

VARIANTES GENÉTICAS DE LA TIOPURINA METILTRANSFERASA E INCIDENCIA DE EVENTOS ADVERSOS EN PACIENTES CON INDICACIÓN DE AZATIOPRINA

MANUEL A. BUHL¹, GRACIELA GÓMEZ¹, MARÍA VICTORIA COLLADO¹, ELISABET M. ODDO²,
MARINA KHOURY³, PABLO J. AZURMENDI², JUDITH SARANO¹

¹Servicio de Inmunología, ²Laboratorio de Nefrología Experimental y Bioquímica Molecular, ³Estadística y Metodología de la Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM) Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen La azatioprina es una tiopurina que presenta rango terapéutico estrecho y marcada toxicidad hematológica y hepática. La tiopurina S-metiltransferasa es una enzima que metaboliza ese grupo de drogas. Mutaciones en el gen que codifica dicha enzima aumentan el riesgo de presentar eventos adversos, por lo que su estudio farmacogenético permite contar con información para el diseño de la estrategia terapéutica. Sin embargo, su utilidad en el medio local no está completamente establecida. Fueron incluidos 45 sujetos (13 hombres) con indicación de azatioprina. Se determinó la presencia de las mutaciones *2, *3A, *3B y *3C de TPMT por PCR-RFLP y se analizó la relación entre el genotipo y la incidencia de eventos adversos relacionados al fármaco. Nueve portaban al menos un alelo no funcional, uno de ellos con genotipo *3A/*3A. Se detectó toxicidad en 3 de los 18 que iniciaron tratamiento con azatioprina: 2 pacientes con genotipo normal presentaron eventos adversos leves, y el único evento adverso de gravedad (aplasia medular) ocurrió en el sujeto con genotipo homocigota mutado. El único que presentó genotipo homocigota mutado desarrolló el más grave de los eventos adversos registrados, a pesar de estar en tratamiento con dosis bajas de azatioprina. Por este motivo, la determinación del genotipo de la tiopurina metiltransferasa pareciera ser de utilidad, pero no reemplaza la necesidad de seguimiento clínico y bioquímico en pacientes en tratamiento con tiopurinas.

Palabras clave: mutación tiopurina metiltransferasa, eventos adversos por mutación TPMT, variantes farmacogenéticas, azatioprina, metabolismo alterado de tiopurinas

Abstract *Genetic polymorphisms of thiopurine methyltransferase and incidence of adverse events in patients with medical indication of azathioprine.* Azathioprine is a thiopurine which has a narrow therapeutic index and marked hematological and hepatic toxicity. Thiopurine s-methyltransferase is an enzyme involved in the metabolism of thiopurines. Mutations in the gene that encodes the enzyme may augment the risk of adverse events. For that reason, pharmacogenetic determinations prior to the initiation of therapy can provide useful information for the future therapeutic strategy. Nevertheless, its utility in the local environment is not completely established. Forty-five subjects (13 men) who had been prescribed azathioprine were included. The presence of *2, *3A, *3B and *3C mutations were determined by PCR-RFLP, and the relationship between genotype and incidence of adverse events related to the drug was analyzed. Nine carried at least one non-functional allele, one of them with *3A/*3A genotype. Among the eighteen patients who initiated treatment with azathioprine, toxicity was detected in 3 cases: 2 mild events were observed in patients with normal genotype, and the only serious event (bone marrow suppression) occurred in the individual with homozygous mutant genotype. The only homozygous mutant patient developed the most severe of the registered events, in spite of being under treatment with low doses of azathioprine. This is the reason why enzymatic determination could be of utility, even though it does not replace clinical and biochemical follow-up in patients under thiopurine treatment.

Key words: thiopurine methyltransferase deficiency, TPMT deficiency, pharmacogenomic variant, azathioprine, poor metabolism of thiopurines

La enzima tiopurina S-metiltransferasa genera compuestos con menor actividad metabólica de un conjunto de drogas denominadas tiopurinas, como tioguanina,

mercaptopurina y su prodroga, la azatioprina (AZA). Las tiopurinas son utilizadas en el tratamiento de enfermedades reumatológicas, dermatológicas, inmunológicas, hematológicas y neoplásicas¹⁻⁴. TPMT, el gen que la codifica, puede presentar mutaciones asociadas a déficit de la actividad enzimática, acumulación de nucleótidos activos circulantes y mayor riesgo de toxicidad medular grave u otros eventos adversos (EA) potencialmente letales, aún con dosis convencionales de tiopurinas¹⁻⁵.

