



FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA



**PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA NUD15 E TPMT NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

GUILHERME MOTTA ANTUNES FERREIRA

Manaus, AM
2020

GUILHERME MOTTA ANTUNES FERREIRA

**PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA NUD15 E TPMT NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*

Orientador: **Profº. Drº. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda**

Co-orientador: **Profª. Drª. Cristina Motta Ferreira**

Manaus
2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

383p Motta Antunes Ferreira, Guilherme
Prevalência Dos Polimorfismos Da Proteína NUD15 e
TPMT Na Amazônia Brasileira / Guilherme Motta Antunes
Ferreira. Manaus : [s.n], 2020.
66 f.: color.; 31 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia
(Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2020.
Inclui bibliografia
Orientador: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda
Coorientador: Cristina Motta Ferreira

1. Farmacogenética. 2. Leucemia Linfoblástica
Aguda. 3. TPMT. 4. NUDT15. 5. Polimorfismos. I.
Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Orient.). II.
Cristina Motta Ferreira (Coorient.). III. Universidade do
Estado do Amazonas. IV. Prevalência Dos
Polimorfismos Da Proteína NUD15 e TPMT Na Amazônia
Brasileira

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO**PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DA PROTEÍNA NUD15 E TPMT NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA****GUILHERME MOTTA ANTUNES FERREIRA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM**



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 012/2020

Ao vigésimo sétimo dia do mês de agosto do ano de 2020, às 09h00, realizou-se no auditório da Fundação Hemoam, Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de Mestrado do discente **Guilherme Motta Antunes Ferreira** sob o título “**Prevalência dos Polimorfismos da Proteína NUD15 e TPMT na Amazônia Brasileira**”, tendo como orientador o **Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda** e como coorientadora a **Profa. Dra. Cristina Motta Ferreira** segundo encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao aluno o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo – Presidente	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <u>Gisely Cardoso</u> CPF: <u>038.454.689-02</u>
Profa. Dra. Leny N. da Motta Passos – HEMOAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <u>Leny N. da Motta Passos</u> CPF: <u>034.842.462-00</u>
Prof. Dr. Vanderson de Souza Sampaio (FMT-HVD) – FMT-HVD	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <u>Vanderson de Souza Sampaio</u> CPF: <u>533.289.002-97</u>

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Aprovado

Não Aprovado

Gisely Cardoso de Melo

Presidente da Banca Examinadora

À Deus e Nossa Senhora por esse pequeno passo da minha vida, por toda ajuda que eles me deram ao longo desse tempo que se passou, pela força e fé, mesmo nos momentos que queria desistir.

À minha família, em especial meus pais William Antunes Ferreira, Cristina Motta Ferreira e meu irmão Gabriel Motta Ferreira, por terem me apoiado e dado essa oportunidade de estar concluindo esse mestrado e por sempre terem me ensinado a dar meu melhor em tudo que eu fizesse, pois se não dermos nosso melhor, sempre seremos mais um no meio de muitos.

À minha noiva, Karoline Viana dos Santos, por, mesmo após todas as tribulações, permaneceu ao meu lado, dando o apoio e suporte necessários para enfrentar cada um dos obstáculos que surgiram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da minha vida e a Nossa Senhora por ter sido meu auxílio na fé e em todas as tribulações. Agradeço a ambos por terem me ajudado a chegar onde cheguei e ser quem sou e por estar concluindo essa fase da minha vida.

Aos meus pais William e Cristina por terem me dado toda a educação e formação necessárias, atributos importantes para minha personalidade e caráter atual. Sou extremamente grato por tudo o que vocês puderam me oferecer, sem vocês, não teria chegado onde cheguei e nem seria capaz de fazer tudo o que sei hoje. Amo muito vocês e agradeço por todo apoio dado ao longo dessa jornada.

A minha noiva e eterna amiga, Karoline Viana, por estar ao meu lado mesmo depois de tudo o que passamos, por nunca ter deixado de me apoiar, mesmo durante o período em que estivemos longe um do outro. Muito obrigado por tudo, amor meu, e por toda força que me destes.

Ao meu orientador, Dr. Marcus Lacerda e ao Dr. Guilherme Kurtz, por terem me dado a oportunidade de trabalhar com eles, duas das melhores e mais dedicadas pessoas. Agradeço a oportunidade de ter aprendido o que aprendi com vocês e espero que essa parceria dure por muito tempo.

A Fundação de Medicina Tropical Dr.º Heitor Vieira Dourado por ter me recebido durante esse período e ter dado a oportunidade para realizar minha pesquisa e de ter aprendido bastante com todos os profissionais de lá. Também estendo esse agradecimento aos amigos que fiz nesta instituição: Dr^a. Gisely Melo, Drº Vanderson Sampaio, Dra. Djane Baia, Erick Frota, Rebeca Netto, Bruna Jung, Larissa Brasil (amiga de longa data), Victor Irungu, Emanuelle Lira, Flavia Fontenelle, e a todos os demais membros da equipe. Obrigado por me receberem e terem me acompanhado e estado ao meu lado. Meu eterno agradecimento a vocês.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por terem me dado a oportunidade de realizar a pesquisa.

“Eu não trocaria meus sofrimentos por quaisquer bens do mundo”.

São Luis Beltran

RESUMO

Alelos de função reduzida nos genes TPMT e NUDT15 são fatores de risco para a toxicidade da tiopurina. Este estudo avaliou a influência da ancestralidade nativa na distribuição de polimorfismos TPMT (rs1142345, rs1800460 e rs1800462) e NUDT15 (rs116855232) e fenótipos metabólicos compostos em 128 homens saudáveis da Amazônia brasileira. A proporção média de ancestrais nativos e europeus diferia muito e significativamente entre os autodeclarados ameríndios e não-ameríndios, embora fosse evidente uma grande mistura em ambos os grupos. A ascendência nativa não foi significativamente associada à distribuição de frequência dos polimorfismos TPMT ou NUDT15 investigados. Este estudo relatou uma diferença nominal mas não significativa na menor frequência alélica entre as sub-coortes NAT (7,7%) e não-NAT (4,2%) e essa discrepância quantitativa não pode ser explicada pela extensa ancestralidade nativa, uma vez que se analisou sub-coortes com ancestralidade >70% vs. <30% nativa. Deve-se ter um cuidado maior com a população nativa americana para não se extrapolar os dados farmacogenéticos pois nunca se sabe se a pessoa pode ser um portador de um fenótipo metabolizador ruim ou intermediário para TPMT ou NUDT15, evitando-se assim uma possível intoxicação.

Copyright: Farmacogenética e Genômica, 2020, Publicada Antes da Impressão

Palavras-chave: Farmacogenética, Leucemia Linfoblástica Aguda, TPMT, NUDT15, polimorfismos, tiopurinas, Amazônia brasileira

ABSTRACT

Reduced function alleles in the TPMT and NUDT15 genes are risk factors for thiopurine toxicity. This study evaluated the influence of Native ancestry on the distribution of TPMT (rs1142345, rs1800460 and rs1800462) and NUDT15 (rs116855232) polymorphisms and compound metabolic phenotypes in 128 healthy males from the Brazilian Amazon. The average proportion of Native and European ancestry differed greatly and significantly between self-declared Amerindians and non-Amerindians, although extensive admixture in both groups was evident. Native ancestry was not significantly associated with the frequency distribution of the TPMT or NUDT15 polymorphisms investigated. This study reported a nominal but not significant difference in the lower allele frequency between the NAT (7.7%) and non-NAT (4.2%) sub-cohorts and this quantitative discrepancy cannot be explained by the extensive native ancestry, since that analyzed sub-cohorts with ancestry > 70% vs. <30% native. Greater care should be taken with the Native American population in order not to extrapolate the pharmacogenetic data, as it is never known whether the person may be a carrier of a bad or intermediate metabolizing phenotype for TPMT or NUDT15, thus avoiding possible intoxication.

Copyright: Pharmacogenetics and Genomics, 2020, Publish Ahead of Print

Keywords

Pharmacogenetics, Acute Lymphoblastic Leukemia, TPMT, NUDT15, polymorphisms, thiopurines, Brazilian Amazon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo com os marcos da terapia e biologia da LLA.....	03
Figura 2 – Translocação do cromossomo Filadélfia (translocação entre os cromossomos 9 e 22).....	06
Figura 3 – Diagrama das fases de tratamento da LLA.....	08
Figura 4 – Estrutura da 6-Mercaptopuriona e Tioguanina em comparação com Adenina e Guanina.....	09
Figura 5 – O efeito do metabolismo de drogas na excreção	10
Figura 6 – Metabolismo da Azatioprina	12
Figura 7 – Metabolismo da 6-MP.....	13
Figura 8 – Polimorfismo genético da Tiopurina S-metiltransferase (TPMT) e seu papel na determinação da resposta aos medicamentos	16
Figura 9 – Recomendação das doses de Tiopurinas com base nos fenótipos de TPMT	18
Figura 10 – Recomendação das doses de Tiopurinas com base nos fenótipos de NUDT15	24
Figura 11 – Mapa dos municípios onde foi realizado o inquérito sobre a G6PDd na Amazônia Brasileira	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avanços marcantes na evolução da terapia para LLA	03
Tabela 2 – Marcos na compreensão da biologia da LLA.....	03
Tabela 3 – Classificação da OMS de neoplasias linfóides precursoras	04
Tabela 4 – Genótipos que constituem os alelos TPMT.....	14
Tabela 5 – Atribuição de prováveis fenótipos de TPMT com base em genótipos	15
Tabela 6 – Frequências de alelos de TPMT nas principais raças / grupos étnicos.....	20
Tabela 7 – Caracterização de NUDT conhecidas	22
Tabela 8 – Atribuição de prováveis fenótipos NDT15 baseados em genótipos.....	22
Tabela 9 – Sondas utilizadas no processo de genotipagem para cada polimorfismo	30
Tabela 10 – Grupos Ameríndios investigados: localização, linguagem e distribuição do rs116855232 da NUDT15 (c.414C>T).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADE DE MEDIDAS

1KG-AMR – Projeto Mil Genomas e Americanos Misto
6-MP – 6-Mercaptopurina
6-MMP – 6-Metil Mercaptopurina
6-MeTIMP – 6-Metil-Tioinosina 5'-Monofosfato
6-TGN – 6-Tioguanina
6-TGMP – Monofosfato de 6-Tioguanina
6-TIMP – Monofosfato de 6-Tiosina
6-TITP – Trifosfato de Tioinosina
6-TXMP – Monofosfato de 6-tioxantina
Ala – Alanina
AMR – Superpopulação Americana
Arg - Arginina
AZA – Azatioprina
CPIC – Consórcio de implementação de farmacogênica clínica
Cys - Cisteína
DII – Doenças Intestinais Inflamatórias
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNA-TG – DNA de Tioguanina
G6PD – Glicose-6-fosfato Desidrogenase
HGPRT – Hipoxantina Guanina Fosforibosil Transferase
LLA – Leucemia Linfoide Aguda
IMPDH – Monofosfato de Desidrogenase de Inosina
ITPASE – Trifosfato de Inosina Pirofosfo-hidrolase
MAF – Menor Frequência Alélica
MeTGMP – Monofosfato de Metil-Guanina
MeTIMP – Monofosfato de Metil Tioinosina
MUT - Mutação
NAT – Ancestral Nativo
Non-NAT – Ancestral Não-Nativo
NUDIX – Nucleosídeo Difosfatase ligado a uma parte X
OMS – Organização Mundial de Saúde
PGx – Farmacogenética/farmacogenômica

PharmVar – Variação Farmacogênica

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

RNA – Ácido Ribonucleico

PharmGKB – Base de Conhecimento de Farmacogenômica

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – Reação em Cadeia Quantitativa da Polimerase

TGMP – Monofosfato de Tioguanosina

TGN - Nucleotídeos de Tioguanina

TGTP – Trifosfato de Tioguanosina

Tre - Treonina

TPMT – Tiopurina Metiltransferase

uL – Microlitro

WT – Selvagem

XO – Xantina Oxidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Leucemia Linfóide Aguda.....	02
1.1.1 Histórico	02
1.1.2 Classificação e Epidemiologia	14
1.1.3 Patofisiologia da LLA	14
1.1.4 Aspectos Gerais da LLA.....	06
1.1.5 Tratamento da LLA.....	07
1.2 Farmacogenética das Tiopurinas.....	09
1.3 Tiopurina Metiltransferase (TPMT).....	14
1.4 Proteína Nucleosídeo Difosfatase ligada a uma parte modificada 15 (NUDT15)....	22
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Geral	27
2.2. Específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Delineamento	28
3.2. Técnicas Laboratoriais	30
3.2.1 Extração e diluição do DNA.....	30
3.2.2 Genotipagem e determinação dos polimorfismos.....	30
3.2.3 Determinação da Ancestralidade	31
3.2.4 Estatística.....	32
3.3 Aspectos éticos.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Artigo.....	33
5. LIMITAÇÕES	42
6. CONCLUSÃO.....	42
7. PERSPECTIVAS.....	43
8. REFERÊNCIAS.....	14
9. ANEXOS.....	49
9.1 ANEXO I - Protocolo de Extração de DNA.....	49
9.2 ANEXO II - Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de TPMT e NUDT15.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfóide Aguda

1.1.1 Histórico

Em 1658, Jan Swammerdam observou as células sanguíneas sob o microscópio pela primeira vez, em 1674 Anton van Leeuwenhoek define as hemácias e a corrente sanguínea nos capilares pela primeira vez e as células brancas foram descobertas por Joseph Lietaud, em seu trabalho sobre o sistema linfático (1,2). Em 1827, Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau publicou um relato de caso de uma paciente com sintomas de inchaço do abdômen, febre, fraqueza, pedras nos rins e alteração sanguínea e pela primeira vez ele nomeou a doença “leucemia”, devido ao aumento das células brancas (2).

Em 1948, um estudo relatou a “remissão temporária” induzida pela Aminopterina em cinco crianças, iniciando assim a era da quimioterapia que foi reforçada em 1961, quando um estudo publicou, pela primeira vez, uma remissão completa em 59% dos pacientes pediátricos, utilizando a combinação de Mercaptopurina e Metotrexato (3–5). Em 1962, foi introduzida uma terapia constituída de algumas fases composta por: remissão da indução, terapia no sistema nervoso central (SNC) com radiação intracraniana e Metotrexato intratecal, consolidação e tratamento de continuação, etapas essas utilizadas nos tratamentos nos dias atuais (5).

Os estudos citogenéticos iniciaram-se em 1958 e alteraram de forma drástica a patofisiologia da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), principalmente com a descoberta do cromossomo Filadélfia por Propp e Lizzi, o significado clínico do número cromossômico modal por Secker-Walker e colaboradores e a translocação cromossomal imuno específica por Williams e colaboradores, mas, foi no início dos anos 1990 com o advento da tecnologia da genética molecular, os estudos do genoma da LLA é que foi possível obter-se a expressão gênica global do perfil dessa doença (5–8).

A figura 1 e as tabelas 1 e 2 apresentam os avanços marcantes na evolução da terapia e compreensão biológica da doença (5).

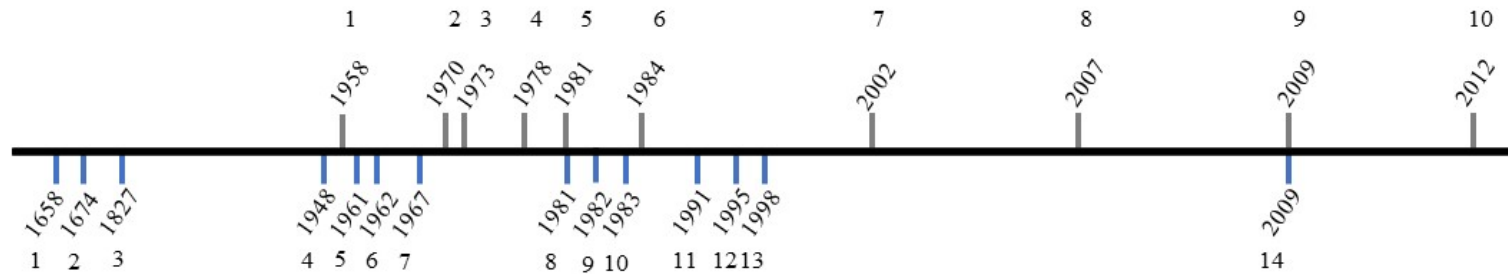


Figura 1. Linha do tempo com os marcos da terapia e biologia da LLA (5)

Tabela 1. Avanços marcantes na evolução da terapia para LLA (5)

N	Ano	Avanços
1	1658	Jan Swammerdam observa as células sanguíneas sob o microscópio pela primeira vez;
2	1674	Anton Van Leeuwenhoek define as hemácias e a corrente sanguínea nos capilares e Joseph Lietaud descobre os leucócitos;
3	1827	Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau publica o primeiro relato de caso e nomeia a doença como Leucemia
4	1948	Remissões transitórias "induzidas por aminopterina;
5	1961	Primeiro estudo publicado descrevendo a remissão completa por meio da combinação da Mercaptopurina e Metotrexato;
6	1962	Cria-se o protocolo de tratamento da Leucemia em quatro etapas;
7	1967	A combinação de quimioterapia e terapia eficaz direcionada ao SNC curam aproximadamente 50% dos pacientes;
8	1981	O tratamento de reindução melhora o resultado;
9	1982	A terapia intratecal tripla com metotrexato, hidrocortisona e citarabina pode efetivamente substituir a profilaxia craniana irradiada em alguns pacientes;
10	1983	A asparaginase em alta dose semanal pós-emissão melhora o resultado e Metotrexato em dose intermediária com resgate de leucovorina diminui as recidivas sistêmicas e testiculares;
11	1991	A dexametasona é mais eficaz do que a prednisona na prevenção de recaídas do sistema nervoso central;
12	1995	Polimorfismos genéticos herdados no gene que codifica a Tiopurina Metiltransferase influenciam a toxicidade da Mercaptopurina;
13	1998	A dose individualizada de metotrexato melhora o resultado;
14	2009	A quimioterapia sistêmica e intratecal eficaz pode eliminar a necessidade de irradiação craniana profilática em todos os pacientes e Imatinibe melhora o resultado do tratamento precoce na LLA positiva para o cromossomo Filadélfia.

