39	133/66	31.8 (18–80)	50 mg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Fangbin et al. (2016) [27]	China	132	102/30	76/56	34.0 (18–72)	6-MP: 25 mg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	6-TGN
Gardiner et al. (2008) [28]	New Zealand	69	53/16	34/35	39.2 (35–43)	1.6 (1.46–1.81) mg/kg/day	*1, *3	6-TGN
Gazouli et al. (2010) [3]	Greece	97	69/17/11 ^a	40/57	11.0 (3–16)	1.4 (0.3–2) mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Gearry et al. (2003) [7]	New Zealand	56	39/17	27/29	40.6 (17–74)	-	*1, *2, *3A, *3C	-
Gilissen et al. (2011) [4]	Netherlands	100	57/40/3 ^a	60/40	42.3 (15–79)	1.8 (0.6–3.0) mg/Kg/day	-	6-TGN/6-MMP
Hanai et al. (2010) [12]	Japan	257	-/257	-	36.7 (14–68)	6-MP: 0.8 (0.5–1.2)	-	6-TGN
Hande et al. (2006) [29]	USA	126	98/28	67/59	22 (6–79)	6-MP: 20–30 mg/day	-	6-TGN/6-MMP
Hibi et al. (2003) [30]	Japan	82/22	35/47	17/5	45.6 (28–64)	1.8 ± 0.6 mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3C	6-TGN
Hlavaty et al. (2013) [31]	Slovakia	220	19	119/101	37.1 ± 12.4	6-MP: 50 mg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Kim et al. (2010) [32]	Korea	286	228/34/24 ^b	187/99	25.7 ± 9.3	1.8 (0.56–3.26) mg/Kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Lee et al. (2017) [5]	Korea	140	140	114/26	33.6 ± 8.8	6-MP: 1.5 (0.82–2.27)	*1, *3	6-TGN
Lee et al. (2015a) [33]	Korea	132	99/33	95/37	17 (15–18)	1.2 ± 0.5 mg/Kg/day	*1, *3C, *6, *16	6-TGN/6-MMP
Lee et al. (2015b) [34]	Korea	137	103/34	98/39	17 (15–18)	6-MP: 0.6 ± 0.3 mg/Kg/day	*1, *3C, *6, *16	6-TGN/6-MMP
Lindqvist et al. (2006) [35]	Sweden	54	-	-	-	2.5 mg/kg/day	*1, *3A	-
Odahara et al. (2015) [16]	Japan	48	19/29	29/19	34.2 ± 13.6	6-MP: 1.25 mg/kg/day	*1, *3A, *3C, *3D, *4, *5, *6, *7, *8	6-TGN/6-MMP
Palmieri et al. (2007) [15]	Italy	422	250/172	227/195	39 (21–54)	1.0 mg/kg/day	*1, *3A, *3B e *3C	-
Ribaldone et al. (2019) [17]	Italy	200	120/80	116/84	33 (13–67)	1.6–3.2 mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Sheffield et al. (2009) [36]	Australia	132	-	-	(18–80)	0.5–1 mg/kg/day	-	6-TGN/6-MMP
Stocco et al. (2005) [8]	Italy	70	38/31/1 ^a	34/36	14.2 (0.8–38.8)	1.9 (1.6–2.0) mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Teml et al. (2005) [37]	Germany	20	-/14/6 ^a	7/13	45 (19–75)	2.0 (1.0–4.0) mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	6-TGN/6-MMP
Uchiyama et al. (2009) [18]	Japan	16	8/8	9/7	39.1 ± 15.4	80 mg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C, *3D, *4, *5, *6, *7 e *8	6-TGN/6-MMP
von Ahsen et al. (2005) [38]	Germany	71	71/-	31/40	36.0 ± 11.6	6-MP 30 mg/day	-	6-TGN/6-MMP
Wang et al. (2018) [19]	China	219	176/39/4 ^a	160/59	33.4 ± 13.1	2.5 mg/kg/day	*1, *3C	-
Winter et al. (2007) [39]	UK	130	69/61	70/60	45	1.0–2.0 mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Wroblowa et al. (2012) [9]	Czech Republic and Slovakia	188	137/41/10 ^a	107/81	37.3 (20–71)	1.6 mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Zabala-Fernández et al. (2011) [13]	Spain	232	156/76	115/117	32.6 (8–70)	1.4–2.0 mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Zelinkova et al. (2006) [40]	Netherlands	262	195/67	103/159	39 (17–87)	2.3 (1.5–3.0) mg/kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Zhu e Cao (2012) [41]	China	52	49/3	27/25	34 (16–77)	132 (50–250) mg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
Zhu et al. (2016) [42]	China	253	253/-	185/68	-	1.4 (0.9–2.2) mg/Kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-
						1.8 (0.5–3.1) mg/Kg/day	*1, *2, *3A, *3B, *3C	-

Note: IBD: “^a” undetermined colitis; “^b” Intestinal Behcet’s disease; “-/-”: not described or not evaluated. Abbreviations: CD: Crohn’s disease; UC: Ulcerative colitis; M: Male; F: Female; AZA: Azathioprine; 6-MP: 6-Mercaptopurine; TPMT: Thiopurine S-methyl-transferase enzyme; 6-TGN: 6-Thioguanine nucleotides; 6-MMP: 6-methyl mercaptopurine.

The most included were cohort studies (38 studies, 95%), followed by randomized controlled trials (two studies, 5%). Most of the studies were conducted in Europe (England (three), Netherlands (three), Italy (three), Greece (two), Slovakia (two), Germany (one), and Spain (one)) and Asia (Japan (six), Korea (four), and China (five)), followed by the United States (three), and Oceania (New Zealand (two) and Australia (one)).

3.2. *Effect of Genotype on the Profile of AE to Thiopurines*

The analysis of the studies in the articles showed a high rate of patients (10 to 39%) with some AE, especially in the first three months of therapy. The most commonly reported AEs included dizziness, malaise, fever, pancreatitis, leukopenia, hepatotoxicity, gastrointestinal effects such as nausea, vomiting, abdominal discomfort, or reduced appetite, and a high occurrence of gastric intolerance. Less commonly reported adverse effects included dermatological issues such as skin reactions, hair loss, and warts, as well as myalgia, arthritis, susceptibility to infections, a potential risk of malignancy, and flu-like syndrome [1,2,6,9,20,23,27]. The occurrences of AEs in the participants of the selected studies can be found in Table 3.

An increased risk of thiopurine toxicity has been observed in patients with a TPMT deficiency in various conditions beyond IBD, such as hematologic malignancies, transplantation, and autoimmune diseases. Likewise, genetic variation in the activity of different enzymes involved in the thiopurine metabolism may explain part of the toxicity, which is not accounted for by variation in the TPMT activity [1,13,23,27,39]. The association between the presence or absence of the TPMT polymorphism and the AEs observed in the studies is presented in Tables 4 and 5.

Table 3. Occurrence of adverse effects in the participants of the selected studies.

Authors (Year)	Total Patients with EAs	Myelotoxicity	Hepatotoxicity	Leukopenia	Lymphopenia	Neutropenia	Thrombocytopenia	Hepatitis	Pancreatitis	Skin irritation/Hair Loss	Arthralgia	Gastrointestinal Intolerance/Nausea/Vomiting	Flu-Like Symptoms	Discontinued/Adjusted Dose
AL-Judaibi et al. (2016) [22]	17 (32.1%)	4/3 * (7.5%)										13 (24.6%)	2 (3.8%)	7 (13.2%)
Ansari et al. (2008) [23]	95 (44.2%)	7 (3.2%)	7 (3.2%)					8 (3.7%)		8 (3.7%)		76 (59.9%)	11 (3.1%)	83 (39.0%)
Ban et al. (2008) [24]				7 (10.0%) 28 (8.9%) 30 (16.5%)			14 (4.4%)							
Bayoumy et al. (2021) [10]		45/1 * (27.4%)												
Chang et al. (2019) [2]												42 (23.1%)		42 (23.1%)
Coelho et al. (2016) [1]	28 (21.9%)											1 (1.3%)		40 (40.0%)
Coenen et al. (2015) [6]	559 (71.4%)		203 (26.6%)	58 (7.5%)			3 (0.4%)	41 (5.2%) 5 (21.7%)		171 (21.8%) 2 (8.7%)	132 (16.9%)	448 (57.2%)		313.2 (40.0%) 23 (25.3%)
Coucousi et al. (2017) [11]	23 (25.3%)													
Dubinsky et al. (2002) [25]	19 (37.2%)		12 (24.0%)	8 (15.7%)										
Dubinsky et al. (2000) [26]	36 (39.1%)	1 (1.1%)	16 (17.4%)	13 (14.1%)										
Fangbin et al. (2012) [14]	50 (25.1%)		1 (0.5%)	36 (18.1%)		3 (1.5%)								
Fangbin et al. (2016) [27]	30 (22.7%)			26 (19.7%)										
Gardiner et al. (2008) [28]	22 (31.9%)		6 (8.7%)											
Gazouli et al. (2010) [3]	10 (10.3%)	1 (1.0%)		6 (6.2%)										
Geary et al. (2003) [7]	56 (100%)	4 (7.1%)						18 (32.1%)		3 (3.1%)				
Hanafi et al. (2010) [12]	18 (7.0%)	6 (2.3%)						5 (8.9%)		13 (23.2%)				
Hibi et al. (2003) [30]	18 (12.8%)	12 (8.3%)						4 (1.6%)		3 (1.2%)				
Hlavaty et al. (2013) [31]	75 (34.1%)	32 (14.5%)	24 (10.9%)	1 (0.7%) 26 (11.8%)				1 (0.7%)		4 (1.6%) 1 (0.7%)			2 (1.4%)	5 (3.5%) 43 (19.5%)
Kim et al. (2010) [32]				116 (40.6%)			2 (0.7%)		6 (2.7%)				9 (3.1%)	8 (2.8%)
Lee et al. (2017) [5]				38 (27.1%)				1 (0.7%)					13 (9.3%)	
Lee et al. (2015a) [33]				21 (15.9%)	40 (30.3%)	24 (18.2%)		4 (3.0%)		1 (0.8%)			16 (12.1%)	
Lee et al. (2015b) [34]				21 (15.3%)	40 (29.2%)	24 (17.5)		4 (3.0%)		1 (0.7%)			5 (3.6%)	
Lindqvist et al. (2005) [35]	39 (72.2%)	9 (16.7%)												27 (50.0%) 12 (25.0%)
Odahara et al. (2015) [16]	14 (29.2%)			10 (20.8%)										
Palmieri et al. (2007) [15]	81 (19.2%)		12 (16.4%)	23 (31.5%)										
Ribaldone et al. (2019) [17]	60 (30.0%)			6 (10.0%)										
Stocco et al. (2005) [8]	19 (27.1%)	7 (10.0%)	6 (8.6%)											
Teml et al. (2005) [37]				2 (10.0%) 12 (75.0%)										
Uchiyama et al. (2009) [18]				3 (4.2%)				4 (25.0%)		3 (15.0%)				
von Ahnen et al. (2005) [38]				9 (6.9%)						5 (31.3%)				
Winter et al. (2007) [39]	44 (33.8%)	4 (3.1%)		10 (7.7%)										
Wrobleva et al. (2012) [9]	44 (23.4%)	34 (18.1%)												
Zabala-Fernández et al. (2011) [13]	75 (32.3%)	15 (6.5%)	5 (2.2%)											
Zelinkova et al. (2006) [40]		12 (4.6%)	11 (4.2%)	7 (2.7%)			5 (1.9%)							
Zhu e Cao (2012) [41]		5 (9.6%)	1 (1.9%)	5 (9.6%)										
Zhu et al. (2016) [42]				65 (25.7%)		22 (8.7%)				6 (2.4%)				6 (11.5%)

Note: Myelotoxicity (Severe < 1500/mm³); Leukopenia (WBC < 3000/μL); Neutropenia (neutrophils < 1500/μL); Lymphopenia (lymphocytes < 1000/μL). Thrombocytopenia (PLT < 100,000/μL); Anemia (Hb < 10 g/dL); Pancreatitis (severe abdominal pain and 3-fold elevation of serum amylase and/or lipase); Hepatotoxicity (alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase enzyme activity > 2 times the upper limit of the reference range); * Severe myelotoxicity.

Table 4. Association between TPMT polymorphism and types of adverse effects.

Authors (Year)	TPMT Genes	Myelotoxicity	Hepatotoxicity	Gastrointestinal Intolerance	Skin Irritation/Hair Loss	Pancreatitis	Leukopenia	Neutropenia	Nausea/Vomiting
AL-Judaibi et al. (2016) [22]	* 1/* 1 * 1/* 3A	48 (90.6%) 5 (9.4%)						1 (20.0%)	
Ansari et al. (2008) [23]	* 1/* 1 variants	200 (91.3%) 19 (8.7%)	7 (8.4%) 5 (26.3%)	8 (9.6%)		34 (40.1%) 8 (42.1%)	7 (10.0%)		13 (7.0%) 7 (37.0%)
Ban et al. (2008) [24]	* 1/* 1 * 1/* 3C	110 (99.1%) 1 (0.9%)	7 (63.6%)					1 (0.9%)	
Coenen et al. (2015) [6]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A * 1/* 3C * 3A/* 3A	705 (90.0%) 7 (0.9%) 58 (7.4%) 12 (1.5%) 1 (0.1%)					1 (8.3%)		