Recibido: 22-IX-2017

Aceptado: 19-I-2018

Dirección postal: Manuel A. Buhl, Servicio de Inmunología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina

e-mail: manuelbuhl@hotmail.com

Distintos autores recomiendan determinar la actividad de la enzima mediante la fenotipificación (medición de la actividad enzimática) o genotipificación (estudio de las variantes alélicas de *TPMT*) en los individuos que recibirán tiopurinas, lo que permitiría ajustar la dosis inicial o elegir un fármaco alternativo^{1,2,6}.

Según nuestro conocimiento, es escasa la información local sobre la frecuencia de dichas mutaciones y de EA relacionados en sujetos tratados con tiopurinas. El objetivo del presente trabajo es describir las variantes genéticas de *TPMT* en los pacientes con indicación de tratamiento con AZA y explorar la relación entre el genotipo de *TPMT* y la incidencia de EA relacionados con el fármaco.

Materiales y métodos

Se obtuvieron muestras de sangre entera entre el mes de agosto de 2012 y mayo del 2016 para la determinación genotípica de *TPMT* en mayores de 18 años con indicación de tratamiento con AZA, los que dieron su consentimiento informado por escrito. Se revisaron las historias clínicas de los mismos entre junio y septiembre de 2016 para estudiar a aquellos que habían recibido el tratamiento. Se excluyeron menores de 18 años y aquellos con neutropenia crítica (< 500 neutrófilos/mm³) previo al inicio de tratamiento con AZA. En todos los sujetos se registró sexo, edad, etnia según criterio del grupo Gladel⁷, genotipo de *TPMT* y si recibió tratamiento con AZA.

El genotipo de *TPMT* se estudió por reacción en cadena de polimerasa seguido de análisis de fragmentos post-restricción enzimática secuencia específica de los amplificadores (PCR-RFLP). Las reacciones que determinan los alelos *3A, *3B y *3C se realizaron según Ishioka y col.⁸. Para detectar el alelo *2, se diseñaron cebadores mediante el *software Primer3* (<http://primer3.ut.ee/>), que introducen un sitio de corte para la enzima de restricción *PstI* para la secuencia *wild type*. La especificidad de todos los cebadores fue analizada con los programas *in silico-PCR* de UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=603159877_7aobLxcODxIYjfnawgSQO6GLVz88) y *Primer-Blast* de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). La visualización de los patrones de bandas se realizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y los diferentes genotipos se interpretaron según los resultados de las tres reacciones combinadas. Se clasificaron como homocigota mutado (ambos alelos distintos de *1), heterocigota (*1/*2, *1/*3A, *1/*3B y *1/*3C) y homocigota normal (*1/*1).

En todos los pacientes se relevó: fecha de inicio de tratamiento, peso más próximo, dosis máxima utilizada, tratamiento concomitante con fármacos que presentaban: 1) EA análogos (corticoides, metotrexato, hidroxycloloquina y ciclofosfamida) o 2) interacciones (mesalazina, sulfasalazina, infliximab, alopurinol y naproxeno) con la AZA. También se estudiaron los diagnósticos que motivaron la indicación de la tiopurina y los resultados de hemograma y función hepática previos al inicio del tratamiento.

Los diagnósticos que motivaron la indicación fueron clasificados en: trasplante, enfermedad reumatológica (lupus eritematoso sistémico, vasculitis, miositis o síndrome de superposición), enfermedad del tracto gastrointestinal y glándulas anexas (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o colitis ulcerosa) y enfermedad neurológica (*miastenia gravis* o encefalitis autoinmune).

Se consideró alteración funcional hepática a la elevación de los niveles de transaminasas dos veces por encima del límite superior de la normalidad, al menos en una ocasión. Se consideró hepatotoxicidad asociada al tratamiento si ocurrió tras haber iniciado tratamiento con AZA y los valores disminuyeron al reducir la dosis o interrumpir el mismo^{9,10}.