Tabela 2. Marcos na compreensão da biologia da LLA (5)

N	Ano	Marcos
1	1958	Primeiro estudo citogenético em ALL;
2	1970	Primeiro relato de LLA positiva para o cromossomo Filadélfia;
3	1973	Primeira identificação de LLA de células T por formação espontânea de roseta com eritrócitos de ovelha;
4	1978	A classificação de LLA pelo número de cromossomos > 50 (hiperdiploidia) está associada à duração prolongada da remissão
5	1981	Monitoramento imunológico de leucemia residual;
6	1984	Primeira identificação de translocações cromossômicas específicas de imunofenótipo: t(11; 14) em LLA de células T e t(1; 19) em LLA pré-B;
7	2002	Primeiro perfil de expressão gênica em todo o genoma;
8	2007	Primeiro estudo de todo o genoma de mudanças no número de cópias de DNA;
9	2009	Variantes genéticas da linha germinativa associadas ao desenvolvimento de LLA;
10	2012	Primeiro estudo de sequenciamento de genoma completo para identificar mutações condutoras no precursor de células T precursoras ALL.

1.1.2 Classificação e Epidemiologia

Em 2016, a LLA foi classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com a Sociedade de Hematopatologia e a Associação Europeia de Hematopatologia. Essa classificação (tabela 3) incorporou dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares e as LLA puderam ser diferenciadas, principalmente em LLA de células B, LLA de células T e ambíguas (9). Essa nova classificação, conjuntamente com pesquisas recentes, permitiram a elaboração de protocolos de estratificação de risco e tratamento diferenciado, de acordo com as alterações genéticas encontradas e o risco de recaída, permitindo maior chance de sucesso no tratamento (10–12).

Não existe um limite mínimo requerido de blastos para estabelecer o diagnóstico da LLA e, em geral, o mesmo deve ser descartado quando houver menos que 20% de linfoblastos (11,12).

Tabela 3. Classificação da OMS de neoplasias linfóides precursoras (11)

Classificação da OMS	Anormalidade genética associada
Leucemia / linfoma linfoblástico B, sem outra especificação	Arranjos clonais de DJ do gene IGH@ rearranjos do gene TCR em até 70%
Leucemia / linfoma linfoblástico B com genética recorrente anormalidades	
Com t(9;22)(q34;q11.2);BCR-ABL 1 Com t(v;11q23); MLL rearranjado	t(9;22)(q34;q11.2). BCR-ABL1 O gene MLL no cromossomo 11q23 rearranjado. Na maioria das vezes t(4; 11) (q21; q23) com MLL-MLLT2
Com t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1 Com hiperploídia	ETV6 – RUNX1 codifica uma proteína de fusão que interfere na função RUNX1 normal. Aumento numérico nos cromossomos 21, X, 14 e 4 mais comuns; em 1, 2 e 3 menos comum
Com hiperploídia Com t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH@ Com t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1 Leucemia / linfoma linfoblástico T	Perda de um ou mais cromossomos A desregulação de IL3 pela proximidade de IGH@ causa eosinofilia Fusão TCF3-PBX1 Rearranjos de genes TCR em praticamente todos; Reorganização do gene IGH@ em 20%

Segundo a Sociedade Americana de Câncer, as estimativas de incidência e mortalidade para LLA (crianças e adultos inclusos) são, respectivamente: 6.150 novos casos (3.470 em homens e 2680 em mulheres) e 1.520 mortes (860 em homens e 660 em mulheres) em 2020 (13). No Reino Unido, em 2017, a incidência de casos foi de 781 (330 em homens e 451 em mulheres) e a mortalidade foi de 232 (136 em homens e 96 em mulheres) (14,15).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, no triênio de 2020/2022, espera-se uma incidência de 5.920 casos em homens e 4.890 casos em mulheres (16).

1.1.3 Patofisiologia da LLA

O desenvolvimento da leucemia envolve uma transformação que ocorre em uma única célula progenitora com capacidade de expansão clonal indefinida. Esse evento leucemogênico pode ocorrer em células linfoides comprometidas tanto da linhagem B como a T, ou nas células precursoras, originando diferentes subtipos de LLA baseado no estágio de diferenciação da célula em que ocorreu o evento (17).

As alterações moleculares necessárias para o desenvolvimento da LLA são fenômenos raros e uma única alteração genética dificilmente será suficiente para o desenvolvimento de um tumor maligno, significando que apenas 1% das pessoas poderão desenvolver uma malignidade hematológica, ou seja, uma mutação em um gene crítico para a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células progenitoras. No caso da leucemia linfóide aguda, essa alteração acontece na célula-tronco que sofre uma mutação inicial disseminando a doença (18,19).

A maioria das mutações nas leucemias são adquiridas e ocorrem *de novo* nas células progenitoras linfoides, com menos frequência (1% a 5% das leucemias), os genes mutados são herdados, como por exemplo, o vgr, p53, DNA ligase, ou uma anormalidade cromossomal pode estar envolvida, como por exemplo, a trissomia do cromossomo 21 (18,20).

Um exemplo de alteração relativamente rara, mas que pode acometer as crianças, é a presença do cromossomo Filadélfia (figura 2), que é uma translocação recíproca entre o braço longo do cromossomo 9 (q34), no qual o oncogene ABL1 permanece, e o braço longo do cromossomo 22 (q11), onde se localiza o gene BCR, origina uma proteína quimérica denominada BCR-ABL, produzindo a tirosina quinase Bcr-Abl, enzima constitutivamente ativa, responsável pela forma aguda e crônica da leucemia (18,21,22).

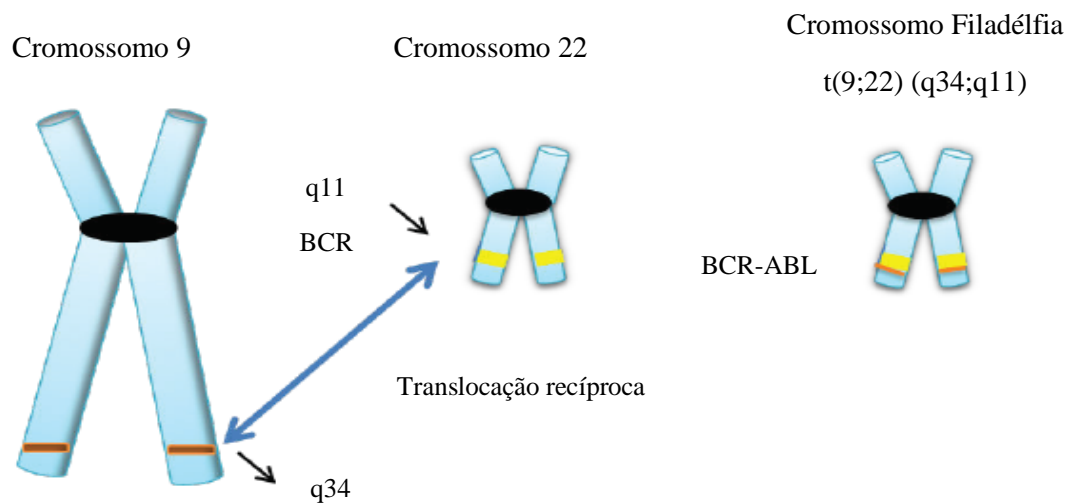


Figura 2. Translocação do cromossomo Filadélfia (translocação entre os cromossomos 9 e 22) (22)

1.1.4 Aspectos Gerais da LLA

A LLA é decorrente da proliferação clonal maligna de células progenitoras linfoides que sofrem alteração no processo de reprodução e crescimento, levando ao acúmulo de um clone neoplásico (linfoblastos) na medula óssea (23–26). Esse clone leucêmico pode ainda sair da medula óssea e infiltrar diversos órgãos, como fígado, baço, linfonodos, rins e cérebro, causando um mal funcionamento do organismo, e seu diagnóstico só pode ser realizado, quando se tem um quantitativo de um milhão de células leucêmicas no organismo identificadas e quantificadas por meio da avaliação microscópica de amostra da medula óssea e avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo (23–27). Mesmo com origem incerta, estudos indicam que a etiologia pode decorrer de infecção viral, exposição à radiação ionizante e/ou eletromagnética, exposição química ou anomalias genéticas que ocorrem devido aos efeitos carcinogênicos (26,28–30).

A LLA é o principal tipo de neoplasia hematológica infantil, correspondendo a um quarto de todos os cânceres em crianças. Apresenta uma incidência de 41:1,000,000 na faixa etária acima dos 14 anos com um pico entre 2 a 7 anos (31–33). A LLA pode ocorrer em 20% dos adultos, sendo o risco reduzido até meados dos 20 anos e aumentado significativamente após os 50 anos (30,34).

1.1.5 Tratamento da LLA

O tratamento da LLA é feito conforme estratificação do grupo de risco definido pelas características clínicas e laboratoriais. Após esse tratamento espera-se que cerca de 85% dos pacientes atinjam a remissão total das células malignas. Por se basear em um tratamento poliquimioterápico, tem-se como alvo as etapas do ciclo celular. O tratamento consiste de quatro fases (figura 3) (33,35–38):

a) **Indução da remissão:** uma fase de consolidação (intensificação) da remissão, que tem por objetivo restaurar a hematopoiese normal com desaparecimento de toda a sintomatologia clínica associada. Nessa fase estão inclusos os seguintes medicamentos indutores da remissão: Vincristina (corticóide), Antraciclinas e Asparaginase. Caso essa etapa falhe, realiza-se o transplante da medula óssea alógena para induzir a remissão;

b) **Consolidação:** fase indicada para erradicar as células leucêmicas residuais e nessa fase inclui as Ciclofosfamidas, Citarabina, 6-Mercaptopurina e altas doses de Metotrexato;

c) **Intensificação:** nesta etapa, utiliza-se a Vincristina, Corticosteróides, Antraciclinas e Citarabinas combinadas com outra Tiopurina como a 6-Tioguanina;

d) **Continuação ou manutenção da remissão,** caracterizada pela manutenção do tratamento que pode durar por dois ou três anos, buscando impedir a recaída e aqui o paciente utiliza 6-Mercaptopurina diariamente e doses semanais de Metotrexato, ambas, via oral.

As purinas possuem um subgrupo denominado de Tiopurinas, que são pró-drogas cujo mecanismo de ação ocorre no interior das células. Estes fármacos possuem estrutura química semelhante à adenosina ou à guanosina (figura 4) com ação citotóxica. Além de serem utilizados no tratamento da LLA, desempenham um papel importante no tratamento de outras neoplasias hematológicas, atuando como inibidores da síntese e reparação do DNA, provocando quebras no DNA e induzindo a apoptose (39). Podem atuar também como antimetabólitos ao competirem com nucleósdeos endógenos, durante a síntese do DNA e RNA, e como inibidores de enzimas celulares importantes (40). Dentro desse

subgrupo se destacam: a Mercaptopurina, Azatioprina (AZA) e Tioguaninas. Estas drogas apresentam atividades anticancerígenas, sendo amplamente utilizadas nas leucemias agudas e crônicas, doenças inflamatórias intestinas (DII) e imunossupressoras pós-transplantes (41–45).

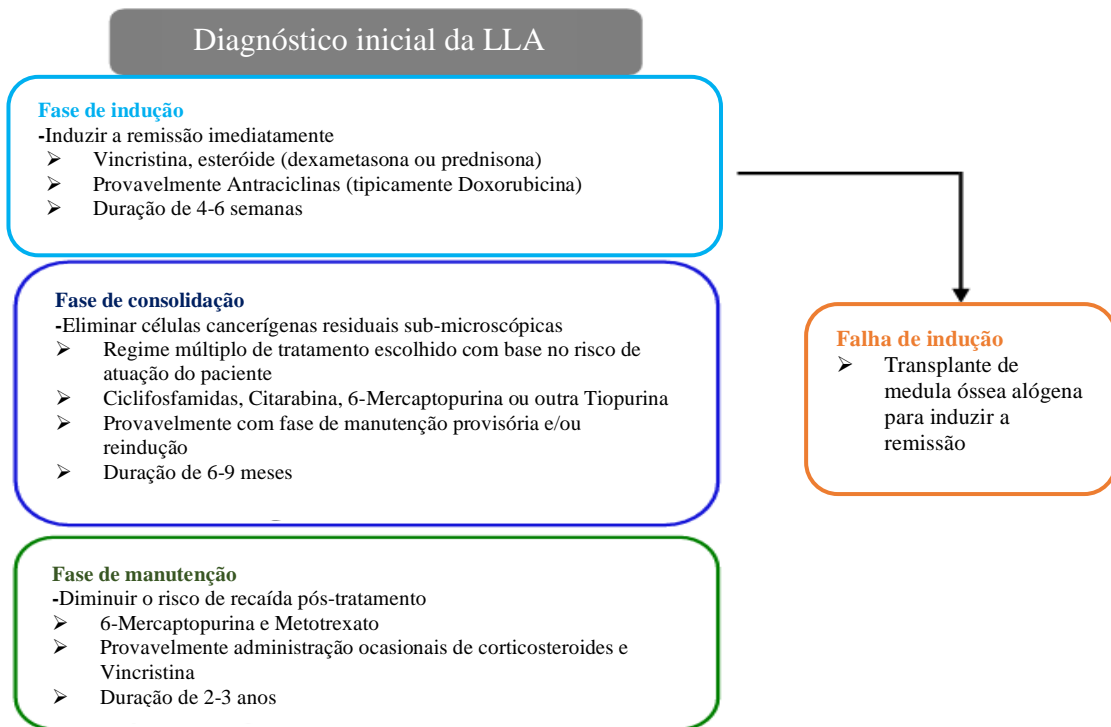


Figura 3. Diagrama das fases de tratamento da LLA
Fonte: Rudin e colaboradores (37)

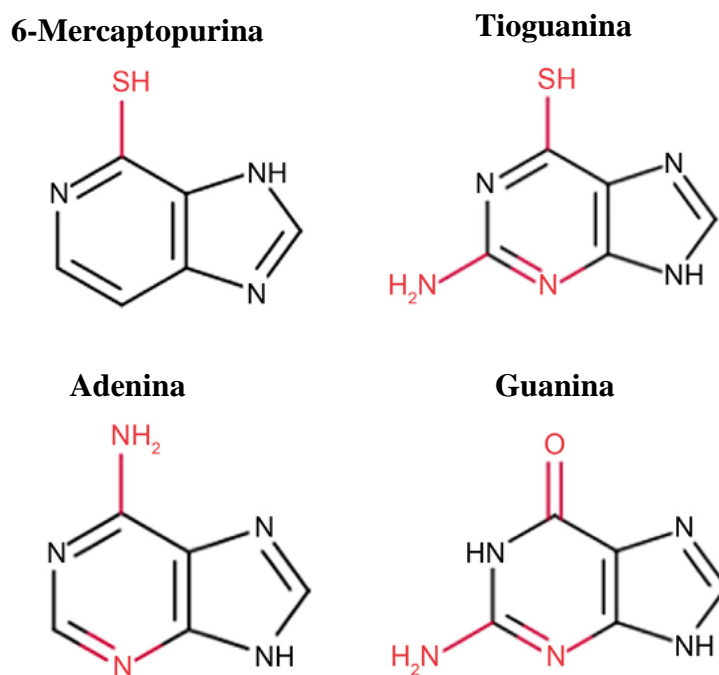


Figura 4. Estrutura da 6-Mercaptopurina e Tioguanina em comparação com Adenina e Guanina. Tiopurinas são metabolizadas em nucleotídeos de Tioguanina que substituem os nucleotídeos normais de Adenina e Guanina, levando à citotoxicidade nas células tratadas com essas drogas. As principais diferenças entre cada molécula são mostradas em vermelho. Fonte: Rudin e colaboradores (37)

1.2 Farmacogenética das Tiopurinas

A farmacogenética da tiopurinas ocorre de forma intracelular e geralmente converte as drogas em metabólitos que são mais hidrossolúveis, com o objetivo de facilitar a excreção (figura 5). Contudo, o organismo também consegue realizar a metabolização das pró-drogas em compostos terapêuticos ativos ou também em metabólitos tóxicos, a exemplo dos nucleotídeos de Tioguanina (TGN), metabólitos das Tiopurinas que apresentam efeito citotóxico (46,47) (figura 4).

Não obstante, esses metabólitos são incorporados no ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) causando a inibição da síntese de nucleotídeos e proteínas e, um acúmulo exacerbado dos mesmos, pode resultar em uma toxicidade tipificada por leucopenia (48).