Table 4. *Cont.*

Authors (Year)	TPMT Genes	Myelotoxicity	Hepatotoxicity	Gastrointestinal Intolerance	Skin Irritation/Hair Loss	Pancreatitis	Leukopenia	Neutropenia	Nausea/Vomiting
Coucoutsis et al. (2017) [11]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A * 1/* 3B * 1/* 3C	206 (92.4%) 4 (1.8%) 6 (2.7%) 3 (1.3%) 4 (1.8%)		5 (21.7%)				10 (43.5%) 2 (8.7%) 1 (4.3%)	
Dubinsky et al. (2000) [26]	* 1/* 1 variants	35 (97.2%) 1 (2.8%)					12 (13.0%) 1 (1.1%)		
Fangbin et al. (2012) [14]	* 1/* 1 * 1/* 3C	197 (99.0%) 2 (1.0%)		1 (0.5%)			32 (16.1%) 4 (2.0%)		6 (3.0%)
Fangbin et al. (2016) [27]	* 1/* 1 * 1/* 3C	130 (98.5%) 2 (1.5%)					2 (1.5%)		
Gazouli et al. (2010) [3]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A * 1/* 3B	86 (88.7%) 3 (3.1%) 2 (2.1%) 4 (4.1%)				3 (3.1%)	6 (6.2%)		
Hlavaty et al. (2013) [31]	* 1/* 1 * 1/* 3A * 1/* 3C * 3A/* 3A	205 (93.2%) 13 (5.9%) 1 (0.5%) 1 (0.5%)	62 (30.2%) 13 (86.7%)	23 (11.2%) 1 (6.7%)	7 (3.4%) 0 (0.0%)	6 (2.9%) 0 (0.0%)	18 (8.8%) 8 (53.3%)		36 (17.6%) 1 (6.7%)
Kim et al. (2010) [32]	* 1/* 1 * 1/* 3C	279 (97.6%) 7 (2.4%)					111 (39.8%) 5 (71.4%)		
Lee et al. (2017) [5]	* 1/* 1 * 1/* 3	135 (96.4%) 5 (3.6%)					30 (21.4%) 20 (14.3%)		
Ribaldone et al. (2019) [17]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A	192 (96.0%) 2 (1.0%) 6 (3.0%)		24 (40.0%)		26 (43.3%) 2 (3.3%)	6 (10.0%)		2 (3.3%)
Stocco et al. (2005) [8]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A	65 (92.9%) 1 (1.4%) 4 (5.7%)	7 (10.0%)						
Uchiyama et al. (2009) [18]	* 1/* 1		4 (25.0%)		5 (31.3%)		12 (75.0%)		1 (6.3%)
von Ahlsen et al. (2005) [38]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A	66 (93.0%) 1 (1.4%) 4 (5.6%)							1 (1.4%) 4 (5.6%)
Wang et al. (2018) [19]	* 1/* 1 * 1/* 3C	216 (98.6%) 3 (1.4%)						18 (22.8%) 1 (05%)	
Winter et al. (2007) [39]	* 1/* 1 * 1/* 3A * 1/* 3C	119 (91.5%) 8 (6.2%) 3 (2.3%)		8 (6.2%) 1 (0.8%)	3 (2.3%) 1 (0.8%)	1 (0.8%)	9 (6.9%) 1 (0.8%)		14 (10.7%)
Wroblowa et al. (2012) [9]	* 1/* 1 * 1/* 3A * 1/* 3B * 1/* 3C	172 (91.5%) 13 (6.9%) 2 (1.1%) 1 (0.5%)	26 (13.8%) 8 (4.3%)	3 (1.6%) 1 (0.5%)	3 (1.6%) 1 (0.5%)	2 (1.1%)			
Zabala-Fernández et al. (2011) [13]	* 1/* 1 * 1/* 2 * 1/* 3A * 1/* 3C	217 (93.5%) 3 (1.3%) 11 (4.7%) 1 (0.4%)	9 (3.9%) 1 (0.4%) 2 (0.9%)	5 (2.2%)	15 (6.5%) 1 (0.4%)	14 (5.6%)	18 (7.8%) 1 (0.4%)		
Zhu et al. (2016) [42]	* 1/* 1 * 1/* 3C	245 (96.8%) 8 (3.2%)					62 (24.5%) 3 (1.2%)		

Abbreviations: TPMT: Thiopurine S-methyl-transferase enzyme.

Table 5. Association between TPMT polymorphisms and adverse effects.

Authors (Year)	TPMT Genotypes	Patients with AEs	Patients without AEs		(IC 95%)	p-Value
AL-Judaibi et al. (2016) [22]	variant (* 3A) wild (* 1/* 1)	3 (17.6%) 14 (82.4%)	2 (5.6%) 34 (94.4%)	OR = 3.64	0.55–24.23	0.3127
Ansari et al. (2008) [23]	variants * 1/* 1	15 (79.0%) 66 (35.0%)				
Coelho et al. (2016) [1]	TPMT * 3A * 1/* 1	5 (55.6%) 9 (13.1%)	4 (44.4%) 60 (86.9%)			
Coenen et al. (2015) [6]	variants * 1/* 1	9 (12.2%) 51 (7.3%)		RR = 0.11 RR = 1.2	0.01–0.85 0.72–2.09	
Coucoutsis et al. (2017) [11]	variants * 1/* 1	3 (3.3%) 20 (22.0%)	14 (15.4%) 54 (59.3%)	OR = 8.87	0.97–81.11	0.048
Gazouli et al. (2010) [3]	* 1/* 1 variants	1 (1.0%) 4 (4.1%)	85 (87.6%) 7 (7.2%)			
Hlavaty et al. (2013) [31]	* 1/* 1 variants	62 (30.2%) 13 (86.7%)	143 (69.8%) 2 (13.3%)	OR = 15.0	3.3–68.5	0.00002
Ribaldone et al. (2019) [17]	* 1/* 1 variants	58 (29.0%) 2 (1.0%)	134 (67.0%) 6 (3.0%)	OR = 0.77	0.08–7.7	0.82
Wroblowa et al. (2012) [9]	* 1/* 1 variants	34 (18.1%) 10 (5.3%)	138 (73.4%) 6 (3.2%)		2.124–17.094	<0.01
Zelinkova et al. (2006) [40]	* 1/* 1 variants	3 (1.1%) 4 (1.5%)	235 (89.8%) 20 (7.6%)	OR = 6.316	2.141–18.634	0.004
Zhu et al. (2016) [42] ^a	* 1/* 1 * 1/* 3C	62 (24.5%) 3 (1.2%)	183 (72.3%) 5 (2.0%)	OR = 1.21	0.74–1.97	0.44

Note: OR: Odds ratio; RR: relative risk; “^a” authors only evaluated the adverse reaction leukopenia.

3.3. Effect of Genotype on Thiopurine Efficacy

Studies indicate that males are six times more likely to experience a reduced response to AZA compared to females. However, females have more AEs (52.6%), especially patients over 40. Additionally, females are two to three times more likely to develop leukopenia than younger females and males. Smokers are more susceptible to developing leukopenia and respond poorly to therapy [16,22,36,42]. The correlation between the expected clinical response and the reduced response with the presence or absence of the TPMT polymorphism in the participants of the selected studies is shown in Table 6.

Table 6. Association between clinical response and TPMT polymorphisms.

Authors (Year)	TPMT Genotypes	Reduced	Response Expected	Indeterminate	OR	CI 95%	p-Value
AL-Judaibi et al. (2016) [22]	variants * 1/* 1	2 (7.7%) 24 (92.3%)	2 (12.5%) 14 (87.5%)		0.583	0.074–4.615	0.628
Ansari et al. (2008) [23]	variants * 1/* 1	- -	55 (81.0%) 24 (43.0%)				<0.001
Coelho et al. (2016) [1]	variants * 1/* 1	10 (76.9%) 3 (23.1%)	22 (43.1%) 28 (54.9%)				0.003
Dubinsky et al. (2000) [26]	variants * 1/* 1	- 15 (16.3%)	8 (8.7%) 39 (42.4%)				
Gazouli et al. (2010) [3]	variants * 1/* 1	- 3 (3.1%)	11 (11.3%) 83 (85.6%)				
Lee et al. (2017) [5]	variants * 1/* 1	45 (32.1%) -	90 (64.3%) 5 (3.6%)				<0.001
Palmieri et al. (2007) [15]	variants * 1/* 1	45 (10.7%) 45 (10.7%)	45 (10.7%) 304 (72.0%)				
Stocco et al. (2005) [8]	variants * 1/* 1	2 (40.0%) 17 (33.3%)	3 (60.0%) 34 (66.7%)				
Zabala-Fernández et al. (2011) [13]	variants * 1/* 1	8 (3.5%) 125 (53.9%)	4 (1.7%) 30 (12.9%)	3 (1.3%) 62 (26.7%)	2.74	0.81–9.22	0.096

Note: OR: Odds ratio; CI: confidence interval.

4. Discussion

4.1. TPMT Genotypes and Adverse Effects

Our review provides a comprehensive analysis of TPMT genotypes and their association with adverse effects (AEs), unlike most previous work focused on the hematological toxicity of thiopurines.

Most dosing guidelines for AZA in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD) are primarily based on studies involving Caucasian patients, where a daily dose of 2 to 3 mg/kg of AZA (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) or 1.5 to 2.5 mg/kg (European Crohn's and Colitis Organization) is recommended for patients with regular TPMT activity. However, applying these guidelines to other ethnicities requires further evaluation in terms of therapeutic efficacy and toxicity. Japanese populations, for example, have shown that lower doses of AZA are sufficient to achieve clinical efficacy and therapeutic concentrations of 6-TGN [34,36]. In a study by Kim et al. (2010), it was observed that only 35.3% of patients could be treated with more than 2.0 mg/kg of AZA. Additionally, Coenen et al. (2015) reported a 40.0% discontinuation rate of thiopurine therapy due to AEs, which is relatively high when compared to other studies [6,32].

Although AZA is cost-effective, one of the most common and potentially severe AEs is myelosuppression, occurring in 3 to 7% of patients, leading to severe and possibly fatal infections [9,19]. It has been shown that leukopenia is the most common form of thiopurine-induced myelosuppression, with severe cases often emerging within the first month of therapy, but capable of occurring at any point during treatment [2,22,34,39–41]. Approximately 37% of the patients presented leukopenia with less than three months of treatment, 22.4% of the patients within 3 to 6 months, 13.8% within 6 to 12 months, 22.4% at 12 to 24 months, and 14.7% after 24 months of treatment with AZA/6-MP [9,18,32]. Furthermore, leukopenia can develop abruptly without any symptoms or warning signs, and its incidence can be as high as 47% in patients on thiopurine and 5-aminosalicylate (5-ASA) combination therapy compared to 16% in patients on thiopurine monotherapy [2,8,22,34].

Despite limited research, some studies have explored factors that can affect the activity of TPMT, showing that the induction of the enzyme with the use of thiopurines in up to 35% of patients and its inhibition by the use of some drugs such as acetylsalicylic acid, furosemide, and 5-ASA, mainly mesalazine and sulfasalazine, associated with thiopurines, may increase occurrences of AEs in up to 92% of associations. Salicylic acid-based drugs are thought to induce adverse reactions by reducing TPMT activity, raising the blood level of 6-TGN as the dose increases during the co-administration of 5-ASA [7,10,12,16,18,29,31,35].

Kim et al. (2010) pointed out that the high occurrence of bone marrow suppression during AZA/6-MP treatment could not be solely attributed to genotyping or TPMT activity. This suggests that myelosuppression is a multifactorial outcome, requiring further investigation [32,41]. Several factors, including the influence of the therapeutic dose of AZA and the co-administration of 5-ASA, which is commonly used to induce and maintain remission, suggest that 5-ASA inhibits TPMT and interacts with AZA, potentially leading to increased 6-TGN levels in 82% to 100% of patients, suggesting greater therapeutic efficacy, but also a higher risk of leukopenia [5,16,32,34,41].

In contrast to the decrease in 6-MMP levels, a statistically insignificant increase in the levels is observed among patients undergoing 5-ASA therapy. Some studies are not consistent with the hypothesis that this increase in 6-TGN and 6-MMP is due to TPMT inhibition, suggesting that 5-ASA may affect AZA and 6-MP metabolism through mechanisms not related to enzyme inhibition. Such inhibition of TPMT by 5-ASA medications and their metabolites occurs *in vitro* but not *in vivo*, as the inhibitor is removed during the washout steps of the assay [29,33,34,38]. Salicylic acid preparations are standard medications for IBD, and many patients with refractory IBD, requiring thiopurines, have likely already undergone treatment with 5-ASA. Thus, the dose of 5-ASA is unlikely to increase thiopurine-induced AEs significantly. However, patients with reduced TPMT activity should have this association evaluated cautiously [18].

Considering these findings, a likely interaction between 5-ASA and TPMT/6-TGN needs to be considered seriously, as patients with IBD, especially with active ulcerative colitis (UC), may be receiving high doses of 5-ASA, up to 4 g/day, and, with such a high dose, the inhibition of TPMT and increase in the mean 6-TGN levels cannot be disregarded, even with dose-adjusting thiopurines [12,29,38].

Several studies that relate the reduced enzymatic activity of TPMT and the occurrence of severe AEs suggest that other factors could be involved in addition to the genetic variability of this enzyme [3,7,8,16,33,38]. Among the studies evaluated in this review, 21 (52%) directly correlated TPMT polymorphisms with the occurrence of adverse effects, particularly leukopenia, bone marrow toxicity, hepatotoxicity, pancreatitis, nausea, and vomiting (Figure 2). AEs such as fever, rash, myalgia, and arthralgia, thought to be allergic reactions, have been observed in patients able to tolerate AZA at therapeutic doses, leading researchers to question the nature of these events, suggesting that they are related to a type of hypersensitivity reaction, rather than TPMT pharmacogenetics [7].

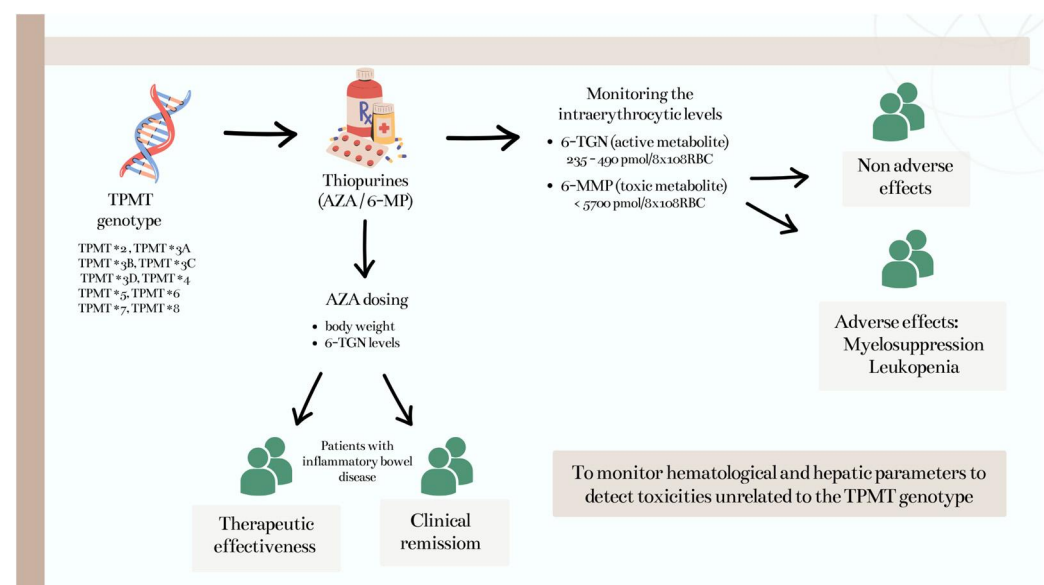


Figure 2. TPMT genotyping as a clinical tool for patients with IBD receiving thiopurines.