Se consideró alteración hematológica a la presencia de leucopenia (glóbulos blancos $< 3000/\text{mm}^3$)^{11,12} y/o plaquetopenia ($< 100\,000/\text{mm}^3$)¹¹ y/o anemia (hemoglobina < 12 g/dl en mujeres o < 14 g/dl en hombres)¹³, al menos en una ocasión. Se consideró mielotoxicidad asociada al tratamiento si ocurrió tras haber iniciado AZA.

En los pacientes que presentaron toxicidad hematológica o hepática, se registró la dosis de AZA recibida, hemograma y valor de transaminasas al momento del EA, así como el tiempo de tratamiento. En los individuos que no presentaron EA, se registró el resultado del último hemograma y valor de transaminasas disponible.

Las determinaciones de transaminasas hepáticas, aspartato amino transferasa (ASAT) y alanina amino transferasa (ALAT) en suero se realizaron en autoanalizador Architect i2000 (Abbott Diagnostics, Estados Unidos de América) por método UV cinético para ASAT (NADH (sin P-5'-P)) [VN < 41 U/l] y ALAT (NAD (sin P-5'-P)) [VN < 42 U/l]. El recuento de plaquetas, glóbulos blancos y rojos y dosaje de hemoglobina se efectuó en plasma obtenido con EDTA en contador hematológico (Sysmex, Japón).

Los resultados se presentan como mediana y rango en variables numéricas y como frecuencia o porcentaje en variables categóricas. Los intervalos de confianza (IC) se calcularon para el 95%. Se planificó un tamaño de muestra de 33 personas o más para una frecuencia esperada de al menos un alelo no funcional en genotipo *TPMT* de 14.3%⁴, un nivel de confianza del 95% y una semi-amplitud del intervalo de 12%.

El proyecto y el modelo de consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA.

Resultados

Se identificaron 45 individuos (13 hombres) con indicación de AZA, a quienes se les realizó genotipificación. Las frecuencias de genotipo de *TPMT* fueron: 36 homocigotas normales, 8 heterocigotas (*1/*2 $n = 6$, *1/*3A $n = 1$, *1/*3B $n = 1$) y 1 homocigota mutado (*3A/*3A), para un total de 9 sujetos con al menos un alelo no funcional (20%; IC 95% = 16.96-23.04). Dieciocho iniciaron tratamiento con AZA (Tabla 1), seguidos durante 24 [8-268] meses, mientras que 27 no fueron incluidos en este análisis por recibir tratamiento con drogas alternativas a la AZA o pérdida de seguimiento. En 3 casos se detectó toxicidad (Tabla 2); todos recibían la dosis mínima recomendada (1 mg/kg/día) de AZA al momento del EA. El único EA de gravedad ocurrió en una paciente con genotipo homocigota mutado; los otros dos EA fueron de resolución ambulatoria. A su vez, fue posible evaluar el seguimiento en 3 de los 8 heterocigotas, que presentaron genotipo *1/*2 (Tabla 3) y que, tratados con dosis de 1.2-2 mg/kg/día no mostraron alteraciones hepáticas o hematológicas atribuibles al fármaco.

TABLA 1.– Descripción de los pacientes que iniciaron tratamiento con azatioprina (AZA); (n = 18)

Característica	Valor
Sexo (F:M)	14:4
Etnia* (caucásico: mestizo caucásico-americano)	11:6
Edad al inicio del tratamiento [mediana (rango)]	59 (24-81)
Peso al inicio del tratamiento [mediana (rango)]	
Hombres	75.5 (55-87)
Mujeres	70 (42-120)
Enfermedad reumatológica	11
Enfermedad del tracto gastrointestinal	4
Enfermedad neurológica	2
Trasplante renal	1
Fármacos concomitantes [#]	
Corticoides	16
Hidroxicloroquina	5
5-aminosalicilatos	1
Ciclofosfamida	1
Naproxeno	1
Parámetros bioquímicos alterados al inicio ^{&}	
Anemia	10
Leucopenia	2
Plaquetopenia	0
Transaminasas hepáticas	2