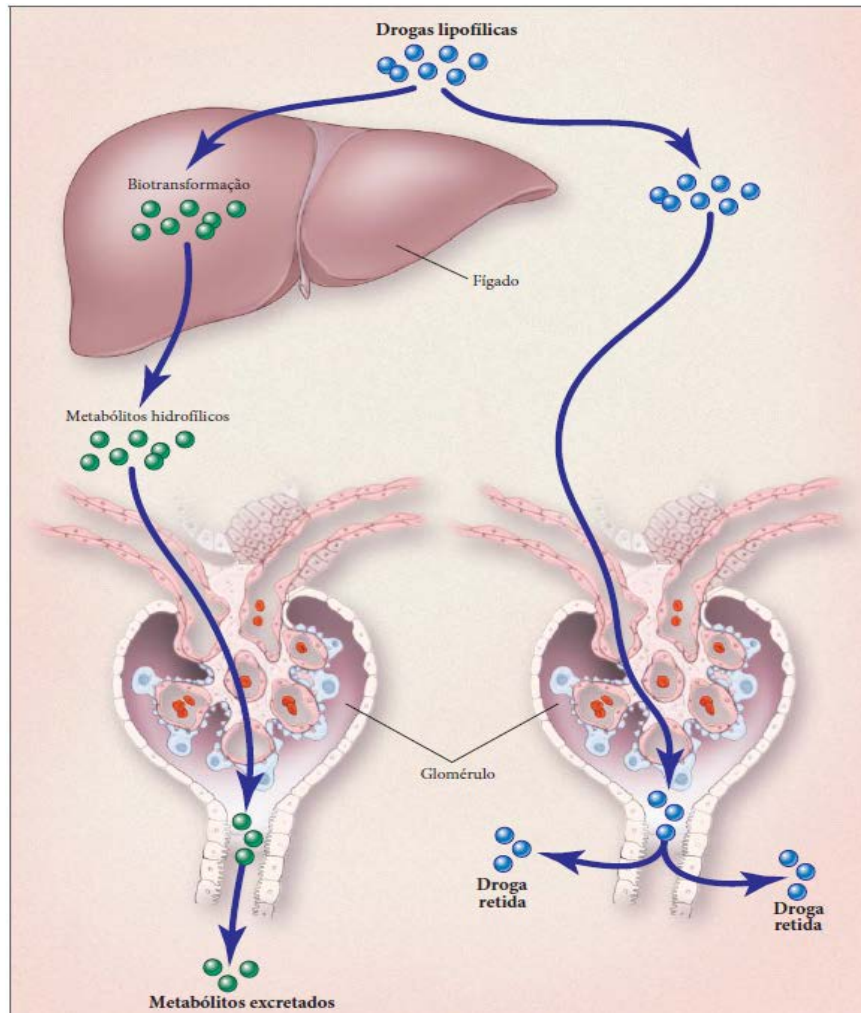


Figura 5. Efeito do metabolismo de drogas na excreção. As drogas lipofílicas (ou solúveis em gordura) são metabolizadas para formar metabólitos relativamente mais hidrofílicos (ou solúveis em água) do que a droga original, sendo esses metabólitos mais facilmente excretados. Fonte: Weinshilboum (46)

A farmacogenética das Tiopurinas, em especial AZA e Tioguanina, envolve três vias enzimáticas concorrentes (figura 6): a) Uma das vias metabólicas é a tiometilação, catalisada pela enzima Tiopurina Metiltransferase (TPMT), que origina um metabólito inativo denominado 6-metilMercaptopurina (6 MMP); b) outra via é a catalisação intracelular da AZA pela enzima Hipoxantina-Guanina Fosforibosil Transferase (HGPRT), com a formação do Monofosfato de 6-Tioinosina (TIMP), que é metabolizado pela TPMT formando o Monofosfato de Metiltioinosina (MeTIMP), um metabólito ativo. O 6-TIMP também é catabolizado pela Trifosfato de Inosina Pirofosfo-hidrolase (ITPASE) originando o Trifosfato de Tioinosina (6-TITP), um metabólito inativo. Ao sofrer a ação da Monofosfato de Inosina Desidrogenase (IMPDH), origina o metabólito Monofosfato de 6-Tioxantina (6-TXMP), que é metabolizado pela enzima Monofosfato de Guanosina Sintetase, originando o Monofosfato de 6-Tioguanina (6-TGMP). O 6-TGMP é catabolizado por três enzimas: a TPMT, que gera o Monofosfato de Metil-Tioguanina (MeTGMP), um metabólito inativo, a HGPRT, que o cataboliza em 6-Tioguanina (6-TG), um metabólito ativo, e, por fim, a fosfoquinase, que o cataboliza em nucleotídeos de Tioguanina, um metabólito ativo e tóxico; c) Outra via metabólica é a Xantina Oxidase (XO), que inicia com o metabolismo que ocorre no fígado e na mucosa intestinal que transforma a 6-MP em ácido tioúrico, um metabólito inativo (46,47,49,50).

Para a 6-Mercaptopurina (6-MP) (figura 7), o metabolismo que resulta nos metabólitos de nucleotídeos de Tiopurina assim como metil-mercaptopurina e os nucleotídeos de metil-tioguanina envolve uma série de enzimas. A 6-MP é convertida em seus metabólitos ativos, nucleotídeos de mercaptopurina, por meio da Hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), estes metabólitos são coletivamente denominados de 6-TGN. Os 6-TGN são então metilados pela TPMT produzindo assim os metil-nucleotídeos de Tioguanina (Metil-TGN), que interferem com a síntese de DNA e RNA ocasionando a citotoxicidade. A TPMT também pode metilar diretamente a 6-MP convertendo-a em metilmercaptopurina (Metil-MP) a qual interfere, *de novo*, na síntese de purina (37,51-53).

A NUDT15 tem o seu papel no metabolismo das Tiopurinas ao atuar na catabolização intracelular do metabólito ativo Trifosfato de Tioguanosina (TGTP) em sua forma, também ativa, de Monofosfato de Tioguanosina (TGMP), impedindo assim a integração de nucleotídeos danificados de purina no DNA e a consequente desforilação desses metabólitos ativos, pois, estudos laboratoriais demonstraram dano excessivo ao

DNA e subsequente supressão da medula óssea pelo TGTP em pacientes com deficiência de NUDT15 (44,54,55).

A toxicidade por Tiopurina pode ser influenciada também por um polimorfismo hereditário nos genes da TPMT e NUDT15 (56). Esses polimorfismos genéticos representam um dos exemplos da farmacogenômica mais relevante clinicamente. Fatores genéticos como a causa de variações em resposta das drogas tem sido cada vez mais observados (46). Assim, a LLA é um modelo importante de estudo da farmacogenética, pois a partir da determinação de polimorfismos de genes associados a proteínas é possível realizar o ajuste de doses, processo, atualmente baseado em guias genéticos específicos (57).

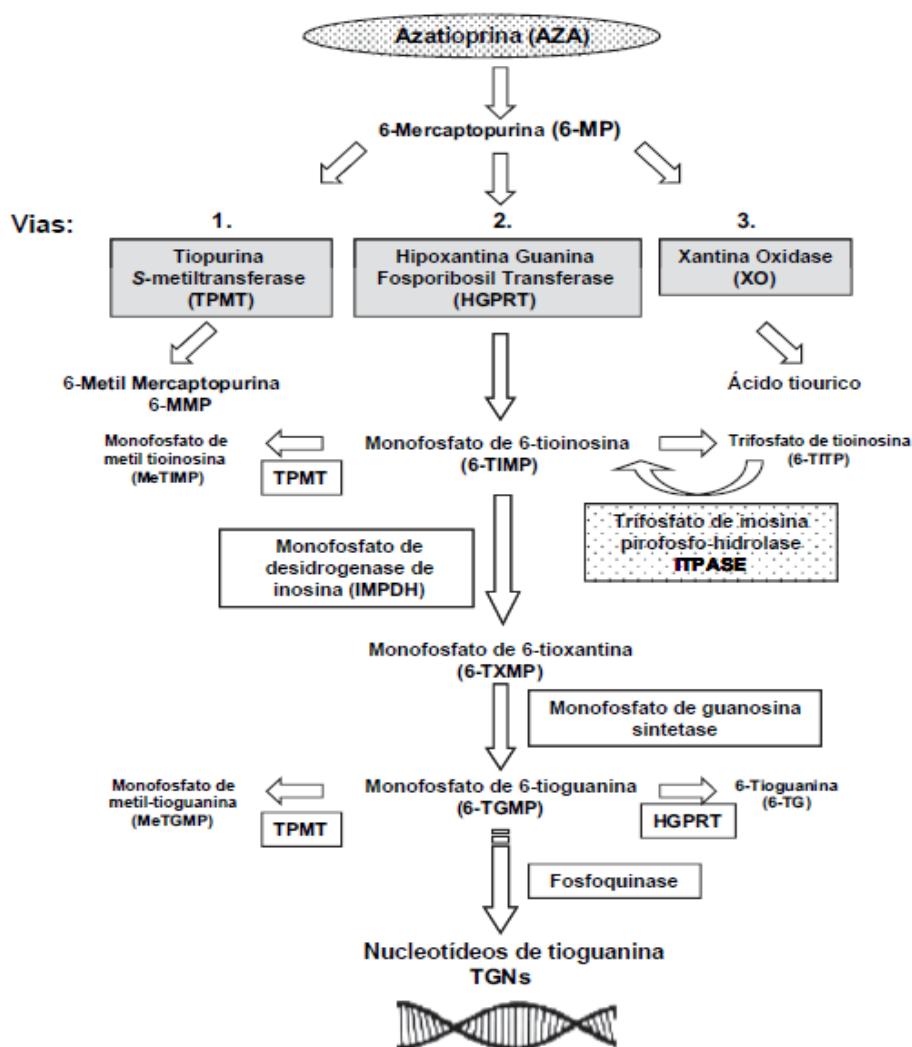


Figura 6: Metabolismo da Azatioprina. As três vias enzimáticas concorrentes para o metabolismo da 6-Mercaptopurina (6-MP) são destacadas em cinza. Via 1: Tiopurina S-metiltransferase (TPMT) metila 6-MP em 6-metil-Mercaptopurina (6-MMP). Via 2: Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) é a primeira de uma cascata de enzimas que convertem 6-MP em nucleotídeos de Tioguanina (TGNs). Via 3: A Xantina Oxidase (XO) converte 6-MP em ácido tiourico. Fonte: Ford (47).

Eichelbaum e colaboradores (2006) e Metzger e colaboradores (2006) observaram que mais de 95% das deficiências nos pacientes são decorrentes de 5 variantes alélicas, sendo para a TPMT as variantes alélicas: TPMT*2 (rs1800462), TPMT*3A (a junção do *3B e *3C), TPMT*3B (rs1800460) e TPMT*3C (rs1142345), e para a NUDT15 as variantes *2 e *3 (58,59).

Em um estudo realizado por Lennard e colaboradores (1990) em uma coorte de pacientes com LLA que estavam em terapia de manutenção, observaram-se manifestações clínicas compatíveis com o quadro de toxicidade induzida por Tiopurinas, sendo assim possível realizar a correlação entre as atividades metabólicas e o perfil de metabolização de cada paciente. Os que apresentaram alelos homozigóticos recessivos foram os mais suscetíveis a desenvolverem quadro de intoxicação e mielossupressão induzida por Tiopurinas sendo necessária a redução individual das doses dos medicamentos (60,61).

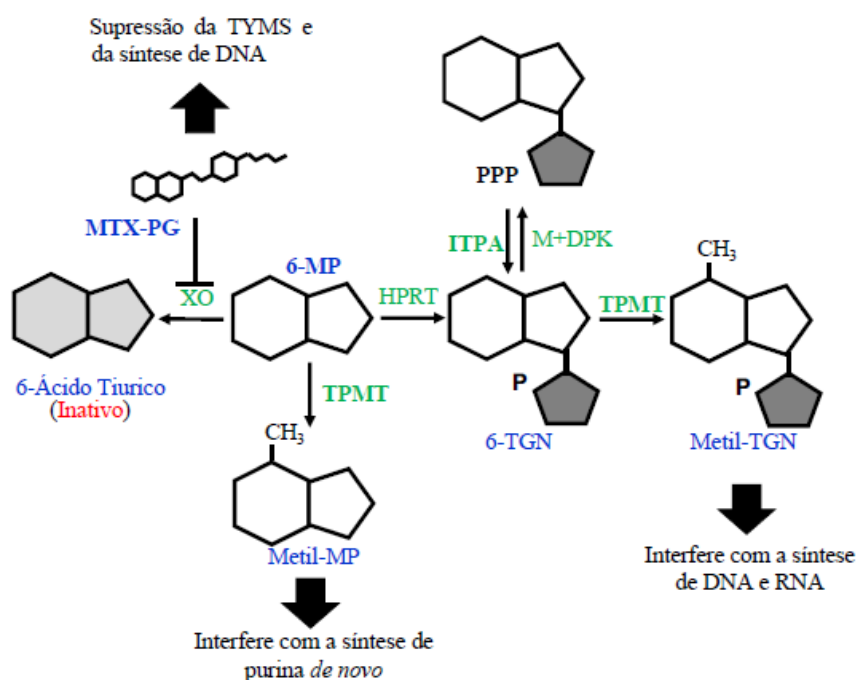


Figura 7: Metabolismo da 6-MP. 6-MP é convertida pela HPRT em 6-TGNs, que são metilados pela TPMT. Metil-TGNs bloqueiam a síntese de DNA e RNA. 6-MP também é metilada diretamente pela TPMT, produzindo metilmercaptopurina (Metil-MP). O MTX-PG bloqueia a conversão da 6-MP em seu metabólito inativo ácido tiúrico. (MTX-PG, poliglutamato de metotrexato; 6-MP, 6-mercaptopurina; TGN, nucleotídeo tioguanina; TPMT, tiopurina metiltransferase; ITPA, inosina trifosfatase; TYMS timidilato sintetase; HPRT, hipoxantina fosforibosil transferase; DPK, difosfato quinase; XO, xantina oxidase.) Fonte: Rudin (37).

1.3 Tiopurina Metiltransferase (TPMT)

As drogas Tiopurinas, AZA e Mercaptopurina são eficazes no tratamento de distúrbios da regulação imune e LLA, além de apresentarem papel importante como coimunomodulador. As diferenças interindividuais no acúmulo de metabólitos ativos durante o tratamento com Tiopurinas são consideradas determinantes significativos da toxicidade hematopoiética e dos efeitos antileucêmicos da droga (Figura 8).

A TPMT é uma enzima citosólica importante, cujo traço de hereditariedade é monogênico, autossômico e codominante, catalisa a S-metilação das Tiopurinas, como 6-MP, 6-TGN e AZA (62). Até o momento, 34 variantes alélicas da TPMT (tabela 4) foram identificadas e estão relacionadas a diferentes graus de atividade da enzima (tabela 5) (43,62). A tabela 5 resume a atribuição dos prováveis fenótipos de TPMT, com base nos diplótipos alélico mais comuns, e essas atribuições são usadas para vincular genótipos com recomendações de prescrição de Tiopurina (62).

Tabela 4: Genótipos que constituem os alelos TPMT. Fonte: www.pharmgkb.org.

Alelo	Mudanças de nucleotídeos	Mudança de aminoácido
*1	Selvagem	-
*1S	A ¹⁸¹ >G no rs2842934	Ile ¹⁵⁸ Ile
*2	C ²³⁸ >G no rs1800462	Ala ⁸⁰ Pro
*3A	C ⁴⁶⁰ >T no rs1800460 e T ⁷¹⁹ >C no rs1142345	Ala ¹⁵⁴ Tre e Tir ²⁴⁰ Cis
*3B	C ⁴⁶⁰ >T no rs1800460	Ala ¹⁵⁴ Tre
*3C	T ⁷¹⁹ >C no rs1142345	Tre ²⁴⁰ Cis
*4	C ⁶²⁶ >T no rs1800584	-
*5	A ¹⁴⁶ >G no rs72552740	Leu ⁴⁹ Ser
*6	T ⁵³⁹ >A no rs75543815	Tir ¹⁸⁰ Fen
*7	A ⁶⁸¹ >C no rs72552736	His ²²⁷ Gln
*8	C ⁶⁴⁴ >T no rs56161402	Arg ²¹⁵ His
*9	T ³⁵⁶ >G no rs151149760	Lis ¹¹⁹ Tri
*10	C ⁴⁶⁰ >G no rs72552737	Gli ¹⁴⁴ Arg
*11	C ³⁹⁵ >T no rs72552738	Cis ¹³² Tir
*12	G ³⁷⁴ >A no rs200220210	Ser ¹²⁵ Leu
*13	T ⁸³ >A no rs72552742	Gli ²⁸ Val
*14	T ¹ >C no rs9333569	Met ¹ Val
*15	C ⁴⁹⁵ >T no rs9333570	Perda dos aminoácidos de 140 a 165
*16	C ⁴⁸⁸ >T no rs144041067	Arg ¹⁶³ His
*17	G ¹²⁴ >C (NM_000367)	Gln ⁴² Gli
*18	C ²¹¹ >T no rs777686348	Gli ⁷¹ Arg
*19	T ³⁶⁵ >G (NM_000367)	Lis ¹²² Tri
*20	T ⁷¹² >C no rs150900439	Lis ²³⁸ Gli
*21	G ²⁰⁵ >C no rs200591577	Gli ³⁶ Ser
*22	C ⁴⁸⁸ >G (NM_000367)	Leu ⁶⁹ val
*23	G ⁵⁰⁰ >C no rs74423290	Arg ¹⁶³ Pro
*24	C ⁵³⁷ >A no rs6921269	Gln ¹⁷⁹ His
*25	A ⁶³⁴ >G no rs377085266	Cis ²¹² Arg
*26	A ⁶²² >G no rs72556347	Fen ²⁰⁸ Leu
*27	A ³¹⁹ >C (NM_000367)	Tir ¹⁰⁷ Asp
*28	C ³⁴⁹ >G(NM_000367)	Gli ³⁶ Ser
*29	A ² >G no rs267607275	Met ¹ Tre
*30	C ¹⁰⁶ >T no rs750424422	Gli ³⁶ Ser
*31	A ⁶¹¹ >G no rs79901429	Ile ²⁰⁴ Tre

Consulta periódica se faz necessária para a atualização dos alelos e a nomenclatura, dos alelos de TPMT e da nomenclatura. Nomenclatura conforme determinado pelo comitê de nomenclatura da TPMT (www.imh.liu.se/tpmtalleles). Os nomes dos alelos entre parênteses representam o antigo sistema de nomes. Observe que essas alterações de base são relatadas na cadeia cromossômica positiva para obter consistência com os outros alelos nesta tabela, enquanto a sequência de referência NM_000367.2 está na outra cadeia (os alelos são invertidos).