4.2. Ethnic Variations in Thiopurine Dosing and Efficacy

The authors point out that differences between reports of the occurrence of AEs reported in studies can be explained by the racial backgrounds and the differing definitions of the threshold values adopted by the authors. For instance, many define the occurrence of these AEs when the leukocyte count is less than 3000/ μ L, neutrophils < 1500/ μ L, and lymphocytes < 1000/ μ L; alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase when enzymatic activity exceeds twice the upper limit of the reference range; and for pancreatitis, the occurrence of severe abdominal pain and the three-fold elevation of serum amylase and/or lipase [9,13,25–27,32,41]. Another important finding is that pancreatitis has been observed as an idiosyncratic reaction in Western populations (2.8–7.4%) [9,14].

Fangbin et al. (2012) emphasize that evaluating the TPMT genotype has been considered a promising area in identifying the metabolic profiles of patients with a higher risk of AEs. However, there are studies reporting patients of different ethnicities who had leukopenia and did not have the TPMT variant allele, suggesting that the TPMT polymorphism does not efficiently predict AZA-induced leukopenia. Furthermore, the genetic polymorphism of TPMT differs significantly between populations [14,16,17,19].

4.3. Myelosuppression and Environmental Factors

Gazouli et al. (2010) reported that, in addition to genotype, environmental factors are important in influencing TPMT activity and the intraindividual variability observed in pa-

tient responses receiving thiopurines [3]. Consequently, an analysis of the TPMT genotypes before starting treatment may be useful for predicting myelosuppression and other AEs in IBD patients with TPMT polymorphisms, in addition to measurements of the enzyme activity and concentration of 6-TGNs, to ensure the safe use of AZA/6-MP [3,8,13,16,24]. The research indicates that TPMT activity varies approximately four-fold between the normal and intermediate metabolizers and varies inversely with the 6-TGN concentrations, suggesting that TPMT activity explains only 30% of the variation in the thiopurine dose, suggesting the involvement of other factors. Additional factors such as other drug treatment, age of red blood cells, and transfusions also influence TPMT enzyme activity [7,10,12,16,29,31,35].

Thiopurine treatment presents challenges due to the need for a dose–response relationship and a lengthy delay before therapeutic efficacy becomes evident. As for a dose–response relationship, the establishment of this profile is complicated by the genetic polymorphism associated with the activity of the TPMT enzyme [12]. Overall, a complete clinical response to AZA occurs in around 38% of patients, with a notable connection between the lower neutrophil counts and the response to AZA [23]. Previous studies on the influence of TPMT have focused on predicting toxicity in those with a TPMT deficiency (heterozygotes and homozygotes for the TPMT variant) at a high risk of severe neutropenia and other AEs, even at standard doses of AZA. However, high TPMT activity may also predict a poor clinical response due to a preference for 6-MP methylation over 6-TGNs bioactivation [13,23].

Very high TPMT activity can be a reliable predictor of a need for allopurinol co-therapy, or an alternative immunosuppressant to be recommended to prevent severe myelotoxicity, as allopurinol potentially inhibits xanthine oxidase (XO), necessitating 25–33% of the standard daily dose of AZA or 6-MP [3,16–18,23,34,40]. Especially in these situations, the therapeutic monitoring of the metabolites 6-TGN and 6-MMP is an option that can help optimize drug therapy and minimize AEs; however, it needs to be addressed. In contrast, patients diagnosed with IBD, experiencing disease exacerbation during thiopurine maintenance, are generally subjected to a change of therapy to biologics, with no further attempt to optimize thiopurine dosing based on metabolite levels [4,16,34].

4.4. TPMT Genotypes, Metabolite Levels, and Clinical Response

Therapeutic monitoring is the only method to reveal non-compliance with thiopurine therapy, playing an important role in the case of refractory IBD. Theoretically, zero or deficient levels of 6-TGN could result from other factors such as thiopurine malabsorption, unknown enzyme defects, or enzymes with extremely high activity in the thiopurine metabolic pathway [4,8,12]. In recent years, the concentrations of the thiopurine metabolites, 6-TGN and 6-MMP, associated with a clinical response have been described by several studies, defining a therapeutic range between 235 and 490 pmol/ 8×10^8 RBC. Patients with 6-TGN levels exceeding 490 pmol/ 8×10^8 RBC are at an increased risk of leukocytopenia, whereas higher 6-MMP levels above 5700 pmol/ 8×10^8 RBC are associated with hepatotoxicity [4,5,29].

An analysis comparing patients with different 6-TGN values and the occurrence of a clinical response showed that there was a difference between the groups, where 74% of patients with 6-TGN > 100 pmol/ 8×10^8 RBC showed a clinical response compared to 46% with 6-TGN < 100 pmol/ 8×10^8 RBC, increasing the probability of success in the clinical response of patients by 4.6 times. These results were corroborated by other similar studies where patients with higher levels of 6-TGN had a successful clinical response (57.6%, 313 pmol/ 8×10^8 RBC versus 42.4%, 209 pmol/ 8×10^8 RBC) (85%, greater than 225 pmol/ 8×10^8 RBC vs. 17%) [5,23,25–27]. When assessing the AEs in patients with high concentrations of 6-TGN (above 286 pmol/ 8×10^8 RBC), 22.6 to 30.0% had leukopenia, corroborating the literature which states that the concentration of intraerythrocytic 6-TGN, not the thiopurine dose, is significantly and independently associated with the therapeutic response. Other factors were evaluated but unrelated, such as age, sex, and type of disease (CD or UC) [5,16,25–27,29].

If 6-TGN concentrations are used to indicate the likely therapeutic efficacy, the actual difference in dose may be three-fold instead of two-fold, relative to intermediate metabolite status subjects, as suggested by some investigators and guidelines; however, these may require half the dose of patients with normal metabolizers. Thus, 6-TGN concentrations, as a clinical point above 235 to 260 pmol/ 8×10^8 RBC, are associated with a three-fold more significant likelihood of remission [28]. Although these studies did not find a correlation between the metabolite levels and thiopurine doses resulting from differences in an inter-individual metabolism, in clinical practice, metabolites are dosed on a dose per patient body weight basis (AZA 2.0–3.0 mg/kg and 6-MP 1.0–1.5 mg/kg). However, patients with leukopenia may not reach the recommended AZA dose [4,12,32,36]. Chang et al. (2019) reported in their study that, although the duration of patient follow-up or cumulative drug dosage did not show a statistical difference according to TPMT genotyping, patients who underwent genotyping before starting treatment had a lower number of outpatient visits (7.8 ± 3.2 vs. 9.0 ± 3.9) and required a lower thiopurine dosage, discontinuation, or dose reductions (15.3% vs. 33.7%) during the study period [2].

In our review, some observed limitations included the characteristics of the published literature available for analysis. There is a high degree of heterogeneity among the included studies, which may be attributed to differences in the study design (clinical and randomized cohort studies), variations in the patient populations across the reported studies, and disparities in the definition of adverse effects. Further prospective multicenter studies are required to elucidate disease-specific variations in polymorphisms, especially within specific populations. Additionally, these studies can help identify new polymorphisms that could potentially explain leukopenia in patients lacking these recognized genetic variants.

Finally, we emphasize the importance of genotyping before or during the initial phase of treatment with thiopurines to ensure the continuity of treatment, monitor severe AEs, and contribute to reducing the medical budget and laboratory tests, which are usually necessary. Previous knowledge of TPMT genotyping is an important predictor of clinical response and may significantly reduce the occurrence of myelosuppression or thiopurine-induced leukopenia. However, genotyping before initiating thiopurine therapy cannot replace the current practice of periodically monitoring WBC and neutrophil counts [2,7,9,13,14,17,30].

5. Conclusions

Thiopurines such as AZA and 6-MP are effective in maintaining clinical remission in patients with IBD, but the long-term use of these drugs is associated with serious AEs, particularly bone marrow suppression.

Monitoring the intraerythrocytic levels of 6-TGN (active metabolite) and 6-MMP (toxic metabolite) in patients with IBD undergoing remission or maintenance therapy allows health professionals to be able to prevent or reduce the occurrence of AEs such as myelosuppression and other toxic effects. The quantification of AZA metabolites emerges as a valuable clinical tool for enhancing the precision and personalization of AZA therapy in IBD. While AZA dosing traditionally considers body weight, studies have revealed a limited correlation between dose per weight and 6-TGN levels. Therefore, it is advisable to routinely measure 6-TGN levels, even for patients adhering to the recommended AZA dosage. This practice provides valuable insights into the therapeutic effectiveness of the drug, allowing for more assertive treatment decisions and improved patient outcomes.

TPMT genotyping is also useful to suggest the most appropriate dose of thiopurines to start the treatment and prevent myelotoxicity and other AEs in patients with IBD, being essential to perform it at least in patients with IBD where AZA therapy is considered for treatment. However, healthcare professionals should also monitor patients treated with thiopurines for biochemical, hematological, and hepatic parameters to detect toxicities.

Author Contributions: Conceptualization, J.W.L.N., A.C.R. and J.M.F.C.; methodology, A.C.R., P.d.F.P. and P.S.A.S.G.; writing—original draft preparation, A.C.R., J.W.L.N. and P.S.A.S.G.; writing—review and editing, A.C.R., J.W.L.N., P.S.A.S.G., J.M.F.C. and P.d.F.P.; supervision, P.d.F.P. and J.W.L.N.; project administration, J.W.L.N.; funding acquisition, J.W.L.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Brazilian Ministry of Health and the Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG) (PPSUS/FAPEMIG-grant #APQ-03823-17), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets used in this study can be found in the full-text, tables and references that were included in the systematic review and are available on request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Coelho, T.; Andreoletti, G.; Ashton, J.J.; Batra, A.; Afzal, N.A.; Gao, Y.; Williams, A.P.; Beattie, R.M.; Ennis, S. Genes implicated in thiopurine-induced toxicity: Comparing TPMT enzyme activity with clinical phenotype and exome data in a paediatric IBD cohort. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34658. [CrossRef]
- Chang, J.Y.; Park, S.J.; Jung, E.S.; Jung, S.-A.; Moon, C.M.; Chun, J.; Park, J.J.; Kim, E.S.; Park, Y.; Kim, T.-I.; et al. Genotype-based Treatment With Thiopurine Reduces Incidence of Myelosuppression in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *18*, 2010–2018.e2. [CrossRef]
- Gazouli, M.; Pachoula, I.; Panayotou, I.; Mantzaris, G.; Syriopoulou, V.P.; Goutas, N.; Vlachodimitropoulos, D.; Anagnou, N.P.; Roma-Giannikou, E. Thiopurine S-methyltransferase genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease Greek patients. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2010**, *35*, 93–97. [CrossRef]
- Gilissen, L.P.; Wong, D.R.; Engels, L.G.; Bierau, J.; Bakker, J.A.; Paulussen, A.D.; Romberg-Camps, M.J.; Stronkhorst, A.; Bus, P.; Bos, L.P.; et al. Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant IBD patients on maintenance therapy. *J. Crohn's Colitis* **2012**, *6*, 698–707. [CrossRef]
- Lee, J.H.; Kim, T.J.; Kim, E.R.; Hong, S.N.; Chang, D.K.; Choi, L.-H.; Woo, H.I.; Lee, S.-Y.; Kim, Y.-H. Measurements of 6-thioguanine nucleotide levels with TPMT and NUDT15 genotyping in patients with Crohn's disease. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188925. [CrossRef]
- Coenen, M.J.; de Jong, D.J.; van Marrewijk, C.J.; Derijks, L.J.; Vermeulen, S.H.; Wong, D.R.; Klungel, O.H.; Verbeek, A.L.; Hooymans, P.M.; Peters, W.H.; et al. Identification of Patients with Variants in TPMT and Dose Reduction Reduces Hematologic Events during Thiopurine Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 907–917.e7. [CrossRef] [PubMed]
- Gearry, R.B.; Barclay, M.L.; Burt, M.J.; Collett, J.A.; Chapman, B.A.; Roberts, R.L.; Kennedy, M.A. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype does not predict adverse drug reactions to thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *18*, 395–400. [CrossRef] [PubMed]
- Stocco, G.; Martelossi, S.; Barabino, A.; Fontana, M.; Lionetti, P.; Decorti, G.; Malusà, N.; Bartoli, F.; Fezzi, M.; Giraldi, T.; et al. TPMT genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis.* **2005**, *37*, 940–945. [CrossRef]
- Wrobleva, K.; Kolorz, M.; Batovsky, M.; Zboril, V.; Suchankova, J.; Bartos, M.; Ulicny, B.; Pav, I.; Bartosova, L. Gene Polymorphisms Involved in Manifestation of Leucopenia, Digestive Intolerance, and Pancreatitis in Azathioprine-Treated Patients. *Dig. Dis. Sci.* **2012**, *57*, 2394–2401. [CrossRef] [PubMed]
- Bayoumy, A.B.B.; Mulder, C.J.J.; Loganayagam, A.; Sanderson, J.D.; Anderson, S.; Boekema, P.J.; Derijks, L.J.J.; Ansari, A.R. Relationship between Thiopurine S-Methyltransferase Genotype/Phenotype and 6-Thioguanine Nucleotide Levels in 316 Patients With Inflammatory Bowel Disease on 6-Thioguanine. *Ther. Drug Monit.* **2021**, *43*, 617–623. [CrossRef] [PubMed]
- Coucoutsis, C.; Emmanouil, G.; Goulielmos, G.; Sfakianaki, O.; Koutroubakis, I.E.; Kouroumalis, E.A. Prevalence of thiopurine S-methyltransferase gene polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease from the island of Crete, Greece. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *29*, 1284–1289. [CrossRef] [PubMed]
- Hanai, H.; Iida, T.; Takeuchi, K.; Arai, O.; Watanabe, F.; Abe, J.; Maruyama, Y.; Oohata, A.; Ikeya, K.; Kageoka, M.; et al. Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis: The clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1376–1381. [CrossRef] [PubMed]
- Zabala-Fernández, W.; Barreiro-De Acosta, M.; Echarri, A.; Carpio, D.; Lorenzo, A.; Castro, J.; Martínez-Ares, D.; Pereira, S.; Martín-Granizo, I.; Corton, M.; et al. A Pharmacogenetics Study of TPMT and ITPA Genes Detects a Relationship with Side Effects and Clinical Response in Patients with Inflammatory Bowel Disease Receiving Azathioprine. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2011**, *20*, 247–253. Available online: <http://www.e-biometria.com/g-stat/index.html> (accessed on 29 June 2023).