*Un dato faltante

[#]Ningún paciente recibía alopurinol, infliximab ni metotrexato

[&]Las definiciones se encuentran detalladas en las secciones Materiales y métodos

TABLA 2.– Descripción de los pacientes en tratamiento con azatioprina (AZA) que presentaron efectos adversos (EA)

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Genotipo	*1/*1	*1/*1	*3A/*3A
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino
Edad	67	72	77
Etnia	Mestizo	Mestizo	Caucásico
	caucásico-americano	caucásico-americano	
Diagnóstico	LES	Vasculitis ANCA+, Esclerosis sistémica	Vasculitis ANCA+
Duración del tto. (meses)	17	1	3
Eventos adversos	Leucopenia (2700 GB/mm ³)	Hepatotoxicidad (10xVN transaminasas)	Aplasia medular (500 GB/ mm ³ , HB: 7.4 g/l, plaquetas: 19 000/mm ³)
Fármacos concomitantes [#]	Hidroxicloroquina	Ninguno	Ninguno
Comentarios	El EA remitió luego de suspensión de tto.	El EA remitió luego de suspensión de tto.	La PAMO apoyó el diagnóstico de toxicidad por fármacos. El cuadro clínico mejoró luego de suspensión de tto.

LES: Lupus eritematoso sistémico; ANCA: Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos; GB: Glóbulos blancos; VN: Valor normal; HB: Hemoglobina; tto.: Tratamiento; PAMO: Punción-aspiración de médula ósea

[#]Drogas con efecto inductor de leucopenia/hepatotóxico.

Discusión

La enzima tiopurina S-metiltransferasa es parte de una cascada enzimática responsable del metabolismo de las

drogas del grupo de las tiopurinas, entre ellas la AZA¹⁴. La AZA es frecuentemente utilizada en diferentes especialidades como ahorradora de corticoides para tratar enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes. La

TABLA 3.– Descripción de los pacientes con genotipo heterocigota (*1/*2) en tratamiento con azatioprina (AZA)

	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino
Edad	60	24	46
Etnia	Caucásico	Mestizo caucásico-americano	Caucásico
Diagnóstico	Vasculitis ANCA+	Miositis	Hepatitis autoinmune
Dosis de AZA (mg/kg/día)	1.2	1.7	2
Tiempo de seguimiento (meses)	31	14	24
Hemograma previo (GB/Hb/plaquetas)	16 000/11.8/312 000	2400/10.6/#	6900/10.3/269000
Hemograma post-tto.	4780/14.8/203 000	2100/10.3/#	5500/13.6/227000
Hepatograma previo (ASAT/ALAT)	17/27	93/96	212/122
Hepatograma post-tto.	18/15	73/107	38/30
Comentarios		Leucopenia e hígado graso diagnosticado por PBH previa al tratamiento	Hepatitis autoinmune diagnosticada por PBH previa al tratamiento

ANCA: Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos; tto.: Tratamiento; GB: Glóbulos blancos; Hb: Hemoglobina; ASAT: Aspartato amino transferasa; ALAT: Alanina amino transferasa; PBH: Punción-biopsia hepática
Recuento de plaquetas: dato faltante

interacción de la AZA con la enzima genera metabolitos secundarios; se postula que dichos metabolitos activos, por ser nucleótidos de tioguanina, son incorporados en el ADN leucocitario con la consiguiente muerte celular, mecanismo compatible con la supresión medular que provocan²⁻³.

La actividad de la enzima puede ser determinada en forma directa por fenotipificación, o por genotipificación. La fenotipificación mediante el dosaje de la actividad plasmática resulta confiable, pero refleja su actividad en un momento definido y numerosos factores analíticos pueden afectar la reacción (ej., transfusiones y factores físico-químicos). Tampoco resulta muy efectiva en identificar sujetos con baja actividad de la enzima¹⁴⁻¹⁶.