Tabela 5: Atribuição de prováveis fenótipos de TPMT com base em genótipos (adaptado de Relling et al (35)).

Fenótipo provável	Genótipos	Exemplos de diplótipos
Metabolizador normal	indivíduo portador de alelos de função normal	*1/*1
Metabolizador intermediário	indivíduo portador de um alelo de função normal, mais um alelo de sem função	*1/*2, *1/*3A, *1/*3B, *1/*3C, *1/*4
Possível metabolizador intermediário	indivíduo portador de um alelo de função incerta / desconhecida mais um alelo sem função	*2/*8, *3A/*7
Metabolizador pobre	indivíduo carregando dois alelos sem função	*3A/*3A, *2/*3A, *3A/*3C, *3C/*4, *2/*3C, *3A/*4
Indeterminado	indivíduo portador de dois alelos de função desconhecida	*6/*8
	ou alelo de função normal, mais alelo de função desconhecida	*1/*8

Sendo as variantes alélicas *2, *3A, *3B e *3C as de principais interesse nesse estudo, elas podem estar associadas ao metabolismo intermediário, em um paciente que apresente traço heterozigótico, ou ao metabolismo pobre em pacientes que apresentem traços homozigótico mutante nos dois alelos. Logo, indivíduos com atividade pobre de TPMT em uso de doses padrões de AZA ou 6-MP apresentam mielossupressão aguda grave, geralmente apresentando leucopenia dentro de alguns dias ou mesmo de 1 a 2 meses, após início do tratamento e esse quadro é detectado clinicamente por meio do acompanhamento quase diário do hemograma e alguns pacientes apresentam uma neutropenia de instalação rápida e acentuada sem nenhuma causa aparente. Em heterozigotos, a deficiência de TPMT está associada ao desenvolvimento de mielossupressão leve a moderada, contudo efeitos adversos adicionais, a exemplo de náuseas podem estar presentes, isso porque os pacientes com um metabolismo mais rápido terão o tratamento não terá resposta e uma consequente interrupção do tratamento (63) (Figura 9).

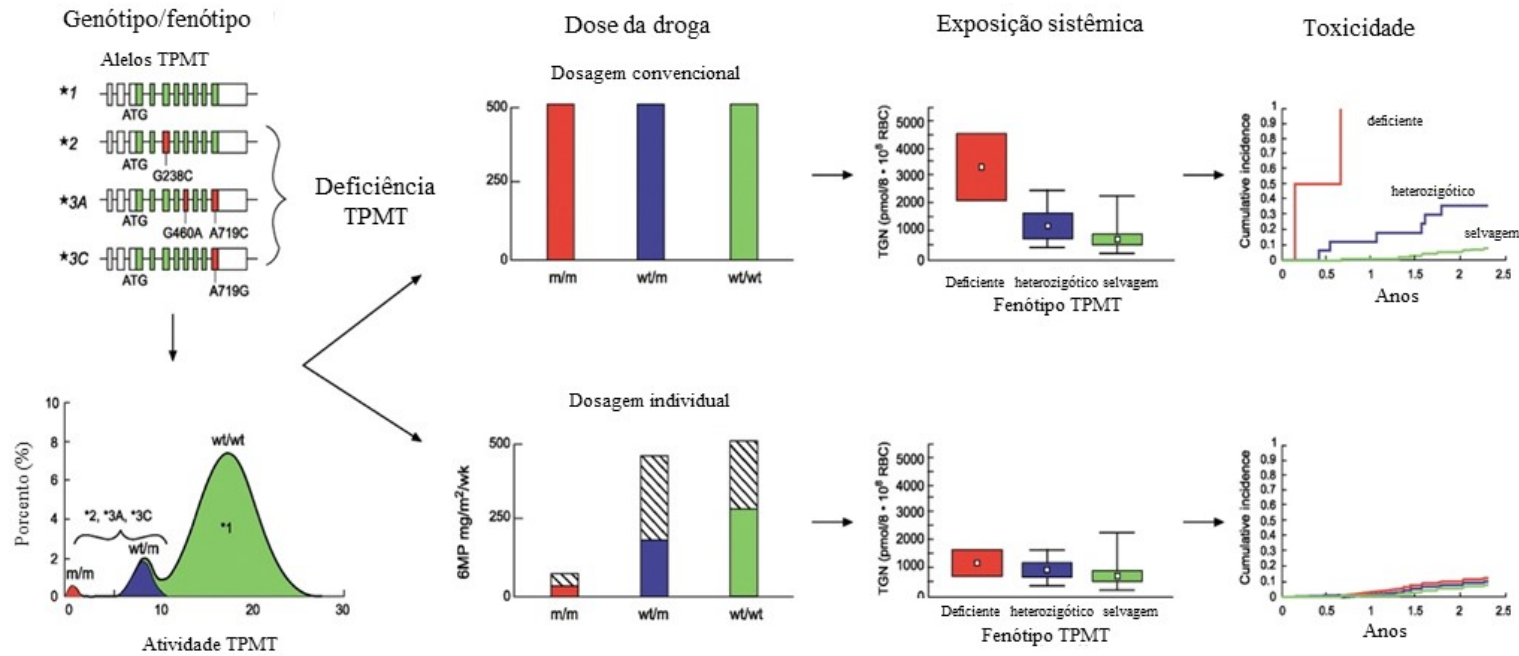


Figura 8: Polimorfismo genético da Tiopurina S-metiltransferase (TPMT) e seu papel na determinação da resposta as Tiopurina (Azatioprina, Mercaptopurina, Tioguanina). Os painéis da esquerda mostram os alelos mutantes predominantes da TPMT. Os três painéis superiores adjacentes mostram que quando dosagens uniformes (convencionais) de medicamentos para Tiopurina são administrados a todos os pacientes, os pacientes com deficiência de TPMT acumulam concentrações celulares dez vezes mais altas de nucleotídeos de Tioguanina (TGN) e pacientes heterozigotos acumulam cerca de duas vezes mais TGN. Essas diferenças se traduzem em uma frequência de toxicidade significativamente mais alta (painéis da direita). Os três painéis inferiores mostram que quando é usada uma dose genótipo específica (as barras coloridas representam doses de Mercaptopurina (6-MP) que foram toleradas em pacientes que apresentaram toxicidade hematopoiética) concentrações similares de TGN são alcançadas e todos os três fenótipos de TPMT podem ser tratados sem toxicidade aguda Fonte: Eichelbaum et al (63).

Respaldo nessas diferentes atividades de TPMT e nos diferentes graus de efeitos adversos e adicionais, Relling e colaboradores (62) propõem estratégias para o tratamento dos pacientes com AZA e 6-MP em indivíduos com diferentes fenótipos, conforme mostrado na figura 7. A caracterização dos indivíduos deve ser feita por meio de testes genéticos para os polimorfismos da TPMT e, uma vez identificado o genótipo, realiza-se a tradução dos alelos-estrelas nos fenótipos metabolizadores e, com base nisso, as doses iniciais altas (por exemplo, 75 mg/m^2 de Mercaptopurina), como ocorre em alguns regimes de tratamento com LLA, devem ser reduzidas em pacientes com metabolizadores intermediários da TPMT e doses marcadamente reduzidas (redução de 10 vezes) devem ser usadas em metabolizadores fracos da TPMT. Essa abordagem diminuiu o risco de toxicidade aguda sem comprometendo a taxa de recaída em LLA, mesmo nessas doses marcadamente reduzidas. As concentrações de TGN dos eritrócitos nos metabolizadores fracos da TPMT permanecem bem acima daquelas tolerado e alcançado pela maioria dos pacientes (62).

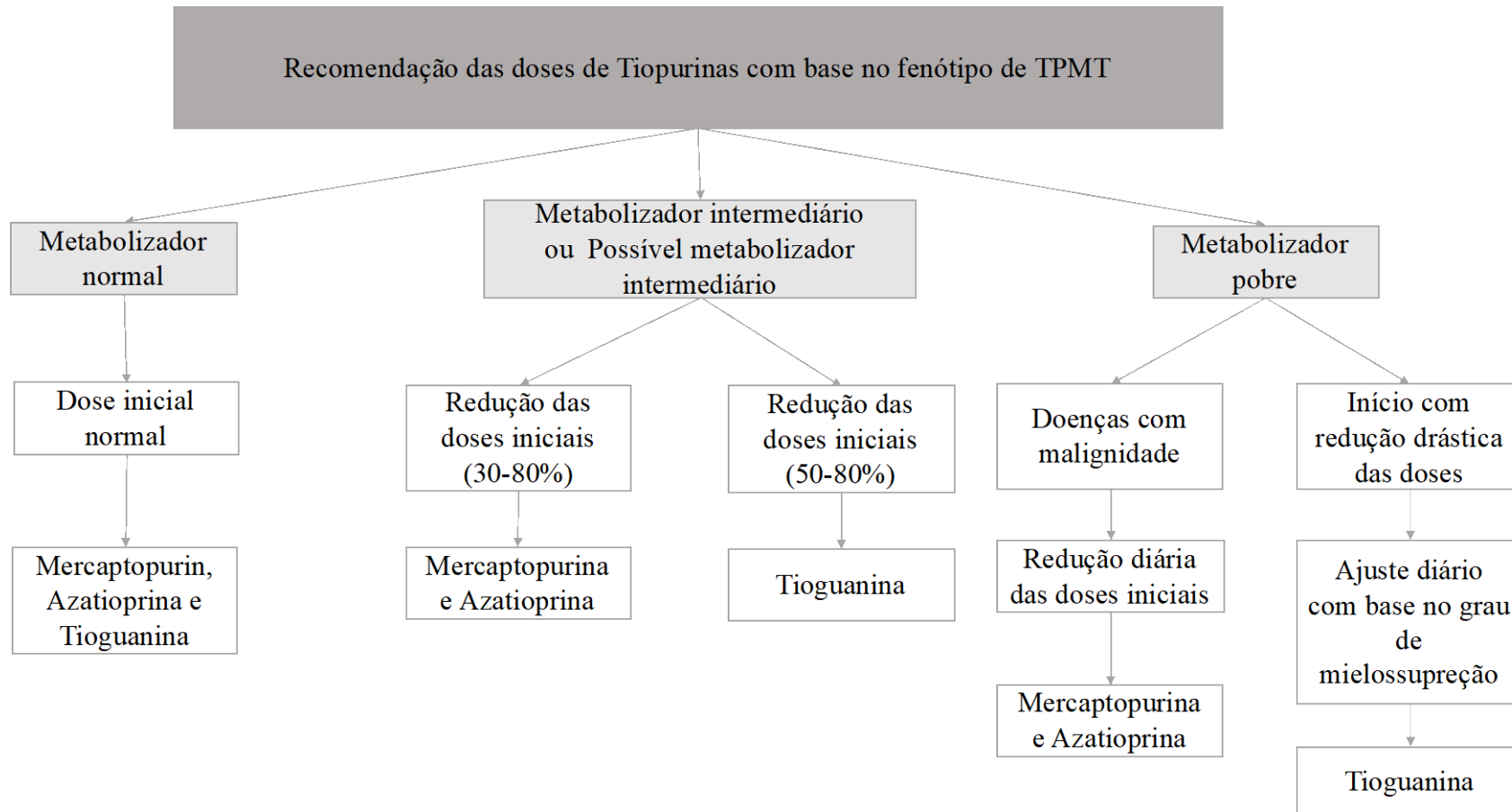


Figura 9: Recomendação das doses de Tiopurinas com base nos fenótipos de TPMT. Adaptado de Relling e colaboradores (62)

O polimorfismo genético da TPMT é evidente em todas as populações, incluindo caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos (Tabela 6). Nessas populações, a frequência de indivíduos sem mutação no alelo TPMT (WT/WT) foi de 97,83%. Em relação ao alelo *2 houve variações entre 0,19% (Caucasianos) e 0,8% (Sul americanos). Já o alelo *3A, entre 0,01% (asiáticos) e 3,56% (Caucasianos), *3B, entre 0,046% (Caucasianos) e 0,7% (Mexicanos) e *3C entre 0,4 (Caucasianos) e 4,9 (Africanos). (Tabela 3). A frequência e o padrão dos alelos mutantes diferem de acordo com a etnia (43,58,64–66). Os alelos mutantes mais prevalentes são TPMT*2, *3A e *3C, compreendendo 80% a 95% dos alelos mutantes encontrados em caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos. O TPMT*3A é o mais prevalente dos três alelos entre os caucasianos (64,67).

Tabela 6: Frequências de alelos de TPMT nas principais raças / grupos étnicos. Adaptado de Relling e colaboradores (68)

Alelo	Caucasiano	Mediterrâneo	Sul americano	Africano	Oriente Médio	Mexicano	Asiático	Sudoeste asiático
*1	0.95726	0.96081	0.95233	0.93901	0.96987	0.92500	0.98347	0.97837
*2	0.00190	0.00408	0.00876	0.000792	0.00749	0.00592	0	0.00250
*3A	0.0356	0.0254	0.0287	0.00198	0.0114	0.0533	0.000118	0.00583
*3B	0.000461	0.00426	0.000486	0	0.00562	0.00690	0	0
*3C	0.004205	0.00545	0.00924	0.0495	0.00562	0.00888	0.0157	0.0133
*4-*26	0.0000576 (*7) 0.0002304 (*9) 0.0000576 (*11) 0.0000576 (*12) 0.0000576 (*16) 0.0000576 (*17) 0.0000576 (*18)	N/A	0.000486 (*4)	0.00872 (*8)	N/A	N/A	0.000706 (*6)	N/A

1.4 Proteína Nucleosídeo Difosfatase ligada a uma parte modificada 15 (NUDT15)

A proteína NUDT15 faz parte de uma grande família de proteínas fosfatases que compartilham de um domínio catalítico comum denominado Nucleosídeo Difosfatase ligado a uma parte X (NUDIX), e tem a função a função de metabolizar ampla gama de substratos de nucleotídeos (55) dentre os quais um específico denominado purina difosfatase (44). Originalmente foi classificada como uma pirofosfatase, grupo de enzimas que catabolizam a hidrólise de ligações difosfatos, especialmente nos nucleosídeos di- e tri-fosfatases, liberando mono- ou difosfatos. Na realidade, é uma proteína difosfatase cuja principal função é realizar a catabolização intracelular do TGTP em TGMP, como citado anteriormente na farmacogenética das Tiopurinas (44,54,55).

O genoma humano possui 24 genes NUDT hidrolase e mais de 5 pseudogenes, os quais codificam mais de uma variante de NUDT. A tabela 7 apresenta os genes que foram, até então, parcialmente caracterizados. Alguns deles representam atividades enzimáticas conhecidas há muitos anos, embora suas estruturas primárias e relações familiares permaneçam desconhecidos até recentemente. Outros são inteiramente novos. A expressão de 17 dos 19 genes NUDT estudados é fortemente induzida na entrada em fase estacionária do metabolismo, o que sugere um possível envolvimento na reprogramação metabólica (14,15). Além disso, vários estudos de mutagênese direcionada destacaram a importância de resíduos individuais NUDIX para a catálise (48,57). Dependendo dos polimorfismos, prováveis fenótipos podem ser determinados, conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 7. Caracterização de NUDT conhecidas. Adaptado de Sandersons et. al. (69)

Gene	Localização	Sinônimo	Substratos	Produtos
NUDT1	7p22	MTH1	8-oxo-dGTP	8-oxo-dGMP+PPi
NUDT2	9p13	APAH1	Ap ₄ A	ATP+ AMP
NUDT3	6p21	DIPP1	Ap ₆ A[PP]InsP ₅	P5A+AMP, Insp ₆ +Pi
NUDT4	1p12-p21	DIPP2A,B	[PP] InsP ₅	Insp ₆ +Pi
NUDT5	10p13-p14	hYSAI	ADP-ribose	AMp+ ribose -1-fosfato
NUDT6	4q26-q27	GFG	?	?
NUDT7A	?	PCD	Coenzima A	3',5'- ADP+ 4'-fosfo- panteine
NUDT15	13q14.2	MTH2	8-oxo-dGTP	?

a- Caracterizada somente em ratos

Tabela 8. Atribuição de prováveis fenótipos NUDT15 baseados em genótipos. Fonte: Relling et al (35).