14. Fangbin, Z.; Xiang, G.; Minhu, C.; Liang, D.; Feng, X.; Min, H.; Pinjin, H. Should Thiopurine Methyltransferase Genotypes and Phenotypes be Measured Before Thiopurine Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease? *Ther. Drug Monit.* **2012**, *34*, 695–701. [[CrossRef](#)]
15. Palmieri, O.; Latiano, A.; Bossa, F.; Vecchi, M.; D'incà, R.; Guagnozzi, D.; Tonelli, F.; Cucchiara, S.; Valvano, M.R.; Latiano, T.; et al. Sequential evaluation of thiopurine methyltransferase, inosine triphosphate pyrophosphatase, and HPRT1 genes polymorphisms to explain thiopurines' toxicity and efficacy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *26*, 737–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Odahara, S.; Uchiyama, K.; Kubota, T.; Ito, Z.; Takami, S.; Kobayashi, H.; Saito, K.; Koido, S.; Ohkusa, T. A Prospective Study Evaluating Metabolic Capacity of Thiopurine and Associated Adverse Reactions in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137798. [[CrossRef](#)]
17. Ribaldone, D.G.; Adriani, A.; Caviglia, G.P.; De Nicolò, A.; Agnesod, D.; Simiele, M.; Riganò, D.; Pellicano, R.; Canaparo, R.; Di Perri, G.; et al. Correlation between Thiopurine S-Methyltransferase Genotype and Adverse Events in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Medicina* **2019**, *55*, 441. [[CrossRef](#)]
18. 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.* **2009**, *44*, 197–203. [[CrossRef](#)]
19. He, Y.; Wang, H.-X.; Liao, C.-L.; Peng, Y.; Tao, L.-J.; Zhang, W.; Yang, H.-X. Comparison of TPMT and NUDT15 polymorphisms in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 941–948. [[CrossRef](#)]
20. Higgins, J.P.T.; Thomas, J.; Chandler, J.; Cumpston, M.; Li, T.; Page, M.J.; Welch, V.A. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3. Handbook*. 2021. Available online: www.training.cochrane.org/handbook (accessed on 20 February 2023).
21. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst. Rev.* **2021**, *10*, 89. [[CrossRef](#)]
22. Al-Judaibi, B.; Schwarz, U.I.; Huda, N.; Dresser, G.K.; Gregor, J.C.; Ponich, T.; Chande, N.; Mosli, M.; Kim, R.B. Genetic Predictors of Azathioprine Toxicity and Clinical Response in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* **2016**, *23*, e26–e36. [[PubMed](#)]
23. Ansari, A.; Arenas, M.; Greenfield, S.M.; Morris, D.; Lindsay, J.; Gilshenan, K.; Smith, M.; Lewis, C.; Marinaki, A.; Duley, J.; et al. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *28*, 973–983. [[CrossRef](#)]
24. Ban, H.; Andoh, A.; Tanaka, A.; Tsujikawa, T.; Sasaki, M.; Saito, Y.; Fujiyama, Y. Analysis of Thiopurine S-Methyltransferase Genotypes in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Intern. Med.* **2008**, *47*, 1645–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dubinsky, M.C.; Yang, H.; Hassard, P.V.; Seidman, E.G.; Kam, L.Y.; Abreu, M.T.; Targan, S.R.; Vasiliauskas, E.A. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 904–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dubinsky, M.C.; Lamothe, S.; Yang, H.Y.; Targan, S.R.; Sinnett, D.; Théorêt, Y.; Seidman, E.G. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2000**, *118*, 705–713. [[CrossRef](#)]
27. Fangbin, Z.; Xiang, G.; Liang, D.; Hui, L.; Xueding, W.; Baili, C.; Huichang, B.; Yinglian, X.; Peng, C.; Lizi, Z.; et al. Prospective Evaluation of Pharmacogenomics and Metabolite Measurements upon Azathioprine Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Medicine* **2016**, *95*, e3326. [[CrossRef](#)]
28. Gardiner, S.J.; Gearry, R.B.; Begg, E.J.; Zhang, M.; Barclay, M.L. Thiopurine Dose in Intermediate and Normal Metabolizers of Thiopurine Methyltransferase May Differ Three-Fold. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *6*, 654–660. [[CrossRef](#)]
29. Hande, S.; Wilson-Rich, N.; Bousvaros, A.; Zholudev, A.; Maurer, R.; Banks, P.; Makrauer, F.; Reddy, S.; Burakoff, R.; Friedman, S. 5-Aminosalicylate therapy is associated with higher 6-thioguanine levels in adults and children with inflammatory bowel disease in remission on 6-mercaptopurine or azathioprine. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12*, 251–257. [[CrossRef](#)]
30. Hibi, T.; Naganuma, M.; Kitahora, T.; Kinjyo, F.; Shimoyama, T. Low-dose azathioprine is effective and safe for maintenance of remission in patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* **2003**, *38*, 740–746. [[CrossRef](#)]
31. Hlavaty, T.; Batovsky, M.; Balakova, D.; Pav, I.; Celec, P.; Gregus, M.; Zakuciova, M.; Hlista, M.; Horakova, M.; Desatova, B.; et al. The impact of thiopurine-S-methyltransferase genotype on the adverse drug reactions to azathioprine in patients with inflammatory bowel diseases. *Bratisl. Med. J.* **2013**, *114*, 199–205. [[CrossRef](#)]
32. Kim, J.H.; Cheon, J.H.; Hong, S.S.; Eun, C.S.; Byeon, J.S.; Hong, S.Y.; Kim, B.Y.; Kwon, S.H.; Kim, S.W.; Han, D.S.; et al. 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.* **2010**, *44*, e242–e248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, M.-N.; Kang, B.; Choi, S.Y.; Kim, M.J.; Woo, S.Y.; Kim, J.-W.; Choe, Y.H.; Lee, S.-Y. Impact of Genetic Polymorphisms on 6-Thioguanine Nucleotide Levels and Toxicity in Pediatric Patients with IBD Treated with Azathioprine. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 2897–2908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lee, M.-N.; Kang, B.; Choi, S.Y.; Kim, M.J.; Woo, S.Y.; Kim, J.-W.; Choe, Y.H.; Lee, S.-Y. Relationship Between Azathioprine Dosage, 6-Thioguanine Nucleotide Levels, and Therapeutic Response in Pediatric Patients with IBD Treated with Azathioprine. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 1054–1062. [[CrossRef](#)]

35. Lindqvist, M.; Hindorf, U.; Almer, S.; Söderkvist, P.; Ström, M.; Hjortswang, H.; Peterson, C. No Induction of Thiopurine Methyltransferase during Thiopurine Treatment in Inflammatory Bowel Disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *25*, 1033–1037. [[CrossRef](#)]
36. Sheffield, L.J.; Irving, P.; Gupta, A.; Byron, K.; Macrae, F.A.; Phillimore, H.; Dronavalli, M.; Rose, R.; George, P.; Walmsley, T.; et al. Thiopurine methyltransferase and thiopurine metabolite testing in patients with inflammatory bowel disease who are taking thiopurine drugs. *Pharmacogenomics* **2009**, *10*, 1091–1099. [[CrossRef](#)]
37. Teml, A.; Schwab, M.; Harrer, M.; Miehsler, W.; Schaeffeler, E.; Dejaco, C.; Mantl, M.; Schneider, B.; Vogelsang, H.; Reinisch, W. A prospective, open-label trial of 6-thioguanine in patients with ulcerative or indeterminate colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2005**, *40*, 1205–1213. [[CrossRef](#)]
38. von Ahsen, N.; Armstrong, V.W.; Behrens, C.; von Tirpitz, C.; Stallmach, A.; Herfarth, H.; Stein, J.; Bias, P.; Adler, G.; Shipkova, M.; et al. Association of Inosine Triphosphatase 94C>A and Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency with Adverse Events and Study Drop-Outs under Azathioprine Therapy in a Prospective Crohn Disease Study. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2282–2288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Winter, J.W.; Gaffney, D.; Shapiro, D.; Spooner, R.J.; Marinaki, A.M.; Sanderson, J.D.; Mills, P.R. Assessment of thiopurine methyltransferase enzyme activity is superior to genotype in predicting myelosuppression following azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *25*, 1069–1077. [[CrossRef](#)]
40. Zelinkova, Z.; Derijks, L.J.; Stokkers, P.C.; Vogels, E.W.; van Kampen, A.H.; Curvers, W.L.; Cohn, D.; van Deventer, S.J.; Hommes, D.W. Inosine Triphosphate Pyrophosphatase and Thiopurine S-Methyltransferase Genotypes Relationship to Azathioprine-Induced Myelosuppression. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *4*, 44–49. [[CrossRef](#)]
41. Zhu, Q.; Cao, Q. Thiopurine methyltransferase gene polymorphisms and activity in Chinese patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Chin. Med. J.* **2012**, *125*, 3665–3670.
42. Zhu, X.; Wang, X.; Chao, K.; Zhi, M.; Zheng, H.; Ruan, H.; Xin, S.; Ding, N.; Hu, P.; Huang, M.; et al. NUDT15 polymorphisms are better than thiopurine S-methyltransferase as predictor of risk for thiopurine-induced leukopenia in Chinese patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *44*, 967–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

APÊNDICE B

QUADRO 4 - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM DII QUE PARTICIPARAM DO ESTUDO

Id.	Sexo	Idade (anos)	DII	Cor	Índice-	Bem estar	Dor abdominal	Processos cirúrgicos	Localização	Fenotipo	Queixas / Reações Adversas (medicamentos)
1	M	49	DC	Br	3	MB	N	Não	IC	IN, E	
2	F	56	DC	P	3	B	L	Não	IL	F, E	
3	F	33	DC	Pr	1	B	N	Não	CO	IN	
4	F	55	DC	Br	2	MB	N	Não	IC	F, E	
5	M	26	DC	P	0	B	N	Não	IL	F, E	
6	F	46	DC	P	9	B	S	Não	PA	F	09 ou mais evacuações líquidas/dia
7	F	17	DC	Br	3	B	L	Não	CO	IN, E	
8	F	53	RCU	Br	1	MR	N	Não	PA	IN	
9	F	51	DC	Br	9	B	L	Não	IL	F, E	
10	F	37	DC	P	4	B	S	Não	CO	IN	náuseas, vômitos e perda de apetite
11	M	20	RCU	Pr	7	B	L	Não	PA	IN	
12	M	48	DC	Pr	6	B	L	Fistulotomia	CO	E	
13	M	52	DC	Br	1	MB	N	Fistulotomia	IL	IN, F	
14	F	48	RCU	P	12	PE	M	Proctosigmoidite miomatose	PA	IN	
15	F	48	DC	Br	4	B	N	Não	CO	IN, E	
16	M	23	DC	Br	3	B	L	Não	IC	IN, F	
17	F	42	RCU	Br	2	MB	N	Não	PA	IN	
18	M	34	RCU	Br	2	B	N	Não	PA	ND	
19	F	60	DC	P	0	MB	N	Histerectomia miomatose	CO	IN	
20	M	46	DC	Br	10	PE	L	Não	CO	IN, F	
21	F	57	DC	Br	3	B	M	Não	IL	E	
22	F	52	DC	Br	7	B	L	Não	CO	IN	07 - 08 evacuações líquidas/dia
23	F	46	DC	Br	7	B	S	Não	CO	IN	
24	F	36	DC	Br	2	B	L	Não	IL	IN	náuseas, vômitos e perda de apetite
25	M	19	DC	P	5	B	M	Não	IC	IN, E	01 - 02 evacuações líquidas/dia
26	F	34	DC	Br	1	B	N	Não	CO	IN	empazamento

Continuação quadro 4

Id.	Sexo	Idade (anos)	DII	Cor	Índice*	Bem estar	Dor abdominal	Processos cirúrgicos	Localização	Fenotipo	Queixas / Reações Adversas (medicamentos)
27	M	29	DC	Br	3	MB	M	Não	IL	IN, F	pele ressecada, lesões e manchas, queda de cabelo
28	M	40	DC	P	6	MB	S	Não	IL	F, E	01 - 02 evacuações líquidas/dia
29	M	53	DC	P	3	B	N	Ileocolectomia	IC	IN, E	
30	M	54	DC	Br	15	R	S	Não	CO	IN, E	07 - 08 evacuações líquidas/dia
31	F	20	DC	Br	1	B	N	Fistulotomia	IC	IN, E	
32	F	50	DC	Br	3	R	N	Fistulotomia	IC	F, E	
33	F	50	DC	Br	6	MB	S	Não	IC	IN	
34	F	60	DC	Br	6	B	L	Não	IC	E	
35	F	53	DC	Br	2	R	N	Não	IC	IN	
36	F	48	DC	Br	2	B	N	Não	IL	IN	
37	F	39	RCU	Br	2	B	L	Não	PA	ND	
38	F	44	DC	Br	2	B	N	Não	IL	E	
39	F	48	DC	Br	1	B	N	Não	CO	F, E	
40	F	51	RCU	Br	20	R	S	Não	PA	IN	
41	F	62	DC	Br	4	MB	L	Não	IL	IN	
42	F	45	DC	Br	4	B	N	Não	IC	F, E	
43	F	37	RCU	Br	7	B	M	Não	PA	IN	01 - 02 evacuações líquidas/dia
44	M	34	RCU	P	4	MR	N	Não	PA	IN	
45	F	45	DC	Br	1	B	N	Não	IC	ND	
46	M	26	RCU	Br	6	R	N	Não	PA	IN	03 - 04 evacuações líquidas/dia
47	M	18	DC	Br	1	MB	N	Não	IC	IN, E	
48	M	64	DC	Br	2	B	N	Não	IL	E	piora da visão (aumento do grau)
49	F	51	DC	Br	1	B	N	Não	IC	IN	
50	M	57	DC	Br	0	MB	N	Não	IL	E	
51	F	23	DC	Br	2	B	N	Fistulotomia	IC	F, E	
52	M	29	RCU	Br	2	B	L	Não	PA	IN	
53	M	37	DC	Br	4	MB	N	Suboclusão intestinal	CO	F	
54	F	53	DC	Br	1	B	N	Não	ND	ND	
55	F	41	DC	Br	3	B	L	Não	IC	IN, E	

Continuação quadro 4

Id.	Sexo	Idade (anos)	DII	Cor	Índice*	Bem estar	Dor abdominal	Processos cirúrgicos	Localização	Fenotipo	Queixas / Reações Adversas (medicamentos)
56	F	64	RCU	Br	0	MB	N	Não	IC	ND	
57	M	30	DC	Br	2	B	L	Não	IL	IN	
58	M	23	DC	Br	5	B	I	Não	IC	IN	
59	F	36	DC	Br	11	R	S	Ileocolectomia	IC	E	
60	M	55	DC	P	3	B	N	Suboclusão intestinal	ND	ND	
61	M	47	DC	Br	10	PE	S	Não	IL	IN, E	
62	M	48	RCU	P	6	PE	L	Não	PA	ND	
63	M	56	RCU	Br	6	B	N	Não	PA	IN	
64	M	56	RCU	Br	4	MB	N	Não	PA	ND	hepatotoxicidade
65	M	18	DC	Pr	7	MB	S	Não	IL	IN	03 - 04 evacuações líquidas/dia
66	M	36	DC	Br	4	B	N	Ileostomia	IC	F, E	
67	M	62	DC	Br	3	B	M	Não	IC	IN	
68	M	31	DC	Br	5	B	M	Não	IL	F, E	
69	M	53	RCU	P	9	B	M	Não	PA	ND	
70	M	35	DC	Br	1	B	L	Não	IC	E	
71	M	63	DC	P	0	MB	N	Ileocolectomia	IC	E	
72	M	31	RCU	Br	9	R	N	Não	PA	ND	
73	F	28	DC	Br	1	B	N	Não	IC	F, E	
74	F	51	DC	P	1	MB	N	Ooforectomia unilateral ou bilateral	IC	IN	
75	M	41	DC	P	2	B	N	Anastomose ileocecal	IL	F	
76	F	22	DC	P	5	B	M	Não	IC	ND	
77	F	27	DC	Br	4	B	N	Não	IC	F	pele ressecada, lesões e manchas, queda de cabelo
78	F	26	DC	Br	2	B	N	Não	IC	ND	
79	F	19	RCU	Br	0	MB	N	Não	PA	ND	
80	F	52	DC	Br	2	B	N	Não	CO	F	
81	F	46	DC	Br	0	B	L	Fistulotomia	IL	F, E	
82	M	32	DC	Br	10	B	M	Não	IL	IN, E	03 - 04 evacuações líquidas/dia
83	F	61	DC	Br	3	B	N	Não	IL	IN	01 - 02 evacuações líquidas/dia

Continuação quadro 4

Id.	Sexo	Idade (anos)	DII	Cor	Índice*	Bem estar	Dor abdominal	Processos cirúrgicos	Localização	Fenotipo	Queixas / Reações Adversas (medicamentos)
84	F	52	DC	Br	5	B	M	Não	IC	IN, F	
85	M	66	DC	Br	2	B	N	Não	IC	E	
86	F	21	RCU	Br	4	MB	L	Não	PA	ND	
87	F	54	RCU	Br	9	B	N	Ileocelectomia	PA	IN	05 - 06 evacuações líquidas/dia
88	F	43	DC	Pr	5	R	N	Não	IC	IN, E	
89	M	36	DC	Br	7	B	S	Não	IL	IN	
90	M	28	DC	Br	0	MB	N	Apendicectomia	IC	ND	
91	M	45	DC	Br	1	B	N	Não	CO	IN	
92	M	28	DC	Br	4	B	N	Não	IC	IN	
93	F	56	DC	Br	3	B	L	Não	IC	IN	
94	F	38	RCU	Br	7	B	M	Proctosigmoidite miomatose	PA	IN	
95	F	59	DC	Br	2	B	N	Não	IC	F, E	
96	F	63	DC	Br	0	B	L	Não	CO	IN	
97	F	57	DC	P	1	B	M	Não	IC	IN	
98	F	62	DC	P	3	B	L	Não	CO	F, E	
99	F	56	DC	Br	8	B	N	Não	IL	F	05 - 06 evacuações líquidas/dia
100	F	35	DC	Br	8	B	N	Não	IL	F, E	03 - 04 evacuações líquidas/dia
101	F	60	RCU	Br	1	B	N	Não	PA	ND	
102	F	56	DC	Br	1	MB	N	Não	CO	IN, F	
103	F	49	DC	Br	8	MB	L	Não	CO	IN, E	
104	F	60	DC	Pr	7	B	L	Apendicectomia	IC	E	
105	F	56	DC	Br	7	R	L	Não	IL	E	
106	F	49	DC	Br	14	R	S	Não	IC	E	07 - 08 evacuações líquidas/dia
107	F	66	RCU	Br	2	B	L	Não	PA	ND	náuseas, vômitos e perda de apetite
108	F	23	DC	Br	1	B	N	Não	IC	E	
109	M	33	RCU	Br	5	MB	N	Não	PA	ND	
110	F	38	DC	Br	4	B	N	Não	CO	F, E	

Continuação quadro 4

Id.	Sexo	Idade (anos)	DII	Cor	Índice*	Bem estar	Dor abdominal	Processos cirúrgicos	Localização	Fenotipo	Queixas / Reações Adversas (medicamentos)
111	F	26	RCU	P	4	R	M	Não	PA	IN	anemia
112	M	51	DC	Br	10	B	M	Ileocolectomia	IC	F, E	05 - 06 evacuações líquidas/dia
113	M	42	DC	Br	15	B	L	Não	CO	F	
114	F	40	DC	P	6	R	S	Não	IL	F	
115	F	52	DC	P	3	MB	M	Não	IL	IN	
116	F	27	DC	Br	2	B	N	Não	IC	ND	
117	M	46	DC	Br	10	R	S	Não	IL	IN, E	
118	F	34	DC	Br	1	B	N	Enterectomia	IL	IN, E	
119	M	39	DC	P	1	B	N	Não	IL	IN, E	pele ressecada, lesões e manchas, queda de cabelo
120	F	55	RCU	Br	13	B	M	Não	PA	ND	pele ressecada, lesões e manchas, queda de cabelo
121	M	26	DC	Br	1	B	N	Apendicectomia	IC	IN	pele ressecada, lesões e manchas, queda de cabelo
122	M	58	RCU	Br	1	MB	N	Não	PA	IN	
123	F	56	RCU	Br	5	MB	M	Não	PA	IN	
124	M	53	DC	Br	1	MB	N	Ileotiplectomia	IC	IN	
125	F	60	DC	Pr	2	B	N	Não	IL	ND	Prisão de ventre ou fezes ressecadas
126	F	50	DC	Br	3	B	M	Não	IL	IN, E	
127	F	51	DC	Br	1	B	N	Não	IC	IN	
128	F	44	DC	Br	2	B	N	Não	IC	IN	
129	M	18	DC	Br	0	MB	N	Não	IL	IN, E	
130	F	38	DC	Pr	2	B	N	Ileocolectomia	IC	IN, E	01 - 02 evacuações líquidas/dia
131	M	57	DC	Br	3	B	N	Fistulotomia	IC	F	
132	F	44	RCU	Br	4	B	N	Não	PA	ND	
133	F	43	DC	Br	4	B	N	Não	CO	F, E	
134	F	45	DC	Pr	4	B	M	Não	CO	E	
135	F	51	DC	P	3	B	N	Não	IC	E	
136	F	56	DC	Br	10	B	S	Ileocolectomia	IC	IN, E	
137	F	41	DC	P	2	B	L	Colectomia	IL	E	
138	F	25	DC	Br	1	B	N	Não	IL	IN	
139	M	20	DC	Br	4	MB	N	Não	IL	E	

Continuação quadro 4

Id.	Sexo	Idade (anos)	DII	Cor	Índice*	Bem estar	Dor abdominal	Processos cirúrgicos	Localização	Fenotipo	Queixas / Reações Adversas (medicamentos)
140	M	62	DC	Br	1	B	N	Não	IL	IN	
141	F	54	DC	Br	4	R	L	Não	IL	E	náuseas, vômitos e perda de apetite
142	M	57	DC	Br	4	MB	N	Fistulotomia	IC	F	03 - 04 evacuações líquidas/dia
143	M	45	DC	Br	2	B	N	Nefrolithiase	IL	IN	
144	F	51	DC	Br	8	B	N	Não	IC	IN	prisão de ventre ou fezes ressecadas
145	F	39	RCU	Br	10	B	M	Não	PA	ND	
146	M	31	DC	Br	5	B	M	Não	IL	F, E	
147	M	40	DC	Br	1	MB	N	Não	IC	F, E	
148	M	32	DC	Pr	2	MB	N	Não	IC	E	01 - 02 evacuações líquidas/dia
149	M	24	DC	Br	2	MB	N	Não	IL	F	
150	F	64	DC	Br	1	B	N	Não	CO	IN, F	

Nota: Id.: Identificação dos pacientes; Índice*: conforme os índice de *Harvey-Bradshaw* e *Truelove and Witts*; DII: doença inflamatória intestinal; DC: Doença de Crohn; RCU: retocolite ulcerativa; F: feminino; M: masculino; Br: branco; Pr: preto; P: parda; MB: muito bem; B: bem; R: ruim; MR: muito ruim; PE: péssimo; N: nenhuma dor; L: dor leve; M: dor moderada; S: dor severa; IC: ileocolite; IL: ileíte; CO: colite; PC: pancolite; I: inflamatória; E: estenosante; F: fistulizante.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

APÊNDICE C

QUADRO 5 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E DOS METABÓLITOS DA AZA DOS PACIENTES

Id.	Sexo	6-TGN	6-MMP	AST/TGO	ALT/TGP *	PCR *	Leucometria	Neutrófilos *	Linfócitos *	Hemácias *	Hemoglobina *	Hematócrito *
		* 1	* 1	* 2	2	3	Global * 4	4	4	5	6	7
1	M	495,55	132,30	28	21	26,3	6430	3170	2058	6,4	18,6	57,8
2	F	1520,19	679,66	22	22	4,0	4566	2941	1201	4,2	13,5	40,2
3	F	2455,75	476,74	20	14	6,0	2940	1808	953	2,9	10,6	27,4
4	F	38,90	1210,81	14	7	1,0	4920	3287	954	4,0	13,2	39,9
5	M	503,43	753,59	14	15	2,0	5597	2972	1959	5,0	13,9	42,3
6	F	24,70	2249,69	19	15	20,0	10400	6812	2600	4,4	13,0	38,4
7	F	340,66	362,34	106	67	5,0	5708	3128	1438	3,9	12,4	35,3
8	F	13,70	1090,93	11	26	2,0	13600	7208	4447	4,7	14,4	39,0
9	F	133,14	1067,08	29	30	4,8	7240	4286	2085	5,3	15,7	47,8
10	F	154,25	211,98	25	33	2,4	4811	2151	2151	4,0	12,4	36,9
11	M	109,46	476,74	40	21	7,0	5530	3998	946	3,8	7,1	24,6
12	M	43,69	226,13	23	14	1,1	6890	3052	2412	5,1	11,2	37,4
13	M	139,40	1220,10	25	32	4,0	5760	3444	1619	5,4	16,0	47,3
14	F	127,33	1088,40	67	115	2,0	9070	5587	2794	5,2	12,5	40,4
15	F	26,25	1341,35	19	13	5,0	2840	1145	1335	6,5	21,5	62,8
16	M	219,56	406,07	20	14	2,0	5170	2202	1722	5,1	14,4	44,3
17	F	157,94	1025,26	16	10	4,7	6000	4080	1506	3,9	12,4	36,6
18	M	110,17	794,56	20	22	2,0	5550	3352	1560	5,7	15,5	46,7
19	F	1542,76	241,84	37	32	0,0	6366	3215	2355	4,1	14,5	39,6
20	M	157,93	1002,06	15	20	2,0	7000	3073	2702	3,8	13,6	39,7
21	F	169,03	142,80	38	34	0,0	4500	1877	2115	4,3	14,0	41,7
22	F	161,79	2985,53	18	15	8,0	4830	2903	1449	4,5	13,7	40,0
23	F	30,07	3309,39	16	23	7,2	14750	9883	3983	4,1	13,5	38,9
24	F	49,03	213,29	13	13	5,0	6666	4373	1873	6,7	12,7	38,0
25	M	20,32	300,11	30	30	0,4	6900	3588	2622	5,2	15,6	46,3
26	F	470,62	2232,61	16	17	16,8	7390	4419	2269	4,1	13,2	39,5
27	M	522,65	2028,57	23	22	0,4	6280	3228	2317	5,3	16,6	447,5
28	M	215,82	340,51	24	22	6,0	8290	4427	2926	5,5	16,0	48,3
29	M	249,21	206,88	23	21	3,0	7600	5753	1216	5,1	11,2	36,9
30	M	18,59	119,75	33	22	1,4	5630	3040	1762	5,4	16,1	51,1
31	F	119,01	797,25	14	11	8,0	8980	4652	3296	4,8	12,3	38,1

Continuação quadro 5

Id.	Sexo	6-TGN * 1	6-MMP * 1	AST/TGO * 2	ALT/TGP * 2	PCR * 3	Leucometria Global * 4	Neutrófilos * 4	Linfócitos * 4	Hemácias * 5	Hemoglobina * 6	Hematócrito * 7
32	F	562,69	23992,88	27	24	6,0	5860	4067	1471	4,5	13,4	40,7
33	F	30,38	27766,38	18	17	37,0	6410	4833	1135	4,5	13,6	41,8
34	F	265,39	310,74	34	25	1,0	6030	2490	2551	4,1	12,3	38,1
35	F	564,97	623,45	14	14	2,7	5228	3283	1412	4,4	14,3	42,2
36	F	923,86	86,07	20	10	0,3	4149	2149	1481	3,7	12,3	36,1
37	F	123,59	2906,59	12	18	6,9	6220	3888	1679	4,8	14,6	43,5
38	F	484,20	1546,27	15	13	1,0	5300	3275	1431	4,5	13,2	38,3
39	F	342,61	799,55	19	16	2,0	4477	3062	985	4,4	13,9	39,8
40	F	139,96	1006,54	22	17	4,0	4950	2906	1381	3,6	11,5	35,5
41	F	21,41	597,78	14	11	3,3	3090	1873	890	4,4	12,8	39,8
42	F	17,39	1078,85	29	14	7,0	8290	6093	1716	4,1	12,4	38,2
43	F	133,17	964,64	13	21	0,2	5600	3506	1568	4,5	13,9	42,2
44	M	143,35	1026,59	13	21	17,0	4500	2480	1530	3,2	10,5	31,8
45	F	759,03	962,69	11	5	0,3	4159	2562	915	4,0	12,3	36,7
46	M	48,81	11267,69	15	32	3,6	11500	10730	426	4,8	15,9	44,5
47	M	129,49	1060,93	25	17	3,0	7400	4218	1850	5,4	15,6	46,3
48	M	935,39	1294,93	28	23	0,4	6855	3256	2982	5,3	16,1	46,3
49	F	144,03	1451,73	38	21	2,0	5256	3101	4110	4,0	12,3	36,3
50	M	516,23	1052,75	25	19	9,0	7510	5332	1502	4,9	14,0	41,1
51	F	307,51	859,54	17	15	0,0	7200	4637	1930	4,3	12,5	37,3
52	M	332,34	1791,59	21	18	4,0	5390	2959	1773	5,1	13,2	42,1
53	M	95,24	471,57	62	44	2,0	7010	5748	1199	6,3	17,2	50,7
54	F	89,58	797,87	24	14	3,4	5230	2850	1726	4,5	13,9	41,9
55	F	426,81	744,14	25	18	0,0	8580	4702	2033	4,8	14,9	45,8
56	F	372,96	277,80	18	10	2,0	5300	2592	2041	4,8	14,4	41,9
57	M	325,97	1111,58	21	20	0,0	5580	1841	2857	4,9	14,7	44,0
58	M	130,08	818,54	12	8	3,0	8880	5266	2309	5,6	15,5	47,8
59	F	26,62	6099,22	26	38	0,3	6190	3689	1609	4,5	12,8	37,7
60	M	139,27	1327,56	21	9	2,0	6070	3606	1906	4,7	14,6	43,3
61	M	57,11	519,21	13	11	1,0	6810	3657	2574	4,4	14,5	41,9
62	M	152,34	1015,48	18	23	1,0	7060	4137	2160	4,2	12,4	38,0
63	M	136,81	891,33	23	22	3,0	5780	3630	1329	4,6	14,3	43,2
64	M	138,95	849,35	33	29	6,0	8630	6473	1528	6,4	18,2	56,4