La genotipificación tiene menor variabilidad metodológica, no se modifica por actividad de la enfermedad ni el uso de otros fármacos, es menos afectada por factores pre-analíticos y posee alta especificidad (cerca al 100%) para identificar tanto el genotipo normal en individuos con actividad normal o alta, como el heterocigota en individuos con actividad intermedia de la enzima. Las limitaciones de la genotipificación se relacionan con la imposibilidad de detectar variantes alélicas poco frecuentes¹⁴⁻¹⁶. Dadas sus características, algunos estudios recomiendan la utilización de ambos métodos^{14, 16}. En la presente serie se informan los resultados del método disponible en nuestro centro, la genotipificación.

El genotipo de TPMT se asocia con el riesgo de EA, incluso mielosupresión, en pacientes que reciben tiopurinas. Los heterocigotas tienen un 30-60% de probabilidades de padecer mielosupresión moderada o grave, mientras que los que presentan dos alelos no funcionales invariablemente desarrollan mielosupresión grave^{1, 3, 5, 6, 9, 14}.

Las variantes genéticas de los alelos que codifican para la enzima pueden ser distintas en los individuos de una población. La mayoría presenta dos alelos normales, 3-14% es heterocigota, y el 0.3% presenta dos alelos no funcionales^{2-4, 11}. Si bien en el presente estudio la frecuencia fue mayor a lo comunicado en la literatura (17.7% de heterocigotas y 2.2% de homocigotas), el resultado puede deberse al escaso número de personas estudiado.

Se han informado hasta 37 mutaciones relacionadas al genotipo de TPMT, pero cuatro alelos no funcionales (*2, *3A, *3B y *3C) son responsables de 80 a 95% de los casos de actividad disminuida de la enzima, con algunas diferencias en la frecuencia observada según la etnia^{5, 11}.

La variante alélica no funcionante *3A es la más frecuente en caucásicos, mientras que *3C es más frecuente en africanos, afroamericanos y asiáticos, y hay poca información al respecto en población mestiza¹⁷. Un estudio realizado en 147 personas sanas halló que la variante alélica no funcional más prevalente en Argentina es la *3A seguida, en frecuencia, de los alelos *2 y *4⁴. En la presente serie, el alelo más frecuentemente hallado fue el *2, seguido del *3A; la diferencia en el alelo más informado podría vincularse a una disímil proporción de caucásicos y mestizos entre las poblaciones estudiadas, al bajo número de la muestra de nuestro estudio o un posible sesgo en la selección de los pacientes al realizar la genotipificación según la actividad enzimática baja o nula en el trabajo de Laróvere y col.⁴.

Dos de los tres que presentaron EA eran portadores de genotipo normal. En estudios previos se han comunicado EA en individuos con actividad enzimática normal, y podrían explicarse por la presencia de una infección viral

concomitante, la administración simultánea de drogas con toxicidad medular, hepática o interacciones que aumenten los niveles séricos de AZA (como los 5-aminosalicilatos, naproxeno, infliximab y, con menor significancia clínica, alopurinol, furosemida y metotrexato)^{3, 11, 18}, e incluso se ha descrito la presencia de alteraciones y polimorfismos en otros integrantes de la vía metabólica de las tiopurinas distintos del TPMT. No encontramos enfermedad clínica evidente que pueda explicar los EA ocurridos en los dos pacientes genotípicamente normales (Tabla 2). Respecto al uso de fármacos concomitantes, ambos se encontraban en tratamiento con bajas dosis de corticoides, y el que presentó leucopenia recibía concomitantemente hidroxiclороquina, fármaco ya relacionado con este EA que podría explicar su ocurrencia. Si bien habían recibido ciclofosfamida 36-100 días previos al momento del EA, es poco probable que su uso explique la mielotoxicidad, puesto que su vida media es de 7 horas y el menor recuento de granulocitos en sangre periférica ocurre 6-10 días luego de su administración¹⁹.

Aunque no podemos descartar la existencia de mutaciones de otras enzimas que actúan en la misma vía metabólica, ni la portación de otras variantes hipofuncionantes de TPMT no analizadas en el presente estudio, es poco probable que los EA que presentaron puedan deberse a estos motivos, puesto que las mutaciones no pesquisadas en este estudio son de baja prevalencia.

Respecto al que presentó hepatotoxicidad sin causa aparente, estudios recientes indican que la existencia de este EA podría estar ligada al uso de AZA más que al genotipo de TPMT²⁰.