Fenótipo provável	Genótipos	Exemplos de diplótipos
Metabolizador normal	indivíduo carregando dois alelos de função normal	*1/*1
Metabolizador intermediário	indivíduo portador de um alelo de função normal, mais um alelo de função não	*1/*2, *1/*3
Possível metabolizador intermediário	um indivíduo portador de um alelo de função incerta mais um alelo de função não	*2/*5, *3/*6
Metabolizador pobre	um indivíduo carregando dois alelos sem função	*2/*2, *2/*3, *3/*3
Indeterminado	um alelo de função normal, mais um alelo de função incerta	*1/*4, *1/*5
	ou dois alelos de função incerta	*4/*5, *5/*6

O SNP de NUDT15 denominado de rs116855232 (ou c.415C>T) leva a substituição na posição 139 do aminoácido Arginina por uma Cisteína (p.Arg¹³⁹→Cis), ocasionando um decréscimo de função ou anulação total dessa proteína (18). Esse

polimorfismo está fortemente associado tanto a leucopenia induzida por Tioguanina como por toxicidade induzida, ambas podem ser causadas pelo estresse oxidativo, resultando assim em apoptose das células progenitoras da medula óssea. Esse polimorfismo foi o primeiro associado com a toxicidade em asiáticos e latino-americanos, sendo a causa primária de intoxicação. Estudos realizados por Zhang e colaboradores (70) e Yin e colaboradores (70), afirmam que pacientes em uso de Tiopurina e portadores do alelo mutante c.415C>T (NUDT15), apresentam um risco 3,79 vezes maior de desenvolver leucopenia e intolerância a Tiopurina (48,62,70,71).

Semelhante ao TPMT, a dosagem tolerada de Mercaptopurina também é correlacionado com o número de alelos não funcionais do gene NUDT15. Contudo ainda existe uma escassez de estudos multiétnicos examinando tanto a TPMT quanto variantes NUDT15. Portanto, Relling e colaboradores (62) recomendam a avaliação dos alelos de NUDT15 paralelos aos do TPMT, incorporando ajuste de dose das Tiopurinas em pacientes com alterações genotípicas. Dessa forma, para metabolizadores normais do NUDT15 (NUDT15 *1/*1), as doses iniciais não precisam ser alteradas, enquanto, para metabolizadores intermediários NUDT15 (por exemplo, NUDT15 *1/*3), devem ser realizadas redução das doses iniciais, com objetivo de minimizar a toxicidade. Para os metabolizadores ruins de NUDT15 (por exemplo, *3/*3), as doses devem ser substancialmente reduzidas ou o uso de um agente alternativo deve ser utilizado (figura 10).

Apesar da variante NUDT15 ser muito comum no leste asiático e em populações hispânicas. No Brasil, seu primeiro relato ocorreu em populações nativas, mais especificamente em indígenas da tribo Guarani e Kaingang, com frequência entre 19.4% a 31.7% (tabela 10). Esta diversidade pode ser devido aos ancestrais indígenas distintos, sua distribuição pela América Latina e a proporção individual do ancestral ameríndio, em especial naqueles que possuem uma alta ancestralidade ameríndia (72).

As alterações genéticas podem ocasionar interrupção do tratamento das LLA, devido a redução das doses iniciais dos medicamentos e em casos mais graves podem ocasionar leucopenia induzida por Tiopurinas. Portanto, faz-se necessário estudos das variações de NUDT15 e TPMT, para uma melhor abordagem dos pacientes, conforme as diretrizes de tratamento. Este estudo, se propôs estudar, portanto, em populações autodeclaradas indígenas na Amazônia Brasileira essas variações.

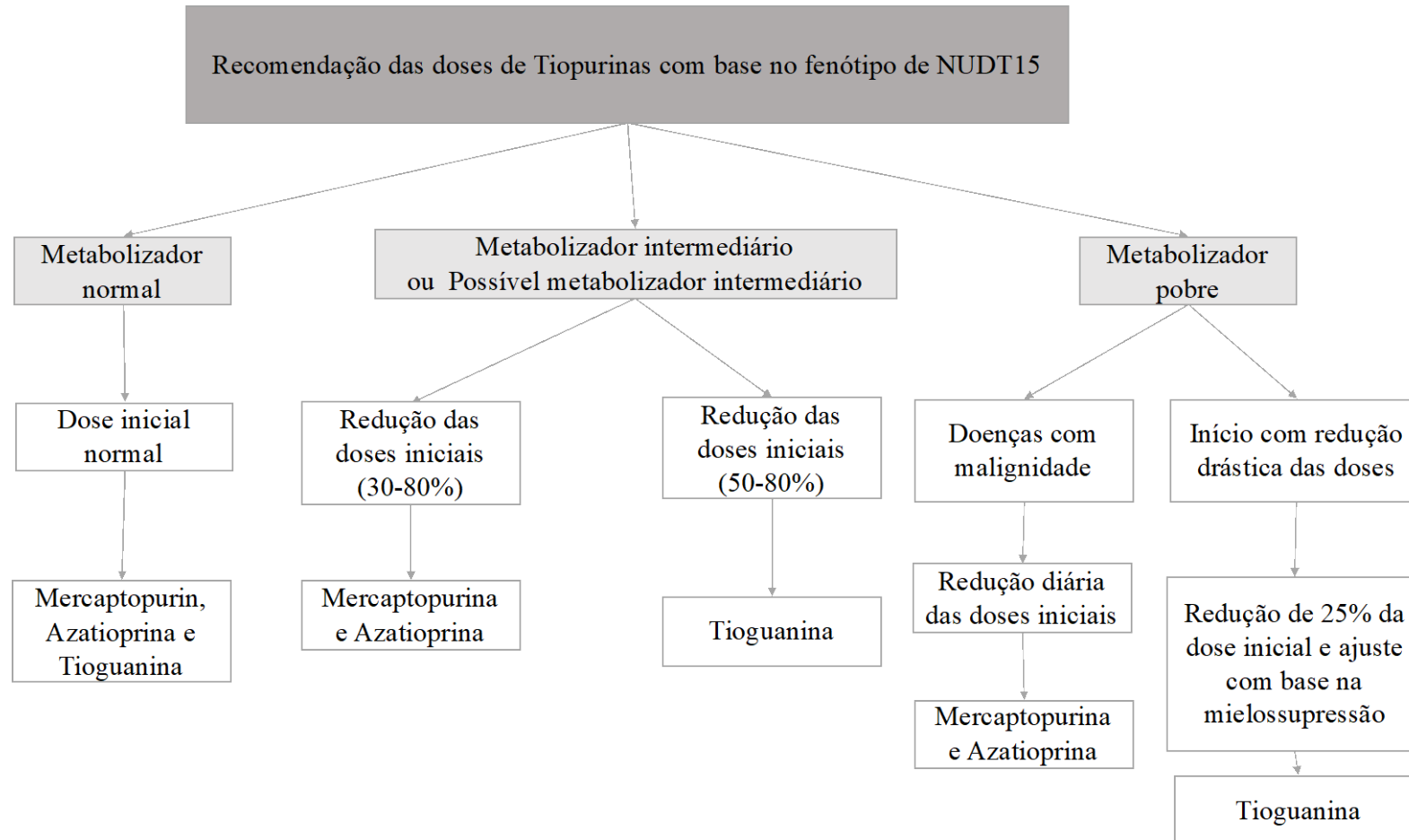


Figura 10: Recomendação das doses de Tiopurinas com base nos fenótipos de NUDT15. Adaptado de Relling e colaboradores (62)

População	Localidades	Coordenadas geográficas	Região	Grupo linguístico	Número de indivíduos	Frequência do genótipo (%)			Frequência do alelo T (IC 95%)
						CC	CT	TT	
Guarani	Amambai	23°S, 55°W	Centro-oeste	Tupi	49	67.3	26.5	6.1	19.4 (12.8–28.3)
	Limão Verde	23°S, 55°W	Centro-oeste						
Kaingang-1	Rio das Cobras	25°S, 52°W	Sul	Gê	60	60.0	28.3	11.7	25.8 (18.9–34.3)
	Ivaí	24°S, 51°W	Sul						
Kaingang-2	Nonoai	27°S, 52°W	Sul	Gê	71	54.9	26.8	18.3	31.7 (24.6–39.7)
Xavante	Pimentel Barbosa	13°S, 51°W	Centro-oeste	Gê	87	89.7	10.3	0	5.2 (2.7–9.5)

IC, intervalo de confiança

Tabela 10. Grupos Ameríndios investigados: localização, linguagem e distribuição do rs116855232 da NUDT15 (c.414C>T)

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar a frequência das principais variantes alélicas do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) e Nudix Hidrolase 15 (NUDT15) influenciados por populações de maior migração

2.2. Específicos

1. Determinar a frequência dos alelos TPMT *2, *3A, *3B e *3C na Amazônia Brasileira;
2. Determinar a frequência dos alelos *2 e *3 de NUDT15 na Amazônia Brasileira

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento

Este estudo de prevalência utilizou amostras biológicas coletadas após assinatura dos termos de consentimento e assentimento no período de 2013 a 2015 do biorepositório do projeto denominado “Inquérito sobre a prevalência da deficiência de G6PD na Amazonônia: resolvendo uma lacuna para a segurança da cura radical da malária pelo *Plasmodium vivax* usando Primaquina”. Este inquérito foi realizado em 43 municípios dos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Rondônia (Figura 10). O tamanho amostral foi definido levando em consideração os seguintes parâmetros:

1. População de cada um dos estados;
2. Estimativa pontual da deficiência de G6PD obtida em estudos preliminares no estado do Amazonas equivalente a 4,5% (30);
3. Precisão de +/- 1,0%;
4. Nível de confiança de 95%;
5. De forma conservadora, decidiu-se aumentar o tamanho amostral, utilizando-se um efeito de desenho de 1,5.

Dessa forma foi estimada uma amostra de 2.473 participantes do sexo masculino em cada estado e amostra total de 14.838 participantes. As amostras foram obtidas através em locais de grande circulação na sede dos municípios.

Inquérito de G6PDd na Amazônia Brasileira

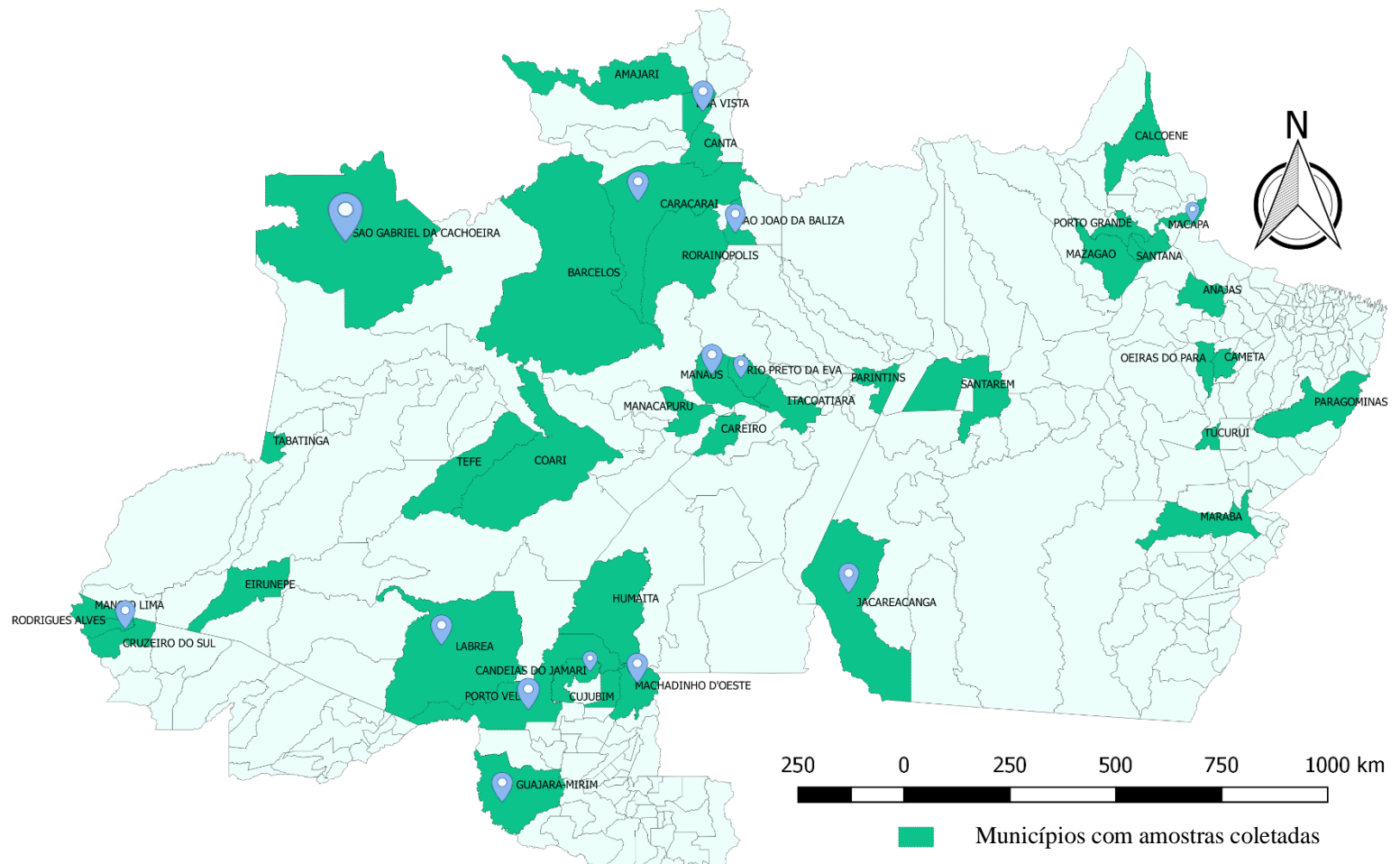


Figura 11: Mapa das cidades onde foi realizado o inquérito sobre a G6PDd na Amazônia Brasileira.

Para a composição do biorepositório, foram coletados 500 microlitros de sangue total em EDTA por punção digital. As amostras encontram-se armazenadas à -20°C no Laboratório Central do Instituto de Pesquisas Clínicas Carlos Borborema (IPCCB), Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Na ocasião, foi feita a coleta dos dados sócio-epidemiológicos em questionário padronizado, onde os participantes autodeclaravam sua raça. Setenta e seis doadores eram auto-declarados indígenas e foram utilizados nesse estudo. Amostra de outros setenta e seis doadores não autodeclarados foram selecionados de forma randômica e incorporados a população de estudo. O pareamento das amostras foi de 1:1 dos seguintes estados: estados: Acre: 2; Amazonas: 76, Amapá: 4, Pará: 26, Rondônia: 38 e Roraima: 6, totalizando assim, 152 amostras.

3.2. Técnicas Laboratoriais

3.2.1 Extração e diluição do DNA

O DNA genômico foi extraído de 200µL de sangue total segundo o protocolo do kit de extração Biopur Kit Extração Mini Cent Centrifugação (Biometrix Diagnóstica Ltda., Curitiba – Paraná – Brasil, em anexo (anexo I). O DNA foi diluído conforme protocolo modificado de Nolan e colaboradores (73) e a concentração final do DNA extraído foi de 100uL

3.2.2 Genotipagem e determinação dos polimorfismos

O protocolo de genotipagem (anexo II) para identificação do polimorfismo foi realizado de acordo o protocolo do fabricante Applied Biosystem. Termociclador 7500 Real Time PCR System (California, USA) para realização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) em tempo real. A tabela 9 apresenta as sondas utilizadas no processo de genotipagem dos polimorfismos. As reações foram realizadas em uma concentração final de 20uL de reação, contendo 10 uL do TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, California, USA), com 1 uL de sonda específica para cada polimorfismo (Applied Biosystems, California, USA) e 9uL de DNA. A ciclagem foi realizada conforme protocolo padronizado no Guia Nacional de Mensuração do Sistema da Reação em Cadeia Quantitativa da Polimerase (qPCR)(73) com os seguintes passos: 1) pré-PCR read: 60°C por 01min; 2) ativação da polimerase: 95°C por 10min, 3) desnaturação: 50 ciclos com 95°C por 15secs, 4) anelamento e extensão: 50 ciclos com 60°C por 01min30secs e 5) Post-PCR Read: 60°C por 01min. Inferimos haplótipos usando o software PHASE 2.1.1 (Stephens et al., 2001; Stephens e Scheet, 2005). Com base nas informações inferidas sobre o haplótipo, extraímos alelos em estrela que correspondiam à tabela de tradução do conjunto de haplótipos da PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>) (WhirlCarrillo et al., 2012). Os genótipos previstos foram traduzidos em fenótipos moleculares com base nas tabelas de tradução de genótipo-fenótipo codificadas de Moriyama et al. (2016) para NUDT15 e das tabelas PharmGKB para TPMT (74).

Tabela 9. Sondas utilizadas no processo de genotipagem para cada polimorfismo

Sondas	Polimorfismo
C_154823200_10	rs116855232 → NUDT15
C____19567_20	rs1142345
C_30634116_20	rs1800460
C_12091552_30	rs1800462

} TPMT

3.2.3 Determinação da Ancestralidade

Para determinação das ascendências Africana/Europeia/Nativa, partimos da lista de 5.000 marcadores altamente informativos para a estimativa de ancestralidade continental em todo o mundo, identificados por Paschou e colaboradores (2010) (75) usando a abordagem de Rosenberg et al. (2003) (76), com base no painel de células CEPH-HGDP. A lista completa desses 5.000 marcadores está em: http://www.cs.rpi.edu/~drinep/HGDPAIMS/WORLD_5000_INFAIMs.txt.

O dado do genótipo disponível para americanos nativos é constituído de 3.848 marcadores dos quais 2.392 foram colocados em produtos subsequentes de chips de esferas da Illumina. Esse subconjunto de marcadores foi retido para a seleção daqueles a serem avaliados, a fim de facilitar a comparação e integração de dados subsequentes. 2.392 marcadores, foram classificados com base nas diferenças de frequência do alelo em amostras de europeus, americanos nativos ou africanos. As proporções individuais de ascendência africana, europeia e americana nativa foram estimadas usando o programa ADMIXTURE usando execuções supervisionadas, onde grupos de referência africanos, europeus e americanos nativos ($K = 3$) foram fornecidos. Execuções não supervisionadas em $K = 3$ produziram estimativas muito semelhantes, confirmando nossa escolha de marcadores informativos sobre ancestralidade e populações parentais. Os erros padrão das estimativas individuais de ancestralidade foram obtidos pelo bootstrap usando os parâmetros padrão do programa (200 execuções de replicação) (75).