Continuação quadro 5

Id.	Sexo	6-TGN * 1	6-MMP * 1	AST/TGO * 2	ALT/TGP * 2	PCR * 3	Leucometria Global * 4	Neutrófilos * 4	Linfócitos * 4	Hemácias * 5	Hemoglobina * 6	Hematócrito * 7
65	M	119,56	97800,17	19	32	5,0	6950	4121	1911	4,9	15,4	47,6
66	M	56,29	400,64	19	18	5,0	7360	5770	598	4,5	13,7	40,6
67	M	653,19	987,27	17	13	11,0	5890	3428	1313	4,3	14,8	43,7
68	M	454,71	4248,25	29	24	4,0	8680	5095	2161	5,5	14,6	46,9
69	M	117,60	1181,54	23	21	5,0	11500	8326	2346	6,7	16,8	52,6
70	M	554,49	1312,52	20	14	2,0	7897	6862	673	5,6	17,0	51,5
71	M	203,01	1926,86	31	30	0,0	6790	3599	2533	5,2	15,7	48,4
72	M	126,63	852,81	13	9	13,0	8360	6404	1095	5,1	13,5	44,1
73	F	242,07	19700,56	15	16	5,0	4754	2387	1426	3,9	12,4	37,0
74	F	195,10	344,01	87	62	16,0	8630	6921	1036	4,8	11,2	36,8
75	M	356,55	3682,34	25	21	1,0	4620	3123	836	4,7	14,1	41,5
76	F	125,00	1827,83	14	10	-	5380	2921	1679	4,8	13,9	42,1
77	F	529,86	40298,64	16	10	7,0	7390	5424	1552	4,0	13,5	39,3
78	F	194,62	1192,90	22	19	1,3	7460	4685	2066	4,5	14,6	43,7
79	F	161,05	264,84	5	12	0,0	6340	4375	1401	4,8	14,2	42,6
80	F	447,30	923,77	12	28	6,0	5200	3432	1144	-	12,0	40,0
81	F	369,91	1421,70	18	21	4,0	8030	5846	1718	4,1	13,1	38,9
82	M	20,39	49,19	25	15	1,0	8720	4465	3113	5,4	15,3	46,3
83	F	4,51	184,37	31	29	31,3	4356	3036	741	4,5	12,5	39,5
84	F	291,25	4374,87	42	33	4,3	7120	3859	2449	4,7	13,5	43,3
85	M	116,17	813,86	39	23	1,0	7470	5162	1614	4,6	13,4	42,3
86	F	44,66	9794,08	18	12	1,0	5110	2652	1926	4,6	14,1	42,7
87	F	126,70	5923,53	28	18	4,0	5860	3317	1729	4,8	13,5	41,6
88	F	131,86	863,80	22	15	3,8	3300	1518	924	4,6	12,9	37,6
89	M	142,95	932,56	76	130	1,0	5140	3295	1357	5,1	14,8	43,4
90	M	284,52	383,17	22	20	1,0	10400	6968	2392	5,7	16,5	51,4
91	M	37,69	1624,73	17	19	6,0	5560	3080	1829	5,1	17,3	49,2
92	M	18,36	25,75	30	19	2,4	7200	5350	886	5,7	15,9	50,6
93	F	121,68	799,58	21	18	12,0	10700	5864	3841	4,7	14,8	44,1
94	F	142,28	962,69	16	14	0,0	5640	3401	1658	4,4	13,9	41,1
95	F	148,22	1249,01	23	12	0,2	5860	3299	2121	3,6	12,8	36,5
96	F	329,16	7287,45	26	50	11,2	5720	4021	1195	3,2	10,1	29,9
97	F	901,93	28511,86	40	15	0,7	4603	3066	1003	3,7	12,4	36,5

Continuação quadro 5

Id.	Sexo	6-TGN * 1	6-MMP * 1	AST/TGO * 2	ALT/TGP * 2	PCR * 3	Leucometria Global * 4	Neutrófilos * 4	Linfócitos * 4	Hemácias * 5	Hemoglobina * 6	Hematócrito * 7
98	F	330,88	1318,83	30	24	6,9	8430	5050	2234	4,8	13,2	41,4
99	F	369,23	11751,30	21	24	5,0	6230	3813	1701	3,8	12,2	36,0
100	F	23,01	364,59	17	10	110,0	5130	4007	703	5,4	13,4	43,5
101	F	489,49	5927,44	33	32	5,0	5194	3366	1195	4,7	12,7	40,5
102	F	212,06	175,10	25	22	11,0	6345	3788	1840	4,7	12,8	40,9
103	F	126,99	1294,99	18	13	5,0	6440	3961	2009	4,6	14,4	42,8
104	F	123,75	802,52	25	16	4,0	8230	4601	2782	5,2	14,1	42,8
105	F	563,67	620,31	14	12	52,0	6983	4721	1466	3,9	12,8	36,8
106	F	16,96	549,76	24	20	1,0	6810	2847	3153	6,0	17,5	52,5
107	F	128,23	1052,75	16	18	10,0	5469	3445	1914	4,4	13,6	41,2
108	F	144,93	859,54	17	23	6,0	7120	4621	2079	4,2	11,3	37,2
109	M	136,00	1791,59	22	32	12,0	12800	10074	1421	4,1	11,2	34,7
110	F	139,91	708,28	14	11	29,9	4470	1810	2056	3,6	12,0	36,3
111	F	118,87	797,87	19	15	1,0	4780	2581	1415	3,7	10,0	30,9
112	M	40,86	324,82	23	44	1,0	9220	6131	1936	5,6	16,2	50,9
113	M	112,94	744,14	10	8	1,0	9810	7181	1403	5,6	15,8	46,6
114	F	134,80	1111,58	22	14	1,0	7270	4238	1970	7,6	14,3	40,5
115	F	55,67	5089,52	18	10	6,0	4720	3139	991	4,0	13,1	38,8
116	F	407,18	1219,60	-	-	-	4450	3355	645	4,5	12,6	39,0
117	M	23,16	726,82	24	38	1,5	11800	9346	1558	5,0	14,5	43,6
118	F	47,83	2560,74	15	16	0,1	5250	3470	1113	4,5	14,8	42,1
119	M	1515,27	1156,17	27	14	0,7	6520	4916	1004	3,9	13,5	40,6
120	F	41,79	593,10	30	29	2,6	8290	4153	2537	4,5	14,6	43,0
121	M	234,80	9801,97	21	12	4,0	4517	3094	723	4,6	15,3	41,5
122	M	24,17	777,04	20	17	0,9	7050	1029	1093	5,3	15,6	43,7
123	F	18,21	36,80	-	-	-	7270	3322	2581	6,1	18,3	54,2
124	M	281,40	121,34	21	21	1,0	7540	5451	1199	5,2	15,3	45,8
125	F	453,05	229,16	13	11	15,8	10000	7500	1980	4,7	13,8	40,7
126	F	870,61	5885,77	21	39	1,0	5570	3843	1092	3,9	12,0	37,0
127	F	593,77	3929,22	38	21	2,0	5600	3522	1450	5,3	12,0	40,4
128	F	213,66	1048,51	15	15	21,0	5718	4128	1430	4,0	12,4	37,8
129	M	126,99	909,47	22	13	0,0	4880	2679	1498	5,3	15,0	46,3
130	F	1205,55	18405,26	79	119	32,0	8650	5242	1903	4,5	14,3	42,0
131	M	1094,96	573,03	35	24	1,2	5926	4385	474	4,0	14,2	40,1

Continuação quadro 5

Id.	Sexo	6-TGN *1	6-MMP *1	AST/TGO *2	ALT/TGP *2	PCR *3	Leucometria Global *4	Neutrófilos *4	Linfócitos *4	Hemácias *5	Hemoglobina *6	Hematócrito *7
132	F	136,19	1733,22	16	6	0,5	5460	3647	1332	4,5	13,4	41,1
133	F	129,83	957,10	31	26	6,0	6880	3867	2518	4,7	13,5	41,2
134	F	128,53	837,87	21	15	6,0	6300	2734	2407	4,7	13,3	40,7
135	F	116,95	1475,58	15	20	5,0	11700	8202	2703	4,3	13,0	36,8
136	F	139,70	983,27	16	18	6,0	10700	7030	3071	4,6	13,2	42,5
137	F	374,08	215,38	18	10	0,0	9850	6875	2374	4,5	14,4	43,3
138	F	139,08	4248,25	16	11	3,0	4610	2734	1448	4,6	13,9	41,6
139	M	21,50	285,71	16	12	0,4	10600	4092	4759	5,3	15,7	48,5
140	M	244,91	39808,38	22	18	0,5	4460	1829	1664	4,8	14,6	45,8
141	F	475,49	1655,91	18	16	5,0	11200	7347	2654	5,1	14,8	45,7
142	M	666,68	1167,46	20	16	2,0	9150	5334	2708	4,8	16,0	44,7
143	M	131,36	1827,07	19	32	3,0	6590	3124	2517	5,6	16,0	48,4
144	F	126,63	1312,52	21	21	8,0	4830	2801	1468	4,4	13,4	39,6
145	F	47,26	3367,53	33	16	1,7	5560	2913	1879	4,5	13,3	41,5
146	M	32,67	1114,67	27	18	0,6	5430	2503	2167	5,3	15,7	47,3
147	M	47,07	1819,88	19	15	0,5	8910	5186	2121	5,3	14,6	44,1
148	M	13,51	75,70	17	12	3,0	7203	3962	2334	6,4	18,8	58,2
149	M	136,01	1926,86	33	1	10,0	5410	2754	1969	4,8	13,8	41,6
150	F	598,49	4064,98	19	26	0,2	4960	3026	1384	4,5	14,7	43,1

Nota: (-): dados não obtidos; F: feminino; M: masculino; 6-TGN: 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; AST/TGO: transaminase glutâmico-oxalacética/transaminases aspartato aminotransferase; TGP/ALT: transaminase glutâmico-pirúvica/alanina aminotransferase; PCR: proteína C reativa; resultados expressos em: *1 pmol/8x10⁸RBC; *2 U/L; *3 mg/dL; *4 mm³ ou µL; *5 milhões/mm³; *6 g/dL; *7 %.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

APÊNDICE D

QUADRO 6 - CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E FARMACOLÓGICAS DOS PACIENTES COM DII

Id.	6-TGN *1	6-MMP*1	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
1	495,55	132,30	*1/*1	AG	AA	CC	AA	AA	GG	TT	AG	GG	TT	1,2		Sim
2	1520,19	679,66	*1/*2	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	0,9		Sim
3	2455,75	476,74	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AT	GG	TT	AG	GG	TT	1,0	Sim	
4	38,90	1210,81	*1/*1	GG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AA	TT	2,4		
5	503,43	753,59	*1/*1	GG	AG	AC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,3		
6	24,70	2249,69	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AA	GG	TT	1,9		Sim
7	340,66	362,34	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,6	Sim	
8	13,70	1090,93	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,0		
9	133,14	1067,08	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	0,8		Sim
10	154,25	211,98	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	0,4		
11	109,46	476,74	*1/*1	GG	AA	CC	AA	TT	GG	TT	AA	GG	TT	1,4		
12	43,69	226,13	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AA	GG	TT	2,4		
13	139,40	1220,10	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,0		
14	127,33	1088,40	*1/*3C	AG	AG	CC	AC	AA	GG	TT	GG	AG	TT	2,9		Sim
15	26,25	1341,35	*1/*3A	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,5		Sim
16	219,56	406,07	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,7		
17	157,94	1025,26	*1/*3C	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AA	GG	TT	1,8		
18	110,17	794,56	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	0,8		
19	1542,76	241,84	*1/*3A	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,2		
20	157,93	1002,06	*1/*2	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AA	TT	0,5		Sim
21	169,03	142,80	*1/*3C	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	0,3	Sim	Sim
22	161,79	2985,53	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AG	TT	2,7		

Continuação quadro 6

Id.	6-TGN ^{*1}	6-MMP^{*1}	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
23	30,07	3309,39	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	AG	TT	GG	GG	TT	2,2		
24	49,03	213,29	*1/*1	GG	AG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	0,4	Sim	
25	20,32	300,11	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	1,0		Sim
26	470,62	2232,61	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	2,6		
27	522,65	2028,57	*1/*1	GG	GG	CC	CC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,1		
28	215,82	340,51	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	0,5		
29	249,21	206,88	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	CT	2,3		Sim
30	18,59	119,75	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,1		Sim
31	119,01	797,25	*1/*1	GG	AG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	0,9		Sim
32	562,69	23992,88	*1/*1	AG	AG	AC	AA	TT	GG	CT	AG	AG	CT	2,7		
33	30,38	27766,38	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,3		
34	265,39	310,74	*1/*1	AG	GG	CC	AC	AT	GG	TT	GG	GG	TT	2,3		Sim
35	564,97	623,45	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,5		
36	923,86	86,07	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	AG	AG	TT	2,2		
37	123,59	2906,59	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	TT	2,6		
38	484,20	1546,27	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,8		
39	342,61	799,55	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,6		
40	139,96	1006,54	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AT	GG	TT	AG	GG	TT	2,1		
41	21,41	597,78	*1/*1	AG	AA	CC	AA	AT	GG	TT	AG	AG	TT	1,7		
42	17,39	1078,85	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	TT	1,4		Sim
43	133,17	964,64	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,3		
44	143,35	1026,59	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	0,7	Sim	Sim
45	759,03	962,69	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	2,3		

Continuação quadro 6

Id.	6-TGN ^{*1}	6-MMP^{*1}	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
46	48,81	11267,69	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	CT	AG	GG	CT	2,5		
47	129,49	1060,93	*1/*1	AG	AG	CC	AC	AA	GG	TT	GG	GG	TT	1,3		
48	935,39	1294,93	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	1,3		
49	144,03	1451,73	*1/*1	AG	AA	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	CT	3,1		
50	516,23	1052,75	*1/*1	AG	GG	CC	AA	TT	GG	CT	AG	AG	CT	2,2		
51	307,51	859,54	*1/*1	AG	AA	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,4		Sim
52	332,34	1791,59	*1/*1	GG	GG	CC	CC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,0		
53	95,24	471,57	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,2		
54	89,58	797,87	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AG	TT	1,6		
55	426,81	744,14	*1/*1	AG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,7		
56	372,96	277,80	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,1		
57	325,97	1111,58	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	2,4		
58	130,08	818,54	*1/*3A	AG	AG	CC	AC	TT	GG	CT	AG	GG	CT	0,7		
59	26,62	6099,22	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,0		
60	139,27	1327,56	*1/*1	GG	GG	CC	CC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,1		
61	57,11	519,21	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,4		Sim
62	152,34	1015,48	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,0		
63	136,81	891,33	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	1,8		
64	138,95	849,35	*1/*1	GG	GG	CC	CC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	0,4	Sim	
65	119,56	97800,17	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,9		
66	56,29	400,64	*1/*3C	GG	AA	CC	AA	TT	AG	CT	AG	GG	CT	1,2		Sim
67	653,19	987,27	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AA	TT	3,1		
68	454,71	4248,25	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,7		Sim

Continuação quadro 6

Id.	6-TGN ^{*1}	6-MMP^{*1}	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
69	117,60	1181,54	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	AG	TT	GG	GG	TT	2,5		
70	554,49	1312,52	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,9		
71	203,01	1926,86	*1/*1	AG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AA	TT	2,4		
72	126,63	852,81	*1/*2	GG	GG	CC	AA	AA	GG	TT	GG	GG	TT	1,6		
73	242,07	19700,56	*1/*1	AG	AA	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,1		
74	195,10	344,01	*1/*1	AA	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	TT	2,5		
75	356,55	3682,34	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	CT	AG	GG	CT	1,3		
76	125,00	1827,83	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	2,1		
77	529,86	40298,64	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	1,6		
78	194,62	1192,90	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	1,5		Sim
79	161,05	264,84	*1/*1	GG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	AG	GG	TT	1,2		
80	447,30	923,77	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,0		
81	369,91	1421,70	*1/*1	AG	AG	AC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,0		
82	20,39	49,19	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AA	GG	TT	GG	GG	TT	0,8	Sim	
83	4,51	184,37	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AA	TT	0,4	Sim	
84	291,25	4374,87	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	AG	GG	CT	2,1		
85	116,17	813,86	*1/*1	GG	AG	CC	AC	AA	GG	TT	GG	GG	TT	0,7		Sim
86	44,66	9794,08	*1/*1	AG	AG	AC	AC	TT	GG	CT	AG	GG	CT	2,5		
87	126,70	5923,53	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,4		
88	131,86	863,80	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	TT	2,8		
89	142,95	932,56	*1/*2	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,7		Sim
90	284,52	383,17	*1/*1	AA	AA	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AA	TT	0,9		Sim
91	37,69	1624,73	*1/*1	AG	AG	CC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,2		

Continuação quadro 6

Id.	6-TGN ^{*1}	6-MMP^{*1}	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
92	18,36	25,75	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,9		Sim
93	121,68	799,58	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,6		Sim
94	142,28	962,69	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,0		
95	148,22	1249,01	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,6		
96	329,16	7287,45	*1/*1	GG	AG	CC	AC	TT	GG	CT	AG	GG	TT	2,3		
97	901,93	28511,86	*1/*1	AG	AG	CC	AC	AT	GG	TT	AG	AG	TT	2,4		
98	330,88	1318,83	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,5		
99	369,23	11751,30	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AG	TT	2,3		
100	23,01	364,59	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,5		Sim
101	489,49	5927,44	*1/*1	GG	AG	CC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,6		
102	212,06	175,10	*1/*1	AG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,5		Sim
103	126,99	1294,99	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,5		Sim
104	123,75	802,52	*1/*1	GG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	CT	0,8	Sim	Sim
105	563,67	620,31	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AA	TT	2,1		
106	16,96	549,76	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AG	TT	1,0		Sim
107	128,23	1052,75	*1/*1	GG	GG	CC	AC	AT	GG	TT	GG	AA	TT	0,7		
108	144,93	859,54	*1/*1	GG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AG	TT	0,9	Sim	
109	136,00	1791,59	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,4		
110	139,91	708,28	*1/*1	AG	AA	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,7		Sim
111	118,87	797,87	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	1,8		
112	40,86	324,82	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,6		Sim
113	112,94	744,14	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,4		Sim
114	134,80	1111,58	*1/*1	AG	AG	CC	AC	AT	GG	TT	GG	AG	CT	0,7		

Continuação quadro 6

Id.	6-TGN ^{*1}	6-MMP^{*1}	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
115	55,67	5089,52	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,1		
116	407,18	1219,60	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,5		
117	23,16	726,82	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,3		
118	47,83	2560,74	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,1		Sim
119	1515,27	1156,17	*1/*3A	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AA	TT	2,3		
120	41,79	593,10	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,3		
121	234,80	9801,97	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	AG	TT	GG	AG	TT	2,6	Sim	
122	24,17	777,04	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	GG	TT	2,2		
123	18,21	36,80	*1/*1	AG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	-		
124	281,40	121,34	*1/*1	GG	GG	CC	AA	AA	GG	TT	GG	AG	TT	1,9		
125	453,05	229,16	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AA	TT	1,9		
126	870,61	5885,77	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,4		
127	593,77	3929,22	*1/*1	AA	AA	AC	AA	TT	GG	CT	AG	GG	CT	1,9		
128	213,66	1048,51	*1/*1	AG	AG	AC	AA	AT	GG	TT	AG	GG	TT	1,3	Sim	
129	126,99	909,47	*1/*1	GG	AG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AA	TT	0,9		Sim
130	1205,55	18405,26	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	TT	2,4		
131	1094,96	573,03	*1/*3C	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,2		
132	136,19	1733,22	*1/*1	GG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	AG	TT	2,7		
133	129,83	957,10	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,1		Sim
134	128,53	837,87	*1/*1	AG	AA	CC	AA	AT	GG	TT	AA	GG	TT	2,1		Sim
135	116,95	1475,58	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	0,7		Sim
136	139,70	983,27	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	0,9	Sim	Sim
137	374,08	215,38	*1/*1	GG	AG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,3		

Continuação quadro 6

Id.	6-TGN ^{*1}	6-MMP ^{*1}	TPMT (rs1800462 / rs1800460 / rs 1142345)	ITPA (rs9101)	ITPA (rs8362)	ITPA (rs1127354)	ITPA (rs7270101)	HPRT (rs1468266)	XO/XDH (rs4407290)	XO/XDH (rs17323225)	XO/XDH (rs1884725)	XO/XDH (rs2295475)	XO/XDH (rs17011368)	AZA (mg/Kg)	Alopurinol (100mg)	Biológicos
138	139,08	4248,25	*1/*1	AG	AG	CC	AA	AT	GG	TT	GG	GG	TT	2,2		
139	21,50	285,71	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	AG	AG	TT	1,9		
140	244,91	39808,38	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,3		
141	475,49	1655,91	*1/*1	AG	AG	AC	AA	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,7		
142	666,68	1167,46	*1/*1	GG	GG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AA	TT	1,6		Sim
143	131,36	1827,07	*1/*1	AG	AG	CC	AC	AA	GG	TT	GG	GG	TT	1,1		
144	126,63	1312,52	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	2,4		
145	47,26	3367,53	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,9		
146	32,67	1114,67	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	1,3		Sim
147	47,07	1819,88	*1/*1	GG	AG	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	1,2		Sim
148	13,51	75,70	*1/*1	GG	AA	CC	AA	TT	GG	TT	GG	AG	TT	2,0		Sim
149	136,01	1926,86	*1/*1	GG	GG	CC	AC	TT	GG	TT	GG	GG	TT	0,9		
150	598,49	4064,98	*1/*1	AG	AG	AC	AC	TT	GG	TT	AG	GG	TT	1,5		

Nota: (-): dados não obtidos; 6-TGN: 6-tioguanina; 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; TPMT: tiopurina metil transferase; ITPA: inosina trifosfatase; HPRT: hipoxantina fosforribosil transferase; XO/XDH: xantida oxidase ou xantina desidrogenase; AZA: azatioprina; ^{*1} resultados expressos em pmol/8x10⁸RBC.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

APÊNDICE E

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DO ALELO DE MENOR FREQUÊNCIAS (MAF) PARA POLIMORFISMOS NO GENE DE QUATRO ENZIMAS RELACIONADAS À METABOLIZAÇÃO DA AZATIOPRINA.

Gene	SNP	População				
		Brasileira ¹	Europeia ²	Africana ²	Asiática ²	Americana ²
TPMT	rs1800462 (*2)	0,009	0,006	0,001	0,000	0,006
	rs1800460 (*3A)	0,010	0,028	0,003	0,000	0,040
	rs1142345 (*3C)	0,026	0,029	0,066	0,022	0,058
ITPA	rs 9101	nd	0,309	0,083	0,509	0,278
	rs 8362	nd	0,302	0,471	0,613	0,305
	rs 1127354	nd	0,071	0,045	0,169	0,042
	rs 7270101	nd	0,129	0,071	0,000	0,082
HPRT	rs 1468266	nd	0,132	0,326	0,001	0,097
XO/XDH	rs 4407290	nd	0,049	0,012	0,052	0,026
	rs 17323225	nd	0,047	0,005	0,004	0,016
	rs 1884725	nd	0,209	0,234	0,152	0,244
	rs 2295475	nd	0,303	0,070	0,334	0,366
	rs 17011368	nd	0,048	0,120	0,004	0,032

¹Disponível no banco de dados da Rede Nacional de Farmacogenética (em: <https://www.refargen.org.br>)

²Disponível no 1000Genomes database (em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), Nd: não disponível.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

Pesquisador Responsável: Professor Jorge Willian L. Nascimento
Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n – Bairro Martelos, Juiz de Fora - MG, Departamento de Farmacologia -
Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental
Universidade Federal de Juiz de Fora CEP: 36036-330
Fone: (32) 2102-3369 E-mail: jorge.willian@ufff.edu.br
99161-9120 alinecorrearibeiro@yahoo.com.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Avaliação da associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa”**. Neste estudo, vamos avaliar a associação entre polimorfismos enzimáticos relacionados com os efeitos benéficos (terapêuticos) e eventos adversos do uso do medicamento azatioprina e da azatioprina junto com o alopurinol nos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal.

O motivo para a realização desse estudo é o fato de que a azatioprina é o tratamento que seu médico escolheu para tratar sua doença, porém, como outros medicamentos, ela pode levar ao aparecimento de alguns eventos adversos ou não ter o efeito esperado no tratamento de alguns pacientes. Assim, o objetivo deste estudo será avaliar se será necessária uma possível redução da dose terapêutica da azatioprina, quando estiver sendo usada junto com o medicamento alopurinol, o que poderá diminuir os eventos adversos e melhorar o efeito da azatioprina para você ou outros pacientes que também tenham Doença Inflamatória Intestinal.

Para este estudo, os pacientes que aceitarem participar, serão divididos em 3 grupos, a partir da consulta médica, avaliação dos resultados de exames laboratoriais e a aplicação de um breve questionário (índice de *Harvey-Bradshaw* ou *Tuelove and Witts*) que o Sr(a) já realizaria para avaliar e tratar sua doença. No grupo 1 estarão os pacientes com Doença Inflamatória Intestinal que já estão utilizando a azatioprina e que apresentam eventos adversos ao tratamento. No grupo 2 estarão os pacientes portadores da Doença Inflamatória Intestinal já em tratamento com azatioprina mas com falha no efeito e que não apresentam eventos adversos à terapia; e no grupo 3, pacientes em tratamento com azatioprina com sucesso terapêutico, isto é, que não apresentam eventos adversos e nem há falha no efeito deste medicamento. Você poderá ser incluído em qualquer destes grupos, de acordo com a avaliação realizada.

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em risco mínimo associado à coleta de uma quantidade pequena de sangue (uma colher de sopa - aproximadamente 10mL), da mesma forma como outros exames de sangue que você certamente já fez, com agulha e seringa estéreis e descartáveis, uma para cada participante, ou seja, sem risco de contaminação. A coleta será realizada por equipe profissional, devidamente capacitada, do Hospital HU/CAS, e ocorrerá conforme a rotina do hospital. Pode ocorrer um pequeno desconforto na hora da introdução da agulha na pele, como se fosse uma “picada de inseto”. O sangue coletado será armazenado no congelador do laboratório até ser analisado e o restante será descartado de forma adequada, em local apropriado, não sendo mais utilizado em nenhuma outra pesquisa.

Não há risco adicional em relação ao tratamento com os medicamentos. É importante que você saiba que o fato de você aceitar participar da pesquisa NÃO irá interferir no tratamento com os fármacos que você normalmente receberia (azatioprina ou azatioprina + alopurinol). Ou seja, não será testado nenhum medicamento novo e nem será modificado o seu tratamento por conta deste estudo, inclusive em caso de agravamento da doença.

A pesquisa irá contribuir para melhorar o tratamento dos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal que usam azatioprina e possibilitará o estudo das quantidades deste medicamento e de seus derivados (metabólitos) no sangue, com o objetivo de diminuir os eventos adversos.

Se você participar deste estudo, não haverá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes exclusivamente desta pesquisa, o Sr.(a) terá assegurado o direito a indenização. O Sr.(a) será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e está livre para participar ou retirar seu consentimento ou interromper a participação em qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar NÃO acarreta qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador ou pelo seu médico, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O(A) Sr(a) não será identificado(a) em nenhum texto ou publicação que possa resultar deste estudo. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e a outra será fornecida ao Sr.(a).

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo **“Avaliação da associação entre polimorfismos em genes relacionados à metabolização das tiopurinas e a resposta à azatioprina em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20__.

Nome e assinatura do (a) participante

Data

Prof. Dr. Jorge Willian L. Nascimento

Data

Farmacêutica Aline Corrêa Ribeiro

Data

Em caso de dúvidas sobre aos aspectos éticos deste estudo, você pode consultar o:
CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF
Hospital universitário Unidade Dom Bosco-sala 297; e-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEP HU/UFJF



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA-MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Terapia combinada de Azatioprina e Alopurinol em pacientes com Doença de Crohn: Eficácia Terapêutica e Efeitos nos Metabólitos da Tiopurina

Pesquisador: JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54335416.3.0000.5133

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.633.090

Apresentação do Projeto:

Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica incurável de etiologia desconhecida, que pode afetar qualquer segmento do tubo digestivo, associada a manifestações extraintestinais e imunológicas, com períodos alternados de remissão e exacerbação. Devido à importância que o sistema imune desempenha na DC, os fármacos tiopurinas continuam sendo os imunomoduladores mais indicados na terapia em conjunto com uso de glicocorticóides. Entretanto, as tiopurinas, como a Azatioprina e seus metabólitos, levam a uma série de reações adversas ou apresentam falha terapêutica em cerca de 30 a 40% dos pacientes. Desta forma, uma alternativa usual para alteração do metabolismo da azatioprina é a associação do fármaco alopurinol, inibidor da enzima xantina oxidase, o qual promove um desvio do metabolismo, aumentando a formação do metabólito ativo 6-Tioguanina, reduzindo as doses diárias da azatioprina entre 25-50%. Aliado à redução da dose, nosso estudo irá avaliar se o uso da associação medicamentosa (azatioprina e alopurinol) irá reduzir os efeitos adversos relacionados à azatioprina, melhorar adesão ao tratamento ou resgatar os pacientes com DC que apresentam significativa falha terapêutica relacionada ao uso da azatioprina.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n

Bairro: Dom Bosco

CEP: 36.038-330

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5336

Fax: (32)4009-5336

E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 1.633.090

Avaliar e comparar os efeitos terapêuticos e adversos da azatioprina isolada e da azatioprina associada com alopurinol em pacientes com doença de Crohn, por meio do monitoramento de efeitos adversos, incluindo a hepatotoxicidade e mielotoxicidade, bem como das variações nas concentrações intra-eritrocitárias de seus metabólitos (6-MP, 6-MMP e 6-TGN).

Objetivo Secundário:

- Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação dos metabólitos intraeritrocitários da Azatioprina, 6-MP, 6-MMP e 6-TGN, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV); - Determinar e avaliar as alterações desses metabólitos em uma população de pacientes em tratamento com azatioprina e com terapia associada azatioprina + alopurinol.- Avaliar a possível eficácia da combinação

de azatioprina com alopurinol no resgate terapêutico e/ou resolução dos efeitos adversos à azatioprina em pacientes que falharam ou que se mostraram intolerantes ao tratamento com este fármaco.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O estudo apresenta um risco mínimo ao sujeito da pesquisa, o qual está associado à coleta de sangue a ser realizada por equipe devidamente capacitada do Hospital HU/CAS, procedendo conforme protocolo interno do hospital e utilizando materiais adequados. Não haverá risco adicional em relação ao tratamento farmacológico, pois os pacientes recrutados já fazem uso do(s) medicamento(s) em estudo (azatioprina ou azatioprina +

alopurinol) e não haverá modificações nas terapias ou nas condutas que seriam realizadas normalmente para tratamento dos mesmos, inclusive em caso de agravamento da doença.

Benefícios:

A associação medicamentosa (azatioprina e alopurinol) permitirá contornar os efeitos adversos relacionados à azatioprina e resgatar a significativa falha terapêutica a esta droga dos pacientes com DC em tratamento com tiopurinas. Vale ressaltar que as falhas terapêuticas ao tratamento convencional da doença de Crohn implicam em sofrimento ao paciente, avanço da morbidade, além de elevado custo para os sistemas de saúde.

Desta forma este estudo poderia contribuir para que esta associação seja realizada de forma otimizada, monitorada e racional, visando o máximo de eficácia com o mínimo de efeitos adversos para estes pacientes. Espera-se ainda, que ocorra melhor adesão terapêutica, uma vez que a possibilidade de contornar ou eliminar reações adversas à azatioprina, responsáveis por abandonos e/ou não comprometimento com o tratamento,

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n

Bairro: Dom Bosco

CEP: 36.038-330

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5336

Fax: (32)4009-5336

E-mail: cep.hu@uff.edu.br



Continuação do Parecer: 1.633.090

será resolvida. Finalmente, vale ressaltar que já existe uso clínico rotineiro da associação de alopurinol nestas condições, como recomendado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença de Cronh - Portaria SAS/MS nº 966, de 2 de outubro de 2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto busca provar que a associação medicamentosa (azatioprina e alopurinol) permitirá contornar os efeitos adversos relacionados à azatioprina resgatar a significativa falha terapêutica a esta droga dos pacientes com DC em tratamento com tiopurinas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Fluxograma_Casuistica.pdf
Fluxograma_Analitico.pdf
Anexo_I_TCLE_Azatioprina.docx
Folhaderosto.pdfCarta_Resposta_Pendencias.pdf
CV_Jorge_Willian.pdf
CV_Julio.pdf
CV_Aline.pdf
Folha_de_Rosto.pdf
Autorizacao_HU_Frente.pdf
Autorizacao_HU_Verso.pdf
Autorizacao_ICB_Frente.pdf
Autorizacao_ICB_Verso.pdf
O Autorizacao_Laboratorio.pdf
Projeto_de_pesquisa.docx

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto está de acordo com a Resolução 466/12 e/ou Norma Operacional/ cartas circulares da CONEP.
Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n
Bairro: Dom Bosco **CEP:** 36.038-330
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)4009-5336 **Fax:** (32)4009-5336 **E-mail:** cep.hu@uff.edu.br

Continuação do Parecer: 1.633.090

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_666053.pdf	05/05/2016 11:07:43		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.docx	05/05/2016 11:05:52	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
Outros	Autorizacao_Laboratorio.pdf	05/05/2016 10:29:32	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Autorizacao_ICB_Verso.pdf	05/05/2016 10:29:05	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Autorizacao_ICB_Frente.pdf	05/05/2016 10:28:42	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Autorizacao_HU_Verso.pdf	05/05/2016 10:28:23	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Autorizacao_HU_Frente.pdf	05/05/2016 10:27:44	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Folha_de_Rosto.pdf	05/05/2016 10:19:43	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	CV_Aline.pdf	05/05/2016 10:19:06	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	CV_Julio.pdf	05/05/2016 10:18:46	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	CV_Jorge_Willian.pdf	05/05/2016 10:18:07	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_Pendencias.pdf	05/05/2016 10:17:19	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	18/03/2016 12:20:39	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_I_TCLE_Azatioprina.docx	24/02/2016 11:50:42	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
Outros	Fluxograma_Analitico.pdf	24/02/2016 10:36:21	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Fluxograma_Casuistica.pdf	24/02/2016 10:35:23	Aline Correa Ribeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n

Bairro: Dom Bosco

CEP: 36.038-330

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5336

Fax: (32)4009-5336

E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA-MG



Continuação do Parecer: 1.633.090

JUIZ DE FORA, 30 de Junho de 2016

Assinado por:
Gisele Aparecida Fófano
(Coordenador)

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n

Bairro: Dom Bosco

CEP: 36.038-330

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5336

Fax: (32)4009-5336

E-mail: cep.hu@uff.edu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Otimização da terapia com Azatioprina em pacientes com Doença de Crohn: avaliação farmacogenética e monitorização terapêutica.

Pesquisador: JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 7

CAAE: 77867417.4.0000.5147

Instituição Proponente: Universidade Federal de Juiz de Fora - ICB

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.860.618

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa.

"Será realizado um estudo prospectivo longitudinal, no qual serão incluídos 150 pacientes, ambos os sexos, entre 18-60 anos, diagnosticados com Doença de Crohn ou retocolite ulcerativa. Este estudo irá avaliar a variabilidade nas concentrações dos metabólitos ativos da azatioprina (6-TGN e 6-MMP) no sangue de pacientes com Doença de Crohn (DC) ou retocolite ulcerativa (RCU). Será utilizado um método cromatográfico (CLAE-UV), recentemente desenvolvido e validado em nosso laboratório, para determinação das concentrações intraeritrocitárias destes metabólitos em 150

pacientes que já estão em terapia há pelo menos 3 meses com azatioprina, a associação azatioprina com alopurinol com ou sem uso de anticorpos monoclonais (infliximabe, adalimumabe ou certulizumabe). Serão avaliados polimorfismos genéticos nas 4 principais enzimas envolvidas no metabolismo da azatioprina (TMPT, XO, HPRT e ITPase) de forma a se identificar uma correlação entre as concentrações dos metabólitos, o perfil genético dos pacientes e resposta clínica ao tratamento da DC ou RCU com estes fármacos. O objetivo final é obter informações que, no futuro, possam nortear a terapia farmacológica personalizada nestes pacientes, obtendo o máximo de efetividade com o mínimo de efeitos adversos."

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@uffj.edu.br

Continuação do Parecer: 4.860.618

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário: Propor uma otimização da terapia com Azatioprina em pacientes com Doença de Crohn ou retocolite ulcerativa a partir da avaliação farmacogenética e da monitorização terapêutica dos metabólitos ativos da azatioprina."

"Objetivo Secundário: Conhecer o perfil genético dos pacientes com Doença de Crohn ou retocolite ulcerativa que são atendidos pelo Hospital Universitário da UFJF. Aplicar método cromatográfico, recentemente desenvolvido e validado em nosso laboratório, na quantificação dos metabólitos da azatioprina (6-TGN e 6-MMP) Avaliar a interferência dos genótipos para as quatro principais enzimas relacionadas à metabolização da azatioprina nas concentrações destes metabólitos e nos efeitos terapêuticos e adversos da azatioprina nestes pacientes Propor uma personalização das doses de azatioprina, baseando-se na farmacogenética e nas concentrações dos metabolitos intraeritrocitários deste fármaco."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"O estudo apresenta um risco mínimo ao participante da pesquisa, o qual está associado à coleta de sangue a ser realizada por equipe devidamente capacitada do Hospital HU/CAS, procedendo conforme protocolo interno do hospital e utilizando materiais adequados. Não haverá risco adicional em relação ao tratamento farmacológico, pois os pacientes recrutados já fazem uso do(s) medicamento(s) em estudo (azatioprina ou azatioprina + alopurinol ou azatioprina + infliximabe) e não haverá modificações nas terapias ou nas condutas que seriam realizadas normalmente para tratamento dos mesmos, inclusive em caso de agravamento da doença. Acompanhamento farmacoterapêutico mais intenso e otimizado dos pacientes com Doença de Crohn ou retocolite ulcerativa atendidos pelo Centro de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital Universitário HU/CAS-UFJF através da possibilidade de otimização da terapia farmacológica com azatioprina, com impacto no aumento da eficácia e redução das reações adversas."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa,

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@uffj.edu.br

Continuação do Parecer: 4.860.618

estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, ressarcimento com as despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens: IV letra b; IV.3 letras a, b, d, e, f, g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. Apresenta o INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS de forma pertinente aos objetivos delineados e preserva os participantes da pesquisa. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a emenda ao projeto está aprovada, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional N° 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: outubro de 2022.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional N°001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO a emenda ao protocolo de pesquisa proposto, com a seguinte justificativa: "Devido às dificuldades operacionais decorrentes de medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 e principalmente pela possibilidade de obtenção de bolsas de incentivo para alunos da iniciação científica, cujo edital prevê finalização em setembro de 2022, solicito prorrogação do prazo final do projeto para 20 outubro de 2022 (previsão anterior era 20 de agosto de 2022)". Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@uffj.edu.br

Continuação do Parecer: 4.860.618

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1795668_E5.pdf	21/07/2021 10:02:46		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Emenda_E5_Carta_de_encaminhamento CEP HU UFJF Adendo.pdf	21/07/2021 10:01:50	Aline Corrêa Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_E5_Julho_2021_Projeto_AZA CEP UFJF.doc	19/07/2021 18:45:55	Aline Corrêa Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_AZA CEP UFJF Versao2.doc	27/06/2019 15:56:17	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
Outros	Resposta_ao_Parecer_Consubstanciado do CEP.pdf	10/01/2018 11:25:02	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Comprovante_Cadastro_do_Projeto_na_GEP.pdf	08/01/2018 21:20:16	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Comprovante_Cadastro_do_Pesquisador_GEP.pdf	08/01/2018 21:19:47	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Anexo_Questionario_de_coleta_de_dados.doc	08/01/2018 21:18:29	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Outros	Anexo_Anamnese_e_Parametros.docx	08/01/2018 21:17:46	Aline Correa Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorrepositorio.pdf	08/01/2018 21:06:28	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Orçamento	Declaracao_de_Aprovacao_de_Orçamento.pdf	08/01/2018 21:01:10	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_AZA CEP UFJF.pdf	08/01/2018 21:00:28	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_e_Concordancia4.pdf	08/01/2018 20:58:30	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.pdf	08/01/2018 20:56:55	Aline Correa Ribeiro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermodeConfidencialidadeSigilo.pdf	28/09/2017 10:37:44	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_e_Concordancia1.pdf	28/09/2017 10:29:53	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_e_Concordancia2.pdf	28/09/2017 10:29:39	JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO	Aceito
Declaração de Instituição e	Declaracao_de_Infraestrutura_e_Concordancia3.pdf	28/09/2017 10:29:29	JORGE WILLIAN LEANDRO	Aceito

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@uffj.edu.br



UFJF - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE JUIZ DE FORA -
MG



Continuação do Parecer: 4.860.618

Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_e_Concordancia3.pdf	28/09/2017 10:29:29	NASCIMENTO	Aceito
----------------	--	------------------------	------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 21 de Julho de 2021

Assinado por:
Jubel Barreto
(Coordenador(a))

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@ufff.edu.br

**ANEXO C - QUESTIONÁRIO COM PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS DO PACIENTE**

ÍNDICE DE HARVEY-BRADSHAW - DOENÇA DE CROHN

Nome do paciente: _____

Identificação (iniciais dos nomes e sequência numérica): _____

Dados da coleta:	() Coleta inicial do estudo
Anamnese: (eventos adversos)	_____ _____ _____
Bem estar geral:	() muito bom (0 pts) () bom (1 pt) () ruim (2 pts) () muito ruim (3 pts) () péssimo (4 pts)
Dor abdominal:	() nenhum (0 pts) () leve (1 pt) () moderado (2 pts) () severo (3 pts)
Número de evacuações líquidas/dia:	() por nº de evacuação (1 pt)
Massa abdominal:	() nenhuma (0 pts) () duvidosa (1 pt) () bem definida (2 pts) () bem definida, dolorosa (3 pts)
Complicações: 1 pt por item	() artralgia () fissura anal () uveíte () eritema nodoso () abscesso () úlcera aftoides () fistula anal () pioderma gangrenoso
Pontuação total:	_____ pontos

**ANEXO C - QUESTIONÁRIO COM PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS DO PACIENTE**

ÍNDICE DE *TRUELOVE AND WITTS* - RETOCOLITE ULCERATIVA

Nome do paciente: _____

Identificação (iniciais dos nomes e sequência numérica): _____

Dados da coleta:	() Coleta inicial do estudo
Anamnese: (eventos adversos)	_____ _____ _____
Pirexia: Definida: temperatura $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$	() Não () Sim
Número de evacuações líquidas/dia: com presença de sangue	() < 4 (atividade leve) () 4 e 5 (atividade moderada) () ≥ 6 (atividade grave)
Anemia: Definida: hemoglobina $\leq 10,5$ g/dL (105 g/L)	() Não (atividade leve) () Sim (atividade grave)
Avaliação final:	_____