En la presente serie, si bien se detectaron ocho pacientes con genotipo heterocigota, sólo tres recibieron AZA y ninguno de ellos presentó EA (Tabla 3). Una posible explicación es que en los tres casos se utilizaban dosis de AZA ≤ 2 mg/kg/día, lo que representa una dosis 33% menor de la máxima utilizable, que coincide con las recomendaciones de ajuste de dosis en sujetos con genotipo heterocigota². Posibles explicaciones del escaso número de EA encontrados fueron el tiempo de seguimiento insuficiente (comparado con un estudio de referencia)¹¹, bajo número de sujetos estudiados y la concomitancia entre las características de la enfermedad y el EA. Ejemplo de esto es que dos de los heterocigotas presentaron enfermedad hepática confirmada por biopsia previa al inicio del tratamiento, sumado a leucopenia en uno de ellos. Por otro lado, se podría considerar la existencia de sujetos hipermetabolizadores que presentan alta actividad de la enzima entre los heterocigotas, según comunican Ansari y col.²¹.

Si bien se conoce que la prevalencia de individuos con genotipo homocigota mutado es baja, la ocurrencia de EA en este grupo suele implicar consecuencias graves para la salud, no siempre reversibles, con una eventual carga económica para el sistema de salud. En este caso,

el único paciente que presentó genotipo homocigota mutado desarrolló, con dosis mínima recomendada para el tratamiento con AZA (1 mg/kg/día), el EA más grave de los registrados: aplasia medular. La toxicidad por fármacos, cuyo diagnóstico fue apoyado por biopsia, tuvo como forma de presentación neutropenia febril, por lo que conocer el estatus de actividad de la enzima resultaría un factor determinante en la seguridad de su administración.

La principal limitación de este trabajo es el escaso número de pacientes que iniciaron tratamiento con AZA entre aquellos a quienes se les había realizado el estudio genético. Hubiera sido interesante comparar las características clínicas y bioquímicas entre grupos según genotipo, pero el tamaño de la muestra no permitió realizar estadística.

La prevención y posiblemente los costos podrían justificar la genotipificación de la enzima previa al inicio del tratamiento en los individuos con indicación de AZA. El costo de tratar una aplasia medular es varias veces más alto que el costo de la genotipificación^{14, 22, 23}. No obstante, sería conveniente realizar un estudio que incluya descripción de costos. La determinación del genotipo de TPMT no reemplaza al seguimiento clínico, el monitoreo hematológico y de las enzimas hepáticas en el paciente en tratamiento con tiopurinas; sin embargo, aportaría información valiosa para el diseño de la estrategia terapéutica.

Agradecimientos: A Darío Guevara, Alejandro Celía, María Florencia Martínez y María de los Ángeles Gargiulo por el análisis de los datos genéticos y bioquímicos, y a Adriana Scerbo, Susana Cesario y Lorena Suárez por la asistencia técnica.

Conflicto de intereses: Ninguno que declarar

Bibliografía

1. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89: 387-91.
2. DiPiero J, Teng K, Hicks JK. Should thiopurine methyltransferase (TPMT) activity be determined before prescribing azathioprine, mercaptopurine, or thioguanine? *Cleve Clin J Med* 2015; 82: 409-13.
3. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 753-67.
4. Laróvere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, De Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 388-93.
5. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998; 129: 716-8.
6. Schwab M, Schäffeler E, Marx C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 429-36.
7. Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythemato-

- sus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine* (Baltimore) 2004; 83: 1-17.
8. Ishioka S, Hiyama K, Sato H, et al. Thiopurine methyltransferase genotype and the toxicity of azathioprine in Japanese. *Intern Med* 1999; 38: 944-7.
 9. Al-Judaibi B, Schwarz UI, Huda N, et al. Genetic predictors of azathioprine toxicity and clinical response in patients with inflammatory bowel disease. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2016; 23: e26-36.
 10. Avallone EV, Pica R, Cassieri C, Zippi M, Paoluzi P, Vernia P. Azathioprine treatment in inflammatory bowel disease patients: type and time of onset of side effects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18: 165-70.
 11. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993; 34: 1081-5.
 12. Lee YJ, Hwang EH, Park JH, Shin J, Kang B, Kim S. NUDT15 variant is the most common variant associated with thiopurine-induced early leukopenia and alopecia in Korean pediatric patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016; 28: 475-8.
 13. National Cancer Institute, Department of Health and Human Services (US); Common Terminology Criteria for Adverse Events. Version 4.0. En: https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf; consultado julio 2016.
 14. Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol* 2010; 63: 288-95.
 15. Booth RA, Ansari MT, Loit E, et al. Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: A systematic review. *Ann Intern Med* 2011; 154: 814-23.
 16. Graham V. Thiopurine methyltransferase phenotyping and genotyping in clinical practice. En: <http://theses.bham.ac.uk/738/1/Graham10MPhil.pdf>; consultado mayo 2016.
 17. Isaza C, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003; 25: 423-9.
 18. Van Aken J, Schmedders M, Feuerstein G, Kollek R. Prospects and limits of pharmacogenetics: the thiopurine methyl transferase (TPMT) experience. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3: 149-55.
 19. Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, et al. Sección IV, Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas, capítulo 51, Fármacos antineoplásicos. En: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11ma edición. México: McGraw-Hill, 2007, p 1322-6.
 20. Liu YP, Xu HQ, Li M, et al. Association between thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and azathioprine-induced adverse drug reactions in patients with autoimmune diseases: A meta-analysis. *PLoS ONE* 2015; 10: e0144234.
 21. Ansari A, Hassan C, Duley J, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1743-50.
 22. Dubinsky MC, Reyes E, Ofman J, Chiou CF, Wade S, Sandborn WJ. A cost-effectiveness analysis of alternative disease management strategies in patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2239-47.
 23. Oh KT, Anis AH, Bae SC. Pharmacoeconomic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism screening by polymerase chain reaction for treatment with azathioprine in Korea. *Rheumatology* (Oxford) 2004; 43: 156-63.

La Tapa

Árbol de cacao con "oruga militar del sur", 1702-3

Maria Sibylla Merian (1647-1717)

Árbol de cacao, rama (*Theobroma cacao*, L.) con "oruga militar del sur", *Spodoptera eridania* (Stoll). Acuarela sobre vitela, 37.7 × 28.4 cm. Lámina XXVI de *Dissertatio de generatione et metamorphoibus insectorum Surinamensium*, 1705.

Maria Sibylla Merian nació en Frankfurt en 1647, nació, creció y vivió en una familia de artistas, murió en Ámsterdam en 1717. Fue ilustradora, naturalista, gran observadora dedicada en especial a estudiar e ilustrar la metamorfosis de los insectos. En 1699 viajó a Surinam (Guayana holandesa) con sus dos hijas, también ilustradoras. La malaria la hizo regresar a Holanda en 1702. En 1705 publicó su obra más conocida, de ella proviene esta ilustración (ver: Pieters, F. F. J. M., Winthagen, D. Maria Sibylla Merian, naturalist and artist (1647-1717): a commemoration on the occasion of the 350th anniversary of her birth. *Arch Nat Hist* 1999; 26: 1-18. Jones C. Pods, Pots, and Potions: Putting Cacao to Paper in Early Modern Europe. En: <http://publicdomainreview.org/>; 27-12-2017).

El chocolate, acusado de causar el feo acné vulgar, es vindicado por disminuir el riesgo de infarto y enfermedad isquémica de miocardio (Larsson SC, Åkesson A, Gigante B, Wolk A. Chocolate consumption and risk of myocardial infarction: a prospective study and meta-analysis. *Heart* 2016; 102: 1017-22) y disminuir el riesgo de la fibrilación auricular (Mostofsky E, Johansen MB, Tjønneland A, et al. Chocolate intake and risk of clinically apparent atrial fibrillation: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Heart* 2017; 103: 1163-7). Y, olvidábamos de mencionar, los flavonoides del cacao aumentan las funciones cognitivas, "contraatacan la declinación cognitiva" (Socci V, Tempesta D, Desideri G, De Gennaro L, Ferrara M. Enhancing human cognition with cocoa flavonoids. *Front Nutr* 2017; 4:19).