3.2.4 Estatística

As frequências de alelos, genótipos e haplótipos foram obtidas por contagem de genes. O teste T foi aplicado para comparar médias individuais de ancestralidade biogeográfica dentro da coorte de estudo. O teste χ^2 foi usado para comparar frequências de alelos, haplótipos e fenótipos, e para avaliar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O nível de significância das análises estatísticas foi estabelecido em $P < 0,05$.

3.3 Aspectos éticos

O estudo encontra-se em conformidade com os padrões éticos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) através do parecer substanciado (CAAE) 625574/2014 e este estudo foi aprovado através da emenda número 93843318.8.0000.0005.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram publicados na revista *Pharmacogenetics and Genomics* com fator de impacto 2.860 presente no link: [Pharmacogenomics of thiopurines: distribution of TPMT and NUDT15 polymorphisms in the Brazilian Amazon - PubMed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32453263/) (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32453263/).

4.1. Artigo

Pharmacogenomics of thiopurines: distribution of *TPMT* and *NUDT15* polymorphisms in the Brazilian Amazon

Guilherme Motta Antunes Ferreira^{a,b}, Anna Beatriz Ribeiro Elias^c, Joabi Nascimento^{a,d}, Wuelton Marcelo Monteiro^{a,d}, Gisely Cardoso Melo^{a,d}, Djane Clarys Baia-da-Silva^{a,d}, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda^{a,d,e} and Guilherme Suarez-Kurtz^c

Reduced function alleles in the *TPMT* and *NUDT15* genes are risk factors for thiopurine toxicity. This study evaluated the influence of Native ancestry on the distribution of *TPMT* (rs1142345, rs1800460 and rs1800462) and *NUDT15* (rs116855232) polymorphisms and compound metabolic phenotypes in 128 healthy males from the Brazilian Amazon. The average proportion of Native and European ancestry differed greatly and significantly between self-declared Amerindians and non-Amerindians, although extensive admixture in both groups was evident. Native ancestry was not significantly associated with the frequency distribution of the *TPMT* or *NUDT15* polymorphisms investigated. The apparent discrepancy with our previous results for *NUDT15* rs116855232 in the Ad Mixed American superpopulation of the 1000 Genomes Project is ascribed to the diversity of the Native populations of the Americas. Based on the inferred

TPMT/NUDT15 compound metabolic phenotypes, the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium recommendations for starting thiopurine therapy with reduced doses or to consider dose reduction applied respectively to 3–5% and to 12–20% of the study cohorts. *Pharmacogenetics and Genomics* XXX: 000–000 Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Pharmacogenetics and Genomics 2020, XXX:000–000

Keywords: Brazilian Amazon, native ancestry, *NUDT15*, thiopurines, *TPMT*

^aUniversidade do Estado do Amazonas, ^bFundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, ^cCoordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, ^dFundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado and ^eInstituto Leônidas & Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Brazil

Correspondence to Guilherme Suarez-Kurtz, MD, PhD, Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro RJ 20231, Brazil
Tel: +55 21 3207 6552; e-mail: kurtz@inca.gov.br

Received 16 March 2020 Accepted 27 April 2020

Introduction

Population diversity impacts pharmacogenetics/pharmacogenomics (PGx) research and clinical implementation. Although most common genetic markers are shared across populations [1] there are large population differences in some key PGx variants which have major influence on drug responses [2]. A remarkable example of consequences of PGx diversity across populations is the severe, life-threatening toxicity of carbamazepine in carriers of the *HLA-B*15:02* haplotype. This haplotype displays high frequency in some Asian populations, but is absent or quite rare in Africans and Europeans [3]. A similar frequency distribution was recently described for another important PGx marker, namely *NUDT15* c.415C>T (rs116855232; p.R139C), linked to the cytotoxicity of thiopurines. The minor c.415T allele, which associates with a dramatic loss of *NUDT15* function, is most common in East Asians but rare in Europeans and Africans [4,5]. In Latin American populations, who share European, African and Native American (Amerindian) ancestral roots, the minor allele frequency (MAF) of rs116855232

varies considerably, ranging from 0.5% in Puerto Ricans to 11.8% in Peruvians represented in the Admixed-American super-population (AMR) of the 1000 Genomes Project (1KG). The MAF of rs116855232 increases in parallel with the individual proportion of Native ancestry in the 1KG-AMR [6] and Amerindian groups living in reservation areas in the South Region of Brazil displayed the highest (26–32%) MAF at rs116855232 so far reported for any population worldwide [7].

The present study examines the distribution of rs116855232 SNP in the Brazilian Amazon, where nearly 250 000 self-declared Native/Amerindians (*Indígena*, in the terminology of the Brazilian Census) live, and admixture with people of European and African ancestry is extensive outside reservation areas [8–10]. We analyzed available DNA samples from a large survey of the prevalence of glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the Brazilian Amazon to explore the influence of Native ancestry on the distribution of the *NUDT15* rs116855232 SNP in the region for the first time. The study cohort was also genotyped for commonly reported *TPMT* polymorphisms because both *NUDT15* and *TPMT* are the major PGx determinants of thiopurine cytotoxicity, and the updated Clinical Pharmacogenetics

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website, www.pharmacogeneticsandgenomics.com.

1744-6872 Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved

DOI:10.1097/FPC.0000000000000411

Implementation Consortium (CPIC) guideline for thio-purine dosing is based on the combined *NUDT15* and *TPMT* metabolic phenotypes [11].

Methods

This study was conducted in accordance with the revised Declaration of Helsinki and the rules of Good Clinical Practice (ICH-GCP). The study procedures were approved by the local Human Research Ethics Committee (CEP/FMT-HVD number 3.889.719/2020) and all adult participants or a parent or guardian of the enrolled minors provided written informed consent and/or assent, before specimens were collected from 14 438 male inhabitants of urban areas from 43 localities within the Brazilian Amazon

Study population

The study cohort consisted of 128 unrelated males (125 adults and three minors aged 10, 16 and 17 years old) self-identified according to the Brazilian census as Amerindian ($n = 67$), White ($n = 29$) or Brown (*Pardo* in the terminology of the Brazilian Census, $n = 32$), recruited in 22 out of the 43 localities within the Brazilian Amazon (Supplementary Table 1, Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/B373>). The term non-Amerindian will be used to refer to the combined White and Brown individuals. A panel of ancestry informative markers validated for the Brazilian population [12] and the Structure software [13] were used to estimate the individual proportions of Native, European and African ancestry in all participants.

TPMT and *NUDT15* haplotypes and metabolic phenotypes

Taqman assays were employed for allele discrimination of *NUDT15* rs11685232 and the *TPMT* SNPs rs1800462 (c.238G>C), rs1800460 (c.460G>A) and rs1142345 (c.719A>G), which identify the *TPMT**2, *3A, *3B and *3C haplotypes [11]. The wild-type haplotype (*1) was attributed to each gene by default. *TPMT*, *NUDT15* and combined (i.e. *TPMT* plus *NUDT15*) metabolic phenotypes were inferred from the individual haplotypes according to the CPIC [11] and the Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium [5].

Statistical analyses

Allele, genotype and haplotype frequencies were derived by gene counting. The *t*-test was applied to compare individual proportions of biogeographical ancestry within the study cohort. The χ^2 test was used to compare allele, haplotype and phenotype frequencies, and to assess deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The level of significance of statistical analyses was set at $P < 0.05$.

Results

Biogeographical ancestry

The estimated biogeographical ancestry of self-declared Amerindians and non-Amerindians is plotted in Fig. 1

and summarized in Table 1. The proportions of Native and European ancestry, but not African ancestry, differed greatly and significantly ($P < 0.0001$) between Amerindians and non-Amerindians. Nevertheless, extensive admixture in both these groups is evident in the plots. A third of self-declared Amerindians had >50% non-Native, mainly European ancestry, whereas one-fourth of self-declared non-Amerindians had >50% Native ancestry. Thus, for the purpose of exploring the influence of Native ancestry on the distribution of *NUDT15* and *TPMT* polymorphisms, we devised two subcohorts, comprising individuals with either >70% Native ancestry (denoted NAT subcohort, $n = 59$) or <25% Native ancestry (non-NAT subcohort, $n = 51$). Eight individuals of the NAT subcohort (14%) self-identified as White, whereas 7 individuals of the non-NAT subcohort (14%) were self-declared Amerindians. The average individual proportion of Native ancestry in NAT (0.92; Table 1) was nearly 12-fold greater than in non-NAT (0.08), which suggests to us that comparative data from the two cohorts may be used to investigate the association of Native ancestry with the frequency distribution of *NUDT15* and *TPMT* polymorphisms and metabolic phenotypes in the Brazilian Amazon.

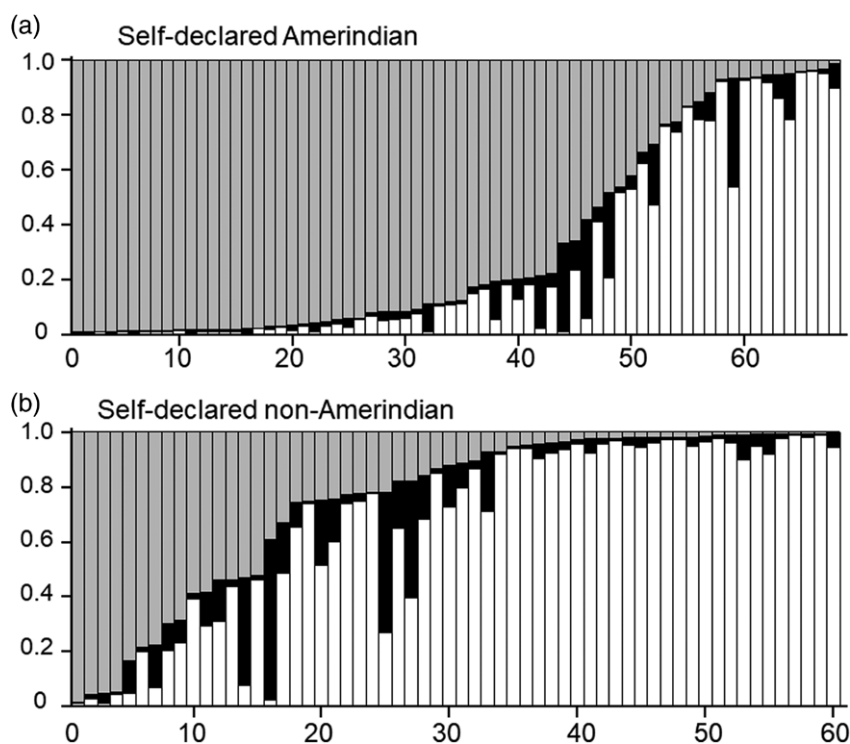
Distribution of *NUDT15* and *TPMT* polymorphisms and metabolic phenotypes

Genotype frequencies of the interrogated loci did not deviate significantly from HWE proportions in the overall cohort, among self-reported Amerindians and non-Amerindians. Allele discrimination of the *NUDT15* and *TPMT* SNPs is summarized in Table 2. For comparison, the frequency of these SNPs in other Brazilian cohorts and in populations included in the 1000 Genomes (1KG) Project and the Genome Aggregation database (Exac/gnomAD) are listed in Supplementary Table 2, Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/B374>.

The *NUDT15* rs11685232 SNP showed a MAF of 5.5% in the overall cohort, with no significant difference between self-reported Amerindians (6.0%) versus non-Amerindians (4.9%) or between the NAT (7.7%) and <non-NAT (4.2%) subcohorts. Of note, homozygosity for the rs11685232 variant allele (TT genotype) was detected in only one individual, who self-identified as White, with estimated ancestral proportions of 0.94 European, 0.05 Native and 0.01 African.

Regarding *TPMT* polymorphisms, the rs1800462 SNP, which defines the *TPMT**2 haplotype was not detected, while rs1142345 and rs1800460 showed MAF frequencies of 4.3 and 5.9%, respectively, in the overall study cohort, with no variant homozygotes. The MAF of rs1142345 and rs1800460, and the frequency distribution of *TPMT* inferred haplotypes (*1, *3A, *3B and *3C) did not differ significantly between self-declared Amerindians versus non-Amerindians nor between NAT versus non-NAT subcohorts (Table 2).

Fig. 1



Assignment of self-declared Amerindians ($n = 67$) and non-Amerindians ($n = 61$) to genetic clusters using the program STRUCTURE v.1.3.0. Each individual is represented by a vertical line, which is partitioned in three segments corresponding to the estimated membership proportion in the Native (gray), European (white) and African (black) clusters.

Table 1 Biogeographical ancestry

Study group	n	Proportion of biogeographical ancestry ^a		
		Native	African	European
Amerindian	67	0.68 (0.520±0.847)	0.05 (0.039 ± 0.064)	0.26 (0.201±0.328)
Non-Amerindian	61	0.25 (0.173±0.325)	0.09 (0.055 ± 0.116)	0.67 (0.580±0.750)
NAT subcohort	55	0.92 (0.884±0.930)	0.03 (0.021 ± 0.045)	0.06 (0.043±0.077)
Non-NAT subcohort	59	0.08 (0.061±0.102)	0.07 (0.043 ± 0.096)	0.85 (0.810±0.888)

^aData expressed as mean (95% CI).

The distribution of combined *NUDT15* and *TPMT* haplotypes and assigned metabolic phenotypes is shown in Table 3. For this analysis, the *TPMT**3A-C haplotypes were merged. Four individuals (three from the NAT and one from the non-NAT subcohorts) were compound heterozygotes, that is, heterozygous for both genes (*NUDT15**1/*2 and *TPMT**1/*3) and were assigned the poor metabolizer phenotype [6,11]. χ^2 tests revealed no significant difference in the distribution of compound *NUDT15* and *TPMT* phenotypes between Amerindians versus non-Amerindians nor between NAT versus non-NAT subcohorts.

The compound metabolic phenotypes and the CPIC guideline recommendations for thiopurine dosing were used to construct the plots in Fig. 2, which show that: (1)

drastic reductions of thiopurine dose applies to 3–5% of individuals, who are poor metabolizers of either or both *NUDT15* and *TPMT*, or have the compound intermediate phenotype; (2) consider thiopurine dose reduction applies to 12–20% of individuals with the intermediate phenotype with respect to either *NUDT15* and *TPMT*, and normal metabolizer phenotype for the other enzyme; (3) use of standard thiopurine doses applies to 75–85% of individuals, who are normal metabolizers of both *NUDT15* and *TPMT*.

Discussion

PGx studies of Amazonian populations, especially self-declared Amerindians are scarce [14–16] and, to our knowledge, have not explored *NUDT15* polymorphisms

Table 2 Distribution of *NUDT15* and *TPMT* variants

Cohort	N	NUDT15			TPMT		
		rs116855232	rs1142345	rs1800460	*3A	*3B	*3C
Overall	128	5.5 (3.3–8.9)	4.3 (2.4–7.5)	5.9 (3.6–9.4)	3.5 (1.9–6.5)	2.3 (1.1–5.0)	0.8 (0.2–2.8)
Amerindians	67	6.0 (3.0–11.3)	3.0 (1.1–7.4)	6.0 (3.0–11.3)	3.0 (1.1–7.4)	3.0 (1.1–7.4)	0
Non-Amerindians	61	4.9 (2.3–10.3)	5.7 (2.8–11.4)	4.1 (1.8–9.2)	3.3 (1.3–8.1)	1.6 (0.4–5.8)	1.6 (0.4–5.8)
NAT subcohort	55	7.7 (3.9–14.4)	4.8 (2.1–10.8)	7.7 (3.9–14.4)	3.9 (1.5–9.5)	3.9 (1.5–9.5)	1.0 (0.2–5.2)
Non-NAT subcohort	59	4.2 (1.8–9.5)	3.4 (1.3–8.4)	4.2 (1.8–9.5)	2.5 (0.9–7.2)	1.7 (0.6–4.0)	0.9 (0.1–4.6)

Data expressed as mean percentage (95% CI).

Table 3 Distribution of compound *NUDT15* and *TPMT* polymorphisms and metabolic phenotypes

		NUDT15			NUDT15					
		wt/wt	wt/var	var/var	wt/wt	wt/var	var/var			
<i>TPMT</i>	Amerindian	wt/wt	53	6	0	non-Amerindian	wt/wt	49	2	1
		wt/var	6	2	0	<i>TPMT</i>	wt/wt	49	2	1
		var/var	0	0	0		wt/var	7	2	0
							var/var	0	0	0
		NUDT15			NUDT15					
		wt/wt	wt/var	var/var	wt/wt	wt/var	var/var			
<i>TPMT</i>	NAT	wt/wt	41	5	0	non-NAT	wt/wt	50	2	1
		wt/var	6	3	0	<i>TPMT</i>	wt/wt	50	2	1
		var/var	0	0	0		wt/var	5	1	0
							var/var	0	0	0

For this analysis, all variant *TPMT* alleles were combined. wt refers to *1 for both genes; var = *TPMT**2, *3A, *3B or *3C, and *NUDT15*rs116855232T allele. Combined intermediate metabolizers are shown in italics and light gray shade. Combined poor metabolizers are in bold and dark gray shade.

or combined *TPMT/NUDT15* metabolic phenotypes. Our study recruited self-reported Amerindian and non-Amerindian males, from 22 different municipalities within the Brazilian Amazon, including São Gabriel da Cachoeira, which has the largest Amerindian population of Brazil (https://indigenas.ibge.gov.br/images/indigenas/estudos/indigena_censo2010.pdf).

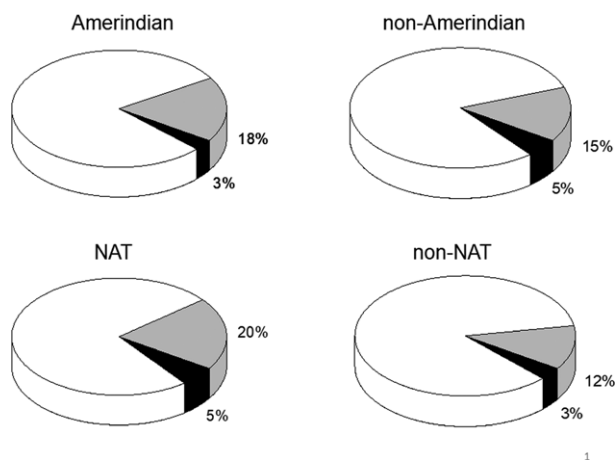
Importantly, no study participant was living in Indigenous reservations areas, which may account for the considerable admixture of Native, European and to a considerably lesser extent, African ancestry in the overall cohort. Indeed, several self-reported Amerindians had >50% European ancestry, and conversely, Native ancestry was predominant in a number of self-declared non-Amerindians. These observations are consistent with evidence that individual proportions of the major parental ancestries among Brazilians vary widely within each race/color category of the Brazilian Census, as a consequence of five centuries of extensive admixture [10,17].

Recognition of this fact led us to devise two subcohorts differing largely (12-fold) in Native ancestry, to explore the impact of this ancestral root on the distribution of *NUDT15* and *TPMT* genetic polymorphisms and metabolic phenotypes in the Brazilian Amazon. The results showed no statistically significant difference in frequency of *TPMT* SNPs and haplotypes or the MAF of *NUDT15* rs116855232 between the NAT and non-NAT subcohorts, nor between self-reported Amerindians versus non-Amerindians. These findings suggest that Native ancestry does not impact the distribution of the interrogated *TPMT* and

NUDT15 SNPs in the study cohort. Similar findings were reported for the 1KG-AMR superpopulation with respect to *TPMT*, that is, no difference in frequency of polymorphisms between individuals with >70% Native ancestry versus >70% European ancestry [6].

However, the present results are in apparent discrepancy with the 1KG-AMR with respect to the *NUDT15* rs116855232 SNP: we report here a nominal, but NS difference, in MAF between NAT (7.7%) and <non-NAT (4.2%), whereas a large, and highly significant difference was observed between 1KG-AMR with >70% Native ancestry (MAF = 13.1%) versus >70% European ancestry (rs116855232 absent) [6]. This quantitative discrepancy cannot be explained by the extent of Native ancestry, since both analyses compared subcohorts with >70% versus <30% Native ancestry. A more likely explanation lies in the diversity of Native populations, which prevails throughout the Americas. For example, the Brazilian Census of 2010 identified 305 distinct Amerindian ethnicities, speaking 274 languages (<https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/20506-indigenas.html>), whereas the two major Native groups in Peru, namely Quechua and Aimara, are virtually absent in Brazil. Large differences in frequency of PGx variants in different Amerindian groups are not uncommon [18,19], such as a six-fold range in MAF (5.2–31.7%) of *NUDT15* rs116855232 among Amerindians living in reservation areas in different regions of Brazil [6]. The rich diversity of Native American populations, should caution against extrapolation of PGx data across Latin American peoples,

Fig. 2



Distribution of the CPIC recommendations of adjustment in thiopurine starting dose, according to the compound TPMT and NUDT15 metabolic phenotypes. The plots correspond to the self-declared Amerindians, non-Amerindians, NAT and non-NAT subcohorts. The colors in the plots correspond to the CPIC recommendations of 'Use standard dose' (white), 'Consider dose reduction' (gray) and 'Dose reduction recommended' (black). The percentages for the dose adjustment recommendations are indicated. CPIC, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium.

in view of their distinct Native American ancestors and variable individual proportions of Amerindian ancestry. Larger studies with Amerindian population from more isolated communities are needed.

The distribution of the inferred TPMT and NUDT15 compound metabolic phenotypes showed no significant influence of Native ancestry. Nevertheless, intermediate compound metabolizers were nominally more common in NAT (20%) compared to non-NAT (12%), and the possibility of a statistical type 2 error, cannot be excluded in view of the relatively small size of these subcohorts. Based on the compound TPMT and NUDT15 phenotypes the CPIC recommendations for thiopurine dose adjustment apply to 25% and 15% of the individuals in the NAT and non-NAT study subcohorts, respectively. For comparison, recommendation of thiopurine dosing adjustment applied to ~10% of 162 children with acute lymphoblastic leukemia, from the Southeast region of Brazil [20], and to 40% of 1KG AMR individuals with >70% Native ancestry [6].

Finally, the identification of a self-reported White individual, with estimated 0.94 (94%) proportion of European ancestry, having the *NUDT15* rs116855232 TT homozygous genotype was unexpected, since the rs116855232 T allele was not detected among 1KG-AMR individuals with >70% European ancestry [6], TT homozygotes were absent in the 1KG European superpopulation and were extremely rare (0.003–0.03%)

in the European cohorts of the Exac/gnomAD data-base. Nevertheless, one rs116855232 homozygous carrier was identified among 107 European patients who developed severe thiourine-related hematotoxicity [21]. The finding of one rs116855232 TT homozygote in our study cohort may be tentatively ascribed to differences in local ancestry, that is, ancestry at specific loci versus global ancestry, a recognized caveat in admixed populations [22].

Acknowledgements

This study was supported by grants from Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Departamento de Ciência e Tecnologia of Ministry of Health (DECIT), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). W.M.M., M.V.G.L. and G.S.-K. are CNPq fellows.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Jakobsson M, Scholz SW, Scheet P, Gibbs JR, VanLiere JM, Fung HC, *et al.* Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature* 2008; 451:998–1003.
- Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clin Pharmacol Ther* 2017; 102:688–700.
- Leckband SG, Kelsoe JR, Dunnenberger HM, George AL Jr, Tran E, Berger R, *et al.*; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for HLA-B genotype and carbamazepine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94:324–328.
- Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, *et al.* Inherited *NUDT15* variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2015; 33:1235–1242.
- Yang JJ, Whirl-Carrillo M, Scott SA, Turner AJ, Schwab M, Tanaka Y, *et al.* Pharmacogene variation consortium gene introduction: *NUDT15*. *Clin Pharmacol Ther* 2019; 105:1091–1094.
- Suarez-Kurtz G, Araújo GS, de Sousa SJ. Pharmacogeomic implications of population diversity in Latin America: TPMT and *NUDT15* polymorphisms and thiopurine dosing. *Pharmacogenet Genomics* 2020; 30:1–4.
- Suarez-Kurtz G, Brisson GD, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Salzano FM. *NUDT15* polymorphism in Native American populations of Brazil. *Clin Pharmacol Ther* 2019; 105:1321–1322.
- Ferreira RG, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LM, *et al.* Ethnic admixture composition of two western Amazonian populations. *Hum Biol* 2002; 74:607–614.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gasmão L, Amorim A, *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010; 31:184–190.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6:e17063.
- Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM, *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for thiopurine dosing based on TPMT and *NUDT15* genotypes: 2018 update. *Clin Pharmacol Ther* 2019; 105:1095–1105.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2006; 70:658–665.

- 13 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000; 155:945–959.
- 14 Sortica VA, Lindenau JD, Cunha MG, Ohnishi MD, Ventura AMR, Ribeiro-Dos-Santos ÁK, et al. The effect of SNPs in CYP450 in chloroquine/ primaquine Plasmodium vivax malaria treatment. *Pharmacogenomics* 2016; 17:1903–1911.
- 15 Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida AC G, Kühn A, Ramasamy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. *Malar J* 2018; 17:57.
- 16 Rodrigues JCG, Fernandes MR, Guerreiro JF, da Silva ALDC, Ribeiro-Dos-Santos Á, Santos S, Santos NPCD. Polymorphisms of ADME-related genes and their implications for drug safety and efficacy in Amazonian Amerindians. *Sci Rep* 2019; 9:7201.
- 17 Salzano FM, Bortolini MC. *The evolution and genetics of Latin American populations*. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.
- 18 Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML, et al. Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 2002; 119:249–256.
- 19 Bonifaz-Peña V, Contreras AV, Struchiner CJ, Boela RA, Furuya-Mazzotti TK, Chammass R, et al. Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. *PLoS One* 2014; 9:e112640.
- 20 Suarez-Kurtz G, Kovaleski G, Elias ABR, Motta VL, Wolch K, Emerenciano M, et al. Implementation of a Pharmacogenomic Program in a Brazilian Public Institution. *Pharmacogenomics* 2020 May 7. doi: 10.2217/pgs-2020-0016. [Epub ahead of print]
- 21 Schaeffeler E, Jaeger SU, Klumpp V, Yang JJ, Igel S, Hinze L, et al. Impact of NUDT15 genetics on severe thiopurine-related hematotoxicity in patients with European ancestry. *Genet Med* 2019; 21:2145–2150.
- 22 Price AL, Tandon A, Patterson N, Barnes KC, Rafaels N, Ruczinski J, et al. Sensitive detection of chromosomal segments of distinct ancestry in admixed populations. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000519.

Supplementary Table 1.

Localities	State	Geographical coordinates	N
Cruzeiro do Sul	Acre	7° 37' 39" S, 72° 40' 39" W	1
Macapá	Amapá	0° 2' 4" N, 51° 3' 60" W	1
São Gabriel da Cachoeira	Amazonas	0° 7' 48" S, 67° 5' 20" W	30
Manaus	Amazonas	3° 4' 25" S, 60° 0' 20" W	8
Lábrea	Amazonas	7° 15' 36" S, 64° 47' 57" W	6
Rio Preto da Eva	Amazonas	2° 41' 55" S, 59° 42' 3" W	5
Coari	Amazonas	4° 5' 6" S, 63° 8' 30" W	4
Itacoatiara	Amazonas	3° 8' 31" S, 58° 26' 33" W	4
Humaitá	Amazonas	7° 30' 22" S, 63° 1' 38" W	3
Parintins	Amazonas	2° 37' 40" S, 56° 44' 09" W	3
Tabatinga	Amazonas	4° 15' 12" S, 69° 56' 19" W	1
Jacareacanga	Pará	6° 12' 24" S, 57° 49' 28" W	11
Anajás	Pará	0° 59' 14" S, 49° 56' 25" W	9
Marabá	Pará	5° 22' 12" S, 49° 7' 1" W	4
Candeias do Jamari	Rondônia	8° 48' 35" S, 63° 41' 9" W	14
Guajará-Mirim	Rondônia	10° 46' 58" S, 65° 20' 22" W	7
Cujubim	Rondônia	9° 21' 48" S, 62° 35' 8" W	6
Porto Velho	Rondônia	8° 45' 42" S, 63° 54' 14" W	6
Machadinho do Oeste	Rondônia	9° 25' 49" S, 62° 0' 15" W	1
Boa Vista	Roraima	2° 49' 10" N, 60° 40' 17" W	2
Amajari	Roraima	3° 39' 07" N, 61° 22' 15" W	1
Caracaraí	Roraima	1° 49' 13" N, 61° 7' 57" W	1

Supplementary Table 2. Minor allele frequency (MAF) of *NUDT15* and *TPMT* polymorphisms^a

Source/population	<i>NUDT15</i>		<i>TPMT</i>	
	rs116855232	rs1800460	rs1142345	rs1800462
This study				
Overall cohort	5.5	5.9	4.3	0
Self-declared Amerindians	6.0	6.0	3.0	0
Self-declared non-Amerindians	4.9	4.1	5.7	0
Brazilians				
Natives living in reservation areas ^b	5.2 - 31.7			
Admixed cohort ^c	1.5	1.9	2.9	0.7
1000 Genomes Project^d				
AMR (Admixed American)	4.5 (0.5 - 11.8)	4.0 (1.1 - 6.5)	5.8 (2.1 - 9.1)	0.6 (0 - 1.1)
EUR (European)	0.2 (0 - 1.0)	2.8 (1.4 - 4.2)	2.9 (1.4 - 4.2)	0.6 (0 - 1.1)
AFR (African)	0.1 (0 - 0.8)	0.3 (0 - 2.5)	6.7 (4.0 - 11.6)	0.1 (0 - 0.8)
Genome Aggrgation Database^e				
Latino	6.0	4.3	4.8	0.3
European non-Finish	0.3	3.8	4.3	0.2
European Finish	2.3	2.7	3.1	<0.01
African	0.1	0.7	5.6	0.05

^a Expressed as percent

^b Data from reference [7]

^c Data available at <http://abraom.ib.usp.br/search.php>

^d Data available at <https://www.ensembl.org/index.html> for superpopulations (range in the comprised populations)

^e Data available at <https://gnomad.broadinstitute.org/>

5. LIMITAÇÕES

A limitação do presente trabalho foi a utilização de amostras somente do sexo masculino porque a G6PD é uma deficiência ligada ao sexo, sendo mais prevalente em homens e, para se determinar a frequência dessa alteração, coletou-se amostras somente de homens.

6. CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo da distribuição de frequências dos polimorfismos combinados de NUDT15 e TPMT na Amazônia Legal, local onde 60% da população brasileira é autorreferida ameríndia;

Os resultados mostraram não haver diferenças estatisticamente significantes na menor frequência alélica dos SNPs NUDT15 e TPMT interrogados ou na distribuição dos haplótipos TPMT e fenótipos metabólicos compostos NUDT15 / TPMT, entre ameríndios auto-relatados versus não-ameríndios, ou entre as sub-coortes de nativos e não-nativos;

A distribuição dos fenótipos metabólicos TPMT e NUDT15 não diferiu entre as sub-coortes do estudo, conseqüentemente não foi possível estabelecer influência da ancestralidade nativa;

As recomendações do CPIC para ajuste da dose de Tiopurina foram aplicadas em 23% e 17% dos indivíduos nas sub-coortes NAT e não-NAT;

Outros estudos devem ser realizados com um n amostral maior, a fim de determinar a real frequência dos SNPs TPMT e NUDT15 na população nativa.

7. PERSPECTIVAS

Sabendo que essas alterações genéticas podem estar presentes na população estudada, ainda se necessita de mais estudos para se determinar com uma maior precisão a prevalência desses polimorfismos. Também pode-se procurar realizar um estudo nos pacientes portadores de leucemia para se determinar a presença desses polimorfismos na população doente e seguir os protocolos com as dosagens individuais para se determinar se houve, ou não, um aumento na toxicidade dos pacientes.

8. REFERÊNCIAS

1. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res* [Internet]. 2012;36(1):6–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.09.028>
2. Mehranfar S, Zeinali S, Hosseini R, Mohammadian M, Akbarzadeh A, Feizi AHP. History of Leukemia: Diagnosis and Treatment from beginning to Now. *Galen Med J*. 2017;6(1):12–22.
3. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*. 1948;238(23):787–93.
4. Emil F, Emil FJ, Gehan E, Pinkel D, Holland JF, Selawry O, et al. Studies of Sequential and Combination Antimetabolite Therapy in Acute Leukemia: 6-Mercaptopurine and Methotrexate. *Blood*. 1961;01(01):1–24.
5. Pui C-H, Evans WE. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol* [Internet]. 2013 Jul;50(3):185–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196313000905>
6. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J*. 1978;2(6151):1529–30.
7. Williams DL, Thomas Look A, Melvin SL, Roberson PK, Dahl G, Flake T, et al. New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell*. 1984;36(1):101–9.
8. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 Mar;1(2):133–43. Available from: <http://www.stjuderresearch>.
9. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, *Blood*. American Society of Hematology; 2016. p. 2391–405.
10. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2016 Nov;16(11):607–9.
11. Estcourt LJ, Bain BJ. WHO Classification of Leukemia [Internet]. Vol. 7, *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2013. 329–336 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01641-7>
12. Zhang Y, Rowley JD. Leukemias, Lymphomas, and Other Related Disorders [Internet]. Sixth Edit. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Elsevier; 2013. 1–44 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00079-3>
13. Society AC. Key Statistics for Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>
14. Cancer Research UK. Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) incidence statistics [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/leukaemia-all/incidence#heading-Zero>

15. Cancer Research UK. Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) mortality statistics [Internet]. 2017. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading-Zero%0Ahttp://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading-Zero>
16. Oncoguia I. Estatísticas para Leucemia Linfóide Aguda (LLA) [Internet]. 2020. Available from: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-leucemia-linfoide-aguda-lla/7852/316/>
17. Reaman GH. Pediatric oncology: Current views and outcomes. *Pediatr Clin North Am*. 2002;49(6):1305–18.
18. Gallegos-Arreola MP, Borjas-Gutiérrez C, Zuñiga-González GM, Figuera LE, Puebla-Pérez AM, García-González JR. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. Vol. 2, Intech open. 2015. 43–73 p.
19. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469(7330):314–22.
20. Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ* [Internet]. 2002 Feb 2;324(7332):283–7. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.324.7332.283>
21. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: A GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5202–7.
22. Sattlermc M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol*. 2003;40(2):4–10.
23. Meenaghan T, Dowling M, Kelly M. Acute leukaemia: Making sense of a complex blood cancer. *Br J Nurs*. 2012 Jan;21(2):76–83.
24. Advani A. Acute lymphoblastic leukemia (ALL). Vol. 30, Best Practice and Research: Clinical Haematology. Bailliere Tindall Ltd; 2017. p. 173–4.
25. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2019;0(0):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1605071>
26. Monteiro LC. Avaliação da Prevalência e Suscetibilidade Antifúngica de Candida Isoladas da Cavidade Bucal de Pacientes Infanto-Juvenis com Leucemia Linfocítica Aguda [Internet]. Universidade Federal da Paraíba; 2015 [cited 2018 Apr 16]. Available from: <http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/8871/2/arquivototal.pdf>
27. Rocha JMC, Xavier SG, de Lima Souza ME, Assumpção JG, Murao M, de Oliveira BM. Current strategies for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1).
28. Costa S de S, Silva A de M, Macedo I de AB. Conhecimento De Manifestações Orais Da Leucemia e Protocolos de Atendimento Odontológico. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2011;23(1):70–8.
29. Maia R da RP, Filho VW. Infection and childhood leukemia : review of evidence. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(6):1172–85.
30. Master S, Koshy N, Mansour R, Shi R. Effect of Stem Cell Transplant on Survival in Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia : NCDB Analysis. *Anticancer Res*. 2019;1906(39):1899–906.
31. Schmiegelow K, Vestergaard T, Nielsen SM, Hjalgrim H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: The adrenal hypothesis. *Leukemia*. 2008;22(12):2137–41.

32. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):639–49.
33. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Zukic B, Gasic V, Dokmanovic L. Pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic profiling of childhood acute lymphoblastic leukemia: Paving the way to personalized treatment. *Genes (Basel)*. 2019;10(3).
34. Rocha BC. Leucemia Linfóide Aguda - Relato de um Caso e Revisão de Literatura. São Paulo; 2012. (1). Report No.: 1.
35. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*. 2002 Jun;359(9321):1909–15.
36. Pedrosa F. Leucemia linfóide aguda : uma doença curável Acute lymphoblastic leukemia : a curable disease. 2002;2(1):63–8.
37. Rudin S, Marable M, Huang RS. The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2017 Apr;15(2):82–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2016.11.003>
38. Mörücke A, Zimmermann M, Valsecchi MG, Stanulla M, Biondi A, Mann G, et al. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood*. 2016;127(17):2101–12.
39. Vande Voorde J, Quintiliani M, McGuigan C, Liekens S, Balzarini J. Inhibition of pyrimidine and purine nucleoside phosphorylases by a 3,5-dichlorobenzoyl-substituted 2-deoxy-d-ribose-1-phosphate derivative. *Biochem Pharmacol*. 2012 May;83(10):1358–63.
40. Robak P, Robak T. Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias. Vol. 39, *Cancer Treatment Reviews*. 2013. p. 851–61.
41. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5^a. London; 2003. 1–914 p.
42. Daehn I, Brem R, Barkauskaite E, Karran P. 6-Thioguanine damages mitochondrial DNA and causes mitochondrial dysfunction in human cells. *FEBS Lett*. 2011 Dec;585(24):3941–6.
43. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai H, Pui C, et al. Molecular Diagnosis of Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency: Genetic Basis for Azathioprine and Mercaptopurine Intolerance. *Ann Intern Med* [Internet]. 1997;126(8):1–7. Available from: papers3://publication/uuid/FC367CD6-84E2-4751-8579-CD3C94D2E445
44. Ailing Z, Jing Y, Jingli L, Yun X, Xiaojian Z. Further evidence that a variant of the gene NUDT15 may be an important predictor of azathioprine-induced toxicity in Chinese subjects: a case report. *J Clin Pharm Ther*. 2016;41(5):572–4.
45. Pacheco Neto M, Alves ANL, Fortini AS, Burattini M do N, Sumita NM, Srougi M, et al. Monitoração terapêutica da azatioprina: uma revisão. *J Bras Patol e Med Lab*. 2008;44(3):161–7.
46. Weinshilboum R. Inheritance and Drug Response. *N Engl J Med* [Internet]. 2003;348(6):529–37. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra020021>
47. 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* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2019 Feb 15];63(4):288–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354201>

48. Wang R, Liu B, Li J, Xu J, Wang X, Zhao Z, et al. Association between the c.415C > T, c.52G > A, and 36_37insGGAGTC polymorphisms of NUDT 15 and thiopurine-induced leukopenia, thiopurine intolerance, and severe hair loss: an updated meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2019 Aug;Volume 13:2729–44. Available from: <https://www.dovepress.com/association-between-the-c415c-gt-t-c52g-gt-a-and-3637insggagtc-polymor-peer-reviewed-article-DDDT>
49. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(1):329–39.
50. Brouwer C, De Abreu RA, Keizer-Garritsen JJ, Lambooy LHJ, Ament K, Ter Riet PGJH, et al. Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukaemia: Biochemical and molecular biological aspects. *Eur J Cancer*. 2005;41(4):613–23.
51. Paugh SW, Stocco G, Evans WE. Pharmacogenomics in pediatric leukemia. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(6):703–10.
52. Zhou S. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. *Curr Clin Pharmacol*. 2013;1(1):119–28.
53. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev*. 2015;29(4):243–9.
54. 2018_Relling, M. V., et. al. - Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT15 genotypes - 2018 update.pdf.
55. Yang JJ, Whirl-Carrillo M, Scott SA, Turner AJ, Schwab M, Tanaka Y, et al. Pharmacogene Variation Consortium Gene Introduction: NUDT15. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 15];0(0):1–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1268>
56. Moriyama T, Nishii R, Ting-Nien L, Kihira K, Toyoda H, Nersting J, et al. The Effects of Inherited NUDT15 Polymorphisms on Thiopurine Active Metabolites in Japanese Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2015;27(4):215–25.
57. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(11):1235–42.
58. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. *Annu Rev Med*. 2006;57(1):119–37.
59. Metzger IF, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. FARMACOGENÉTICA: PRINCÍPIOS , APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS*. In: Simpósio: Farmacogenética. 2006. p. 515–21.
60. Reis M. Farmacogenética Aplicada Ao Câncer. *Quimioterapia Individualizada E Especificidade Molecular. Simpósio Farm*. 2006;39(4):577.
61. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1990;336(8709):225–9.
62. Relling M V., Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(5):1095–105.
63. ANSARI A, HASSAN C, DULEY J, MARINAKI A, SHOBOWALE-BAKRE E, SEED P, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(10):1743–50.

64. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62(1):60–73.
65. Schaeffeler E, Stanulla M, Greil J, Schrappe M, Eichelbaum M, Zanger UM, et al. A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5-year-old boy with ALL [6]. *Leukemia.* 2003;17(7):1422–4.
66. Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M. High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin Chem.* 2001;47(3):548–55.
67. Collie-Duguid ESR, Pritchard, Powrie, Sludden J, Collier, Li T, et al. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* [Internet]. 1999 Feb;9(1):37–42. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00008571-199902000-00006>
68. Relling M V., Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93(4):324–5.
69. Sanderson J, Ansari A, Marinaki T, Duley J. Thiopurine methyltransferase: Should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? *Ann Clin Biochem.* 2004;41(4):294–302.
70. Yin D, Xia X, Zhang J, Zhang S, Liao F, Zhang G, et al. Impact of *NUDT15* polymorphisms on thiopurines-induced myelotoxicity and thiopurines tolerance dose. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Feb 21;8(8):13575–85. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14594>
71. Zhang AL, Yang J, Wang H, Lu JL, Tang S, Zhang XJ. Association of *NUDT15* c.415C>T allele and thiopurine-induced leukocytopenia in Asians: a systematic review and meta-analysis. *Ir J Med Sci.* 2018;187(1):145–53.
72. Suarez-kurtz G, Brisson GD, Hutz MH, Petzl-erler L, Salzano FM. Letter to the Editor *NUDT15* polymorphism in Native American populations of Brazil Authors Coordenação de Pesquisa , Instituto Nacional de Câncer , Rio de Janeiro , Brazil Departamento de Genética , Universidade Federal do Rio Grande do Sul , Porto Alegre . :1–5.
73. Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR). *Natl Meas Syst.* 2013;50.
74. Park Y, Kim H, Choi JY, Yun S, Min BJ, Seo ME, et al. Star Allele-Based Haplotyping versus Gene-Wise Variant Burden Scoring for Predicting 6-Mercaptopurine Intolerance in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Front Pharmacol.* 2019;10(JUN):1–10.
75. Paschou P, Lewis J, Javed A, Drineas P. Ancestry informative markers for fine-scale individual assignment to worldwide populations. *J Med Genet.* 2010;47(12):835–47.
76. Rosenberg NA, Li LM, Ward R, Pritchard JK. Informativeness of Genetic Markers for Inference of Ancestry. *Am J Hum Genet.* 2003;73(6):1402–22.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO I - Protocolo de Extração de DNA

Extração de DNA

- Adicionar 25 μ L de Proteinase K e 200 μ L de amostra biológica em cada poço da Placa de Coleta;
- Pipetar a solução no fundo do poço sem encostar nas bordas do poço;

IMPORTANTE

Para amostras com menos de 200 μ L, completar o volume com PBS 1X;

- Adicionar 200 μ L de Tampão de Lise C em cada poço da Placa de Coleta;
- Opcional: Centrifugar rapidamente para coletar todo líquido no fundo do poço se as soluções não forem dispensadas corretamente;
- Selar a Placa de Coleta com Filme Adesivo e incubar em temperatura ambiente (18-25°C) por 10min. Durante o tempo de incubação, assegurar completa mistura das soluções por meio de ciclos de 3 a 5 aspirações (repetir 3 a 5 vezes) ou passar a placa suavemente sobre o vórtex em baixa velocidade (também de 3 a 5 vezes) por alguns segundos. Caso se tenha um shaker para homogeneização da placa, manter a uma velocidade de rotação (1200-1500rpm) durante os 10 minutos. Dependendo do modelo do shaker e da frequência de agitação aplicada, fixar a placa com fita adesiva ou elástico para evitar o deslocamento;
- Após o tempo de incubação, o lisado se tornará amarronzado. Caso se esteja trabalhando com amostras antigas, aumentar o tempo de incubação para 30 minutos;
- Adicionar 200 μ L de Etanol (96-100%) em cada poço e homogeneizar por pipetagem repetitiva por 3 vezes.

ATENÇÃO

Após a adição do etanol ao lisado, misturar imediatamente por, no máximo, 1 minuto! Não deixar o etanol na superfície do lisado por mais de 1 minuto pois pode ocorrer diminuição do rendimento e pureza do DNA extraído;

- Colocar a Placa de ligação sobre uma nova Placa de Coleta e transferir toda a suspensão da Placa de Ligação;
- Cobrir a placa com um novo Filme Adesivo e colocar todo o bloco (Placa de Ligação + Placa de Coleta) na centrífuga por 3 minutos a 5.600xg;
- Retirar todo o bloco da centrífuga e desprezar o filtrado;
- Reencaixar a Placa de Ligação na Placa de Coleta;

NOTA

Se algumas amostras não passarem completamente pela membrana, repetir o passo de centrifugação dentro de 10 minutos, não sendo necessário descartar o filtrado

- Adicionar 500 μ L do Tampão de Lavagem C1 em cada poço da Placa de Coleta e cobrir novamente com um novo Filme Adesivo;
- Colocar todo o bloco (Placa de Ligação + Placa de Coleta) na centrífuga por 5 minutos a 5.600xg e quando terminar, retirar todo o bloco e desprezar o filtrado;
- Reencaixar a Placa de Ligação na Placa de Coleta e repetir o passo anterior;
- Encaixar a Placa de Ligação sobre a Placa de Eluição, adicionar 200 μ L de Tampão de Eluição S e cobrir a placa com um novo Filme Adesivo;
- Colocar todo o bloco (Placa de Ligação + Placa de Eluição) na centrífuga por 2 minutos a 5.600xg;
- Retirar todo o bloco da centrífuga e descartar a Placa de Diluição;
- Selar a Placa de Eluição para armazenar o DNA.

Biossegurança e descarte de resíduos

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1). Os resíduos serão descartados de acordo com as normas da Gerência de Malária. O lixo líquido será incubado com hipoclorito de sódio durante a noite, depois pode descartado pelo esgoto. Alternativamente pode ser colectado em recipiente de lixo líquido que será buscado por profissionais. As ponteiros usadas podem serao autoclavadas e depois podem ser descartadas no lixo comum.

Limpeza de material e equipamento

Limpeza de placas e poço profundo

- Deixar as placas de molho em hipoclorito de sódio durante a noite;
- Enxaguar com água destilada;
- Embrulhar em papel alumínio e autoclavar.

Limpeza da Centrífuga (1x/Mês)

- Limpeza do interior da centrífuga (tampa incluída) e dos suportes das placas com água e detergente;
- Desmontar rotor e colocar de volta bem apertado;
- Aplicar gordura na parte exterior do suporte de placa.

REFERÊNCIA

- Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
- Biopur Kit Extração Mini Cent Centrifugação (Biometrix Diagnóstica Ltda., Curitiba – Paraná – Brasil)

9.2 ANEXO II - Procedimento para realização da genotipagem de SNPs de TPMT e NUDT15

Materiais

- Pipetas automáticas de 10 μ L, 100 μ L e 1000 μ L;
- Ponteiras com filtro para pipetas automáticas;
- Pipeta multicanal;
- Multipipetador;
- Ponteiras para multipipetador (0,5mL);
- Tubos eppendorf de 1,5 e 2,0mL;
- Microplacas de 0,1mL com 96 poços para sistema de PCR em Tempo Real;
- Adesivos ópticos para vedar as microplacas.

Equipamentos

- Vórtex;
- Centrífuga;
- Termociclador de PCR em Tempo Real;
- Nanodrop.

Reagentes

- Mastermix universal;
- Mastermix de genotipagem;
- Sondas de genotipagem;
- Água nuclease free.

Reação de genotipagem

Obtenção de DNA

- A extração do DNA deve ser feita de acordo com o POP: Procedimento para Extração de DNA em placa
- As amostras devem ser armazenadas em tubo eppendorf ou microplaca e devem ser mantidas em câmara fria a 4°C.

Preparação do Mix de genotipagem

- O mix de genotipagem deve ser preparado e distribuído na microplaca para PCR na área apropriada (capela de fluxo laminar VECO CFLV estéril para preparo de reagentes PCR);
- Ligar a luz UV (germicida) da capela de fluxo laminar cerca de 30 minutos antes do preparo. Após esse período, desligar a luz
- Com o fluxo laminar da cabine em operação, proceder o preparo do mix de genotipagem;
- Centrifugar as sondas;
- Em um tubo de eppendorf, pipetar os reagentes nas seguintes proporções:

Obs: Pode-se utilizar também os reagentes e volumes (mix de genotipagem e DNA template) recomendados pelo fabricante das sondas de genotipagem, a *Thermofisher Scientific*

Sondas	Polimorfismo
C_154823200_10	rs116855232 → NUDT15
C____19567_20	rs1142345
C_30634116_20	rs1800460
C_12091552_30	rs1800462

} TPMT

Proporção	Volume
Mastermix universal	10µL
Sonda de genotipagem (tabela abaixo)	1µL
DNA para genotipagem	9µL
Volume final	20µL

Montagem da placa de genotipagem

- Vortexar e/ou centrifugar todos os tubos e microplacas de armazenamento de DNA;
- Pipetar 20µL da solução de genotipagem em cada poço da microplaca de genotipagem;
- O controle negativo deve ser feito pipetando 20µL de água (miliQ/água para injeção/água nuclease free) em cada poço selecionado como controle negativo;

- Aplicar o adesivo óptico para vedar a microplaca, evitando de tocar em sua área central e centrifugar a placa.

Reação de PCR real time

- A reação utiliza o software Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System;
- Selecionar Advanced Setup na tela inicial;
- No Experiment Menu → Setup → Experiment properties: identificar o nome do experimento e o instrumento de corrida (7500/96wells), o tipo de experimento (genotyping), o reagente (TaqMan® Reagents) e a velocidade (Standart, ~2hours to complete run)
- No Experiment Menu → Setup → Plate setup: Atribuir o SNP assay, Criar o novo SNP assay; identificar o SNP assay, definir o alelo 1 e 2 base e selecionar VIC e FAM, respectivamente e no Plate layout, selecionar os poços e definir os SNP assay para cada polimorfismo ou o que estiver sendo estudado.
- No Experiment Menu → Setup → Run Method: configurar a corrida preenchendo a quantidade de μL da reação (que pode ter entre 10 μL a 30 μL), na aba Tabular View, selecione os tempos e temperatura da reação bem como o número de ciclos.

Step/Stage	Pre-PCR Read	Thermal Cycling (Performed on a dedicated thermal cycler)			Post-PCR Read
	Holding Stage	Holding Stage	Cycling (50 cycles)		Holding stage
			Denature	Anneal/Extend	
Temperature	60°C	95°C	95°C	60°C	60°C
Times (mm:ss)	01:00	10:00	00:15	01:30	01:00
Data Colletion	Yes	No	No	Yes	Yes

- Após configurar a PCR, conferir o Plate Layout e salvar a reação, em seguida clicar em Start Run;
- O desenho da reação pode ser salvo como template para as demais análises;

Análise da reação e definição do haplótipo

- No Experiment Menu → Analysis → Multicomponent plot: analisar as curvas de genotipagem

REFERÊNCIA

- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-time PCR System. Genotyping Experiments. Part Number 4387784. Revision C. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific.
- Taqman® Copy Number Assays. User Guide. Publication 4397425. Revision E. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific