

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental

MAURÍLIO PACHECO NETO

Desenvolvimento de metodologia para monitorização
terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta
eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais

São Paulo

2010

MAURÍLIO PACHECO NETO

Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Atecla Nunciata Lopes Alves

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pacheco-Neto, Maurílio

Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais / Maurílio Pacheco-Neto. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Atecla Nunciata Lopes Alves.

Descritores: 1.Azatioprina 2.Tioguanina 3.Cromatografia líquida de alta pressão
4.Monitoramento de medicamentos

USP/FM/DBD-186/10

Nome: Maurílio Pacheco Neto

Título: Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

*Se ora não nos faltassem as ferramentas e ora a compreensão
Se prescindissem os fluxogramas e as correlações
Se mais que os olhos enxergasse o coração
Em última análise encontraríamos um Deus em cada um
E só a Ele caberia nossa gratidão*

*À minha mãe Aninha, pela criação e pelo materno exercício do consolo e da
resignação.*

Ao meu pai Heráclito, pelo otimismo e constante incentivo à educação.

Ao meu irmão Théo, pelo carinho e confiança.

À minha esposa Larissa, pelo amor, inspiração e amizade de sempre.

“Sonho que se sonha só

É só um sonho que se sonha só

Mas sonho que se sonha junto é realidade” (Prelúdio - Raul Seixas)

À Profa. Dra. Atecla Nunciata Lopes Alves, pela orientação, paciência e pelos merecidos puxões de orelha. Obrigado pelos ensinamentos técnicos e pelos bons conselhos.

Ao Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita, pela orientação e apoio nos momentos necessários. Obrigado pela confiança e constantes intercessões junto à diretoria da DLC.

Ao Prof. Dr. Pedro Renato Chocair, pela oportunidade de participar de um trabalho tão gratificante e por compartilhar comigo sua experiência e vocação.

Ao Dr. Alexandre Soriano Fortini, pelo imenso apoio na coleta das amostras e informações dos pacientes. Obrigado pelo empenho junto à diretoria da DLC para a concessão de uma bolsa ao projeto.

À Dra. Maria Elisabete Mendes, pelo incentivo ao aprimoramento contínuo e apoio no momento da qualificação do projeto.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, diretor da DLC, pelo suporte financeiro concedido ao projeto.

Aos pesquisadores do departamento de gastroenterologia da FMUSP, Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita, Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado e Paulo Dominguez Nasser, por abraçarem o projeto, fazendo surgir novas possibilidades.

Aos pacientes da UTR, as únicas justificativas da existência desse trabalho, que conscientes do quanto podiam ajudar em momento algum se negaram a fazê-lo.

A todos os colaboradores da DLC, pela receptividade e aprendizado ao longo desses anos.

Aos colaboradores da coleta, PDA e cadastro de exames, pelo apoio técnico no desenvolvimento do protocolo de pesquisa.

Aos colaboradores do Serviço de Hematologia, pelo apoio técnico na realização dos eritogramas.

Aos colaboradores da secretaria, do serviço de informática e do ambulatório da UTR, pela convocação, auxílio na coleta de informações e amostras dos pacientes.

Aos colaboradores da secretaria de pós-graduação do programa de Fisiopatologia Experimental e da biblioteca da FMUSP, pelas informações e auxílio nos trâmites da pós-graduação.

Aos colaboradores do Serviço de Bioquímica Clínica, pela convivência e apoio diário. A vocês, o meu especial agradecimento.

"A porta da verdade estava aberta, mas só deixava passar meia pessoa de cada vez. Assim não era possível atingir toda a verdade, porque a meia pessoa que entrava só conseguia o perfil de meia verdade. E sua segunda metade voltava igualmente com meio perfil. E os meios perfis não coincidiam. Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta. Chegaram ao lugar luminoso onde a verdade esplendia os seus fogos. Era dividida em duas metades diferentes uma da outra.

Chegou-se a discutir qual a metade mais bela. Nenhuma das duas era perfeitamente bela. E era preciso optar. Cada um optou conforme seu capricho, sua ilusão, sua miopia."

(A Verdade Dividida - Carlos Drummond de Andrade)

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors*. (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

Pacheco-Neto M. Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2010. 134f.

A azatioprina (AZA) é um imunossupressor utilizado no tratamento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, doença inflamatória intestinal e contra a rejeição em transplantes de órgãos sólidos. Após mais de 40 anos de uso a AZA continua exercendo um papel central nos regimes imunomoduladores, devido ao fato de combinar eficácia, segurança e baixo custo. Sabe-se que a atividade da tiopurina metiltransferase pode determinar, pelo menos em parte, a eficácia clínica da AZA. Esta enzima apresenta polimorfismo genético co-dominante e a distribuição dos alelos variantes é significativamente diferente entre as populações. A grande variabilidade farmacocinética no metabolismo AZA justifica a sua monitorização terapêutica. Neste trabalho otimizou-se uma metodologia para a quantificação dos metabólitos da AZA, 6-TGN e 6-MMP, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV-Vis), utilizando-se um detector de ultravioleta-visível em um único comprimento de onda, após a amostra passar por uma desproteção ácida simples e ser aquecida para a conversão dos metabólitos em suas respectivas bases livres. Os valores destes metabólitos foram determinados em uma população de 124 pacientes transplantados renais. Para adequarmos o processo às legislações locais e internacionais, foram seguidas orientações da Anvisa, FDA e CLSI. A separação foi realizada em coluna de fase reversa, sendo a fase móvel A fosfato de potássio e a fase móvel B metanol. A detecção da 6-TGN e da 6-MMP foi realizada em 342 nm (UV-Vis). O estudo da linearidade da 6-TGN variou entre 0,30 e 89,71 $\mu\text{mol/L}$ e da 6-MMP entre 0,30 e 93,86 $\mu\text{mol/L}$. As recuperações, de 95,08 a 100,80% para 6-TGN e 95,38 a 105,06% para 6-MMP. Os CV da repetibilidade, de 0,04 a 5,06%, enquanto os CV da reprodutibilidade de 4,88 a 12,73% para 6-TGN e 6-MMP. Para ambos os

metabólitos o LD e o LQ foram de 0,30 $\mu\text{mol/L}$ e 0,13 $\mu\text{mol/L}$. Os eritrócitos lavados e as amostras tratadas, prontas para a injeção no HPLC, foram armazenadas abaixo de -5°C até a análise. Nesta temperatura estiveram estáveis durante 8 semanas e 1 dia, respectivamente. Os valores das concentrações de 6-TGN e 6-MMP encontrados nas amostras dos pacientes variaram entre não detectável a 1569 $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (mediana de 200,50) e não detectável a 113057 $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (mediana de 5166), respectivamente. As correlações entre os níveis de 6-TGN ou 6-MMP e as variáveis sexo, tempo pós-transplante, número de transplantes e dosagem de AZA (mg/kg) foram examinadas em diferentes grupos. O método proposto apresenta boa relação custo-benefício, é simples, preciso e rápido na determinação das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e 6-MMP em pacientes sob terapia com AZA. O método validado permite que o laboratório forneça dados farmacocinéticos úteis e precisos para o ajuste do tratamento do paciente e pode ser facilmente adaptado para a análise rotineira destes metabólitos. Os resultados das amostras dos pacientes estão de acordo com os encontrados em outros estudos, atestando a utilidade dessa ferramenta analítica no acompanhamento dos pacientes.

Descritores: azatioprina, tioguanina, cromatografia líquida de alta pressão, monitoramento de medicamentos.

SUMMARY

Pacheco-Neto M. Development of a methodology for therapeutic drug monitoring of azathioprine by high performance liquid chromatography-UV (HPLC-UV) in renal transplant recipients [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2010. 134f.

Azathioprine (AZA) is an immunosuppressant used in autoimmune pathologies like lupus erythematosus, Chron's disease, inflammatory bowel disease and against rejection in solid organs transplant. After more than 40 years of use, AZA continues exerting a central role in immunomodulatory regimens, due to the fact that it combines effectiveness, safety and low cost. It is well known that thiopurine methyltransferase activity may determine, at least in part, the clinical efficacy of AZA therapy. This enzyme exhibits codominant genetic polymorphism and the distribution of these variant alleles differs significantly among populations. The considerable pharmacokinetic variability in AZA metabolism justify the therapeutic drug monitoring of this drug. In this work a methodology was improved to quantify the metabolites of AZA, 6-TGN and 6-MMP, by high performance liquid chromatography (HPLC/UV-Vis) with an ultraviolet-visible detector, using a single wavelength reading, following a simple acid deproteinization and heating to convert the metabolites into their respective free bases. The values of these metabolites were determined in a population of 124 renal transplant recipients. To adequate the process to international and local legislation, Anvisa, FDA and CLSI guidelines were followed. Separation was achieved on a reversed-phase column; mobile phase A potassium phosphate and mobile phase B methanol. Detection of 6-TGN and 6-MMP was performed at 342 nm (UV-Vis). Assay linearity for 6-TGN ranged from 0.30 to 89.71 µmol/L and from 0.30 to 93.86 µmol/L for 6-MMP. The recoveries were 95.08, 97.76 and 100.80% for 6-TGN and 104.79, 95.38 and 105.06% for 6-MMP. Repeatability CV were 3.50, 5.06, 1.09 and 0.04, 0.35, 1.58%, while reproducibility CV were 8.65, 7.18, 8.44 and 12.73, 6.40, 4.88% for 6-TGN and 6-MMP, respectively. LOQ and LOD of 6-TNG and 6-MMP were respectively 0.30 µmol/L and 0.13 µmol/L for both metabolites. The washed erythrocytes and the samples treated and ready for

injection into the HPLC system were stored below -5 °C until analysis, at this temperature the samples were stable for 8 weeks and for 1 day, respectively. 6-TGN and 6-MMP patient analysis values ranged from non detectable to 1569 pmol/8 x 10⁸ RBC (median of 200.50) and non detectable to 113057 pmol/8 x 10⁸ RBC (median of 5166), respectively. The correlations between 6-TGN or 6-MMP levels and variables sex, time post-transplant, number of transplants and AZA dosage (mg/kg) were examined in different groups. The proposed HPLC method has a good cost-benefit ratio, is straightforward, precise, accurate and fast at the determining 6-TGN and 6-MMP concentrations in red blood cells of patients under AZA therapy. The validated method is good enough to enable the laboratory to routinely provide useful and accurate pharmacokinetic data in time to adjust patient regimens. It can be easily adopted for routine analysis of these drug metabolites. The results of patient samples are in agreement with others studies, thus certifying the usefulness of this analytical tool in monitoring of patients.

Descriptors: azathioprine, thioguanine, high pressure liquid chromatography, drug monitoring.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do nucleotídeo de 6-TG.....	2
Figura 2 -	Estrutura de uma guanina endógena.....	2
Figura 3 -	Estrutura da 6-MP.....	3
Figura 4 -	Estrutura da AZA.....	3
Figura 5 -	Total de pacientes que retiram AZA no HCFMUSP.....	8
Figura 6 -	Transplantados renais ativos no HCFMUSP.....	9
Figura 7 -	Representação esquemática do metabolismo da AZA.....	11
Figura 8 -	Distribuição da atividade da TPMT em brasileiros.....	15
Figura 9 -	Equipamento HPLC utilizado nos experimentos.....	29
Figura 10 -	Curva de calibração em função da concentração de 6-TGN.....	48
Figura 11 -	Curva de calibração em função da concentração de 6-MMP.....	49
Figura 12 -	Cromatograma (342 nm) representativo de 6-TGN e 6-MMP....	52
Figura 13 -	Evolução dos resultados dos controles de qualidade da 6-TGN.....	55
Figura 14 -	Evolução dos resultados dos controles de qualidade da 6-MMP.....	56
Figura 15 -	Box-plot dos valores encontrados para a 6-TGN.....	62
Figura 16 -	Box-plot dos valores encontrados para a 6-MMP.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Custo médio das terapias com AZA e MMF no HCFMUSP....	9
Tabela 2 -	Resumo das características dos métodos descritos para a quantificação dos metabólitos da AZA.....	23
Tabela 3 -	Estabilidade da amostra.....	39
Tabela 4 -	Características da população de transplantados renais.....	43
Tabela 5 -	Concentração de 6-TGN <i>versus</i> média das áreas e coeficientes de variação (CV).....	49
Tabela 6 -	Concentração de 6-MMP <i>versus</i> média das áreas e coeficientes de variação (CV).....	50
Tabela 7 -	Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de correlação linear (R^2) obtidos nos testes de linearidade para 6-TGN e 6-MMP.....	50
Tabela 8 -	Limites de quantificação e de detecção e CV.....	51
Tabela 9 -	Recuperação do processo de extração da 6-TGN.....	53
Tabela 10 -	Recuperação do processo de extração da 6-MMP.....	53
Tabela 11 -	Repetibilidade para 6-TGN e 6-MMP.....	54
Tabela 12 -	Reprodutibilidade para 6-TGN e 6-MMP.....	54
Tabela 13 -	Resultados dos controles de qualidade da 6-TGN e da 6-MMP.....	57
Tabela 14 -	Estabilidade da 6-TGN na amostra em diferentes condições.....	58
Tabela 15 -	Estabilidade da 6-MMP na amostra em diferentes condições.....	59
Tabela 16 -	Estabilidade da 6-TGN na amostra desproteinizadas em diferentes condições.....	59
Tabela 17 -	Estabilidade da 6-MMP na amostra desproteinizadas em diferentes condições.....	60
Tabela 18 -	Níveis de concentração de 6-TGN e 6-MMP encontrados na população.....	60

Tabela 19 -	Descrição da frequência dos valores de 6-TGN e 6-MMP na população avaliada.....	61
Tabela 20 -	Correlações de Spearman entre os níveis de 6-TGN e de 6-MMP e as variáveis tempo pós-transplante e dose de AZA.....	64
Tabela 21 -	Níveis de 6-TGN e 6-MMP segundo sexo, número de transplantes de rim e dose de AZA ingerida.....	65
Tabela 22 -	Valores de 6-TGN segundo dose de AZA e número de transplantes e resultados dos testes de associação.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

6-MeTIMP	6-metiltioinosina monofosfato
6-MMP	6-metilmercaptipurina
6-MP	6-mercaptipurina
6-TG	6-tioguanina
6-TGDP	6-tioguanina difosfato
6-TGMP	6-tioguanina monofosfato
6-TGN	Nucleotídeos de 6-TG
6-TGTP	6-tioguanina trifosfato
6-TIMP	6-tioinosina monofosfato
6-TU	Ácido 6-tioúrico
6-TXMP	6-tioxantosina monofosfato
AFM	Acetato de fenilmercúrio
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sobre a curva - <i>area under curve</i>
AZA	Azatioprina
CD	Doença de Chron - <i>Chron's disease</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DTT	Ditriotreitol

EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FURP	Fundação para o Remédio Popular
GGT	Gama glutamil transferase
GMPS	Guanidina 5-monofosfato sintetase
GSH	Glutationas
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência - <i>high performance liquid chromatography</i>
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase
IBD	
IMPDH	Inosina monofostato desidrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC-MS	Cromatografia de fase líquida acoplada a um detector de massas - <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LQ	Limite de quantificação
MMF	Micofenolato mofetil
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
Prodesp	Companhia de Processamento de Dados do Estado de São Paulo
RBC	Eritrócitos - <i>red blood cells</i>
RNA	Ácido ribonucleico
TDM	Monitorização terapêutica de fármacos - <i>therapeutic drug monitoring</i>
TPMT	Tiopurina metiltransferase
UC	Colite ulcerativa - <i>Ulcerative colitis</i>

UTR	Unidade de Transplante Renal
UV-Vis	Ultravioleta-visível
XO	xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Linha do tempo.....	2
1.2. Imunossupressão pós-transplante renal.....	4
1.2.1. Corticoides.....	5
1.2.2. Inibidores da calcineurina.....	5
1.2.3. Ácido micofenólico.....	6
1.3. Uso da azatioprina no HCFMUSP.....	7
1.4. Farmacocinética.....	10
1.5. Polimorfismo genético da TPMT.....	13
1.6. Toxicidade.....	16
1.7. Monitorização terapêutica.....	18
1.8. Métodos para a determinação dos metabólitos.....	21
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Materiais.....	27
3.1.1. Consumíveis.....	27
3.1.2. Vidraria.....	27
3.1.3. Equipamentos.....	28
3.1.4. Reagentes.....	29
3.2. Método.....	30
3.2.1. Preparo e conservação das soluções.....	30
3.2.2. Preparo da papa de hemácias (branco)	32
3.2.3. Preparo dos calibradores.....	32
3.2.4. Preparo dos controles de qualidade.....	33
3.2.5. Coleta e preparo das amostras.....	33
3.2.6. Tratamento das amostras.....	34
3.2.7. Condições cromatográficas.....	34
3.2.8. Validação analítica.....	35
3.2.9. Análises quantitativas.....	40
3.2.10. Fluxograma do método analítico.....	42

3.2.11. Características da população.....	43
3.2.12. Análises estatísticas dos resultados das amostras dos pacientes..	44
4. ÉTICA.....	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Resultados da validação do método.....	48
5.1.1. Linearidade.....	48
5.1.2. Sensibilidade: limite de quantificação e limite de detecção.....	50
5.1.3. Seletividade e especificidade.....	51
5.1.4. Recuperação.....	52
5.1.5. Repetibilidade.....	53
5.1.6. Reprodutibilidade.....	54
5.1.7. Robustez.....	55
5.1.8. Estabilidade da amostra.....	58
5.2. Resultados das amostras dos pacientes.....	60
6. DISCUSSÃO.....	67
6.1. Método.....	68
6.2. Pacientes.....	76
7. CONCLUSÕES.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
9. ANEXOS.....	94
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Anexo 2. Dados brutos obtidos em nosso estudo	
Anexo 3. Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Sisnep)	
Anexo 4. Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)	
Anexo 5. Comissão de Ética da Divisão de Laboratório Central	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. LINHA DO TEMPO

No início dos anos 50, Elion e Hitchings, com a colaboração do Sloan-Kettering Institute (Nova York, EUA), testaram a atividade farmacológica de mais de cem purinas. A 6-mercaptopurina (6-MP) e a 6-tioguanina (6-TG) foram as que apresentaram os melhores resultados na remissão de vários tipos de tumores e leucemias em roedores^(1,2). Em 1953, após estudos toxicológicos realizados por Philips e colaboradores⁽³⁾, Burchenal deu início aos estudos clínicos da 6-TG em crianças com leucemia aguda. Os resultados promissores permitiram que no mesmo ano o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovasse o medicamento para uso no tratamento dessa doença⁽⁴⁾.

Em meados dos anos 50 foi identificada a enzima hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), responsável pela conversão da hipoxantina e da 6-MP em seus respectivos nucleotídeos. Também nessa época Greenberg⁽⁵⁾ e Buchanan^(6,7) descreveram a função metabólica dessa enzima, permitindo o esclarecimento de várias dúvidas acerca do metabolismo das purinas. Sugeriu-se que sua atividade farmacológica era devida à inibição da síntese *de novo* de purinas e à incorporação de nucleotídeos de 6-TG ao ácido desoxirribonucleico (DNA), como falsos metabólitos similares às bases púricas endógenas (Figuras 1 e 2)⁽⁸⁾.

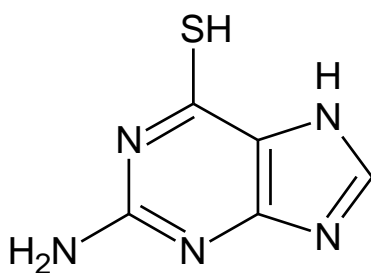


Figura 1. Estrutura do nucleotídeo de 6-TG.

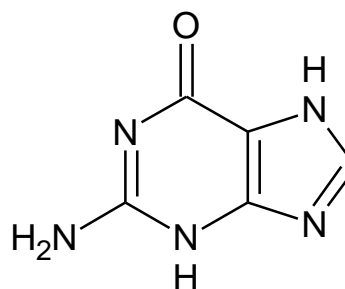


Figura 2. Estrutura de uma guanina endógena.

A seletividade por células neoplásicas dependeria dos níveis de enzimas anabólicas e catabólicas. Nessas células os níveis das enzimas catabólicas geralmente são bem menores que nas células normais, com isso tem-se maior frequência de mitoses e de transporte de medicamentos e metabólitos, o que resultaria em toxicidade seletiva da 6-MP (Figura 3) ⁽⁸⁾.

Paralelamente aos estudos bioquímicos, novas purinas foram sintetizadas e testadas. A adição de diferentes grupamentos químicos à molécula de 6-MP gerou mais de cem purinas diferentes, a 6-TG foi a estrutura que apresentou melhor atividade farmacológica ⁽⁹⁾. As substituições dos grupamentos químicos na molécula da 6-MP foram realizadas no intuito de proteger o átomo de enxofre da oxidação e da hidrólise e, além disso, permitir que a 6-MP fosse liberada somente no interior das células (devido à proximidade dos grupamentos orto-nitro, a molécula é muito susceptível ao ataque de compostos nucleofílicos). Desses compostos, o de maior sucesso foi o derivado 1-metil-4-nitro-5-imidazol (BW57-322), conhecido como azatioprina (AZA) (Figura 4) ⁽¹⁰⁾.

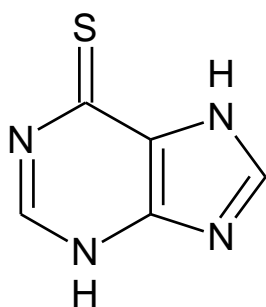


Figura 3. Estrutura da 6-MP.

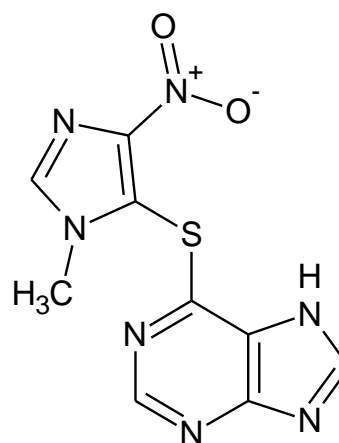


Figura 4. Estrutura da AZA.

Em 1958 novas perspectivas surgiram, Schwartz e Dameshek investigaram o efeito da 6-MP na resposta imune, baseado no conhecimento de que os linfócitos formados após o uso da 6-MP eram semelhantes aos linfócitos leucêmicos e, portanto, incapazes de responder a alguns antígenos. Isso ficou provado quando, após a inoculação de albumina bovina em coelhos que estavam sob o efeito da 6-

MP, os pesquisadores não encontraram resposta imune a essa proteína no sangue dos animais ⁽¹¹⁾.

No início dos anos 60, Roy Calne, motivado pelos trabalhos de Schwartz, decidiu examinar o efeito da 6-MP contra a rejeição em um cão que sofrera transplante renal. Este sobreviveu quarenta e quatro dias, embora se esperasse uma sobrevida de no máximo dez dias ⁽¹²⁾. Orientado por Hitchings e Elion, Calne continuou seus estudos com a AZA, que mostrou atividade imunossupressora superior à da 6-MP na prevenção da rejeição de transplante renal em cães ⁽¹³⁾. Em 1962 o transplante renal em seres humanos já era uma realidade, sendo que o regime de imunossupressão consistia somente de AZA e prednisona ⁽¹⁴⁾.

Em 21 de janeiro de 1965 foi realizado o primeiro transplante renal da América Latina, na Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sob a coordenação dos professores Jerônimo Geraldo de Campos Freire e Emil Sabbaga. Este paciente, que usava somente AZA, sobreviveu por dez anos, falecendo em decorrência de uma neoplasia hepática ⁽¹⁵⁾.

1.2. IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-TRANSPLANTE RENAL

Durante mais de 25 anos a imunossupressão em transplantados renais consistiu somente de AZA e corticoides, ficando conhecida como imunossupressão clássica. No final dos anos 70, o índice de sucesso dos transplantes renais era pouco maior que 50% no primeiro ano após o transplante. O surgimento de novos fármacos e novos protocolos permitiu o aumento da sobrevida desses pacientes e no final dos anos 90 esse índice já era de 93% nos três primeiros anos após o transplante ⁽¹⁶⁾.

1.2.1. CORTICOIDES

Os corticoides são largamente utilizados nas terapias imunossupressoras, em especial a prednisona e a prednisolona, importantes não só no tratamento da rejeição aguda, mas também na manutenção do transplante. Esses medicamentos atuam como anti-inflamatórios e imunomoduladores, estabilizam as membranas lisossomais, diminuem a síntese de prostaglandinas e promovem a diminuição da liberação de histamina e bradicinina, reduzindo assim a permeabilidade capilar. Além disso, diminuem a atividade de monócitos e macrófagos e a quantidade de linfócitos T CD4+ circulantes. Outro efeito notável dos corticoides é a influência na transcrição de alguns genes produtores de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas, interferons e fatores de necrose tumorais ⁽¹⁷⁾.

Inicialmente os corticoides eram administrados em doses altas, entre 2 e 4 mg/kg de peso, com grandes reações dose dependentes, sendo as principais a diabetogênese, a perda óssea, a retenção de líquidos com hipocalcemia e hipertensão, além de psicose e glaucoma. No entanto, no início dos anos 80 foram realizados estudos que compararam a evolução do transplante em pacientes que usavam altas e baixas doses do fármaco. Concluiu-se que a mortalidade e o número de episódios de rejeição eram similares em ambos os grupos, sendo que no grupo que tomava baixas doses havia significativa redução das reações adversas. Hoje em dia a terapia é iniciada com doses de 20 mg/dia, sendo reduzidas até 5 mg/dia durante a manutenção ^(18,19,20).

1.2.2. INIBIDORES DA CALCINEURINA

Os fármacos dessa classe, a ciclosporina e o tacrolimus, se ligam a proteínas intracelulares conhecidas como imunofilinas, inibindo a ativação dos linfócitos T. Em situações de normalidade, esses linfócitos entram em contato com o órgão recebido e a sinalização cálcio-dependente é iniciada, resultando na ativação da calcineurina

fosfatase. A ativação dessa enzima resulta em liberação de interferons, fatores de necrose tumorais e citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas ⁽²¹⁾.

Os inibidores da calcineurina são metabolizados pelas enzimas do citocromo P450 2A4 presentes no fígado e intestino. As primeiras formulações da ciclosporina apresentavam baixa absorção gastrointestinal e grande variação de níveis plasmáticos entre pacientes. Estudos recentes com novas formulações indicam que o valor que melhor se correlaciona com a eficácia clínica da ciclosporina é a concentração plasmática obtida após duas horas da ingestão da dose ⁽²²⁾.

Apesar dos primeiros trabalhos com a ciclosporina terem avaliado seu uso individual, foi na chamada tríplice terapia, em associação com a AZA e corticoides, que foram obtidos os melhores resultados em transplantados de rim ^(23,24).

O uso da ciclosporina está relacionado a várias reações adversas como nefrotoxicidade e hipertensão. A nefrotoxicidade é reversível após a suspensão do medicamento e é relativamente comum. Nos transplantados renais sob uso desse medicamento essa reação deve ser especialmente observada ⁽²⁵⁾. Outro inibidor da calcineurina que surgiu posteriormente, o tacrolimus (FK506), foi introduzido com a promessa de melhores resultados clínicos e menor ocorrência de reações indesejadas, como a nefrotoxicidade, quando comparado com pacientes que utilizavam ciclosporina ^(26,27).

Um estudo multicêntrico europeu comparou a taxa de rejeição nas primeiras semanas confirmada por biópsia em grupos que utilizavam dois diferentes inibidores da calcineurina, tacrolimus e ciclosporina. A rejeição aguda foi consideravelmente menor em 287 pacientes que usavam tacrolimus (19,6%) em relação à encontrada em 273 pacientes que usavam ciclosporina (37,3%). No entanto não houve diferença entre os grupos quando se avaliou a sobrevivência dos pacientes e a incidência de efeitos adversos ao longo do tempo ⁽²⁸⁾.

1.2.3. ÁCIDO MICOFENÓLICO

O micofenolato mofetil (MMF) foi aprovado pelo FDA em 1995. Posteriormente surgiu o micofenolato de sódio. Os dois medicamentos são

metabolizados no fígado e convertidos em ácido micofenólico. Este composto inibe a enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), que apresenta alta atividade nos leucócitos, inibindo a via *de novo* de biossíntese das purinas, compostos essenciais para a síntese de DNA e ácido ribonucleico (RNA) e proliferação celular. Enquanto os leucócitos só possuem essa rota para a produção das purinas, outras células são capazes de utilizar uma via alternativa, a *via de salvamento*; por esse motivo os linfócitos são mais afetados pelo bloqueio ⁽²⁹⁾.

Estudos multicêntricos avaliaram a eficácia clínica do MMF comparando grupos com dois regimes terapêuticos, com 2 e 3 g/dia, e um terceiro grupo que utilizava AZA. A ocorrência de rejeição no grupo que tomava 3 g/dia de MMF foi de 15,8%, contra 19,7% no grupo que tomava 2 g/dia e 35,5% no grupo que usava AZA. No entanto, um ano após o transplante não houve diferença significativa nas perdas do enxerto entre os grupos. A imunossupressão com doses maiores de MMF foi significativamente melhor, mas a alta incidência de reações adversas resultaram em padronização de 2 g/dia. As reações gastrointestinais, como dor abdominal e diarreia, foram os relatos mais frequentes ⁽³⁰⁾. Outras reações adversas como herpes simplex, candidíase e infecções mais severas causadas por citomegalovírus também podem ser mais comuns em comparação a grupos que usam AZA ou placebo ^(31,32).

Sollinger ⁽³³⁾ também demonstrou menor incidência de rejeição aguda nos grupos que usavam MMF 2 g/dia (31,1%) e 3 g/dia (31,3%) em relação aos que usavam AZA (47,6%), e quando houve rejeição estas foram mais brandas. Mas, novamente, após um ano do transplante não houve diferenças significativas nas perdas do enxerto e na sobrevivência entre os grupos.

1.3. USO DA AZATIOPRINA NO HCFMUSP

A AZA é comercializada no varejo na forma de comprimidos de 50 mg, sendo o Imuran[®] (Glaxo SmithKline) o produto de referência. O medicamento genérico não é encontrado no varejo, no entanto, há medicamentos similares, como o Imunen[®] (Cristália) e o Imunussuprex[®] (Sigma Pharma).

A Divisão de Farmácia do HCFMUSP adquire os comprimidos genéricos de AZA junto à Fundação para o Remédio Popular (FURP). Este medicamento é fornecido a 2423 pacientes de diversas clínicas, sendo 236 da Unidade de Transplante Renal (UTR) (Figura 5). Entre as outras clínicas que a AZA integra protocolos terapêuticos, estão a de Gastroenterologia, Hematologia, Reumatologia, Neurologia e Dermatologia.

Em geral os pacientes que usam a AZA no HCFMUSP são transplantados renais ou portadores de patologias de origem autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, hepatites autoimunes, doenças inflamatórias intestinais como colite ulcerativa (*UC - ulcerative colitis*) e doença de Chron (*CD - Chron's Disease*), leucemia linfoblástica aguda (LLA), artrite reumatoide grave e doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla.

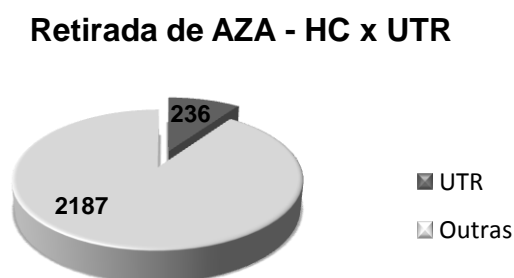


Figura 5. Total de pacientes que retiram AZA mensalmente na divisão de farmácia do HCFMUSP e fração correspondente à UTR (2009).

De acordo com as informações fornecidas pelo Serviço de Informática da UTR, entre janeiro de 1985 e fevereiro de 2009 foram realizados 2298 transplantes de rim no HCFMUSP. Atualmente são acompanhados cerca de 440 transplantados ativos, sendo que entre eles 250 recebem AZA e 190 MMF, ambos fornecidos pela Divisão de Farmácia (Figura 6).

Transplantes ativos (Fev/09)

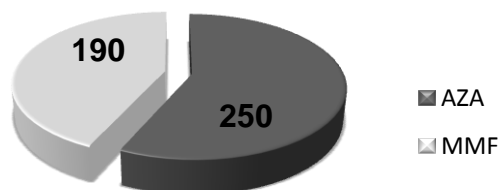


Figura 6. Transplantados renais ativos no HCFMUSP segundo imunossupressor usado. A diferença entre o número de pacientes que tomam AZA (250) e o número de pacientes que retira o medicamento na Divisão de Farmácia do HCFMUSP (236) é atribuída aos pacientes que obtêm o medicamento em outros centros ou preferem comprá-los em drogarias.

Observando-se a Tabela 1 com dados fornecidos pela Companhia de Processamento de Dados do Estado de São Paulo (Prodesp), podemos estimar os custos gerados ao HCFMUSP por esses imunossupressores, tanto por dose quanto por custo mensal do tratamento de um único paciente. Os valores foram calculados segundo custos médios dos anos de 2007 e 2008.

Tabela 1. Custo médio das terapias com AZA e MMF no HCFMUSP (2007/ 2008)

Forma farmacêutica (comprimidos)	AZA (50 mg)	MMF (500 mg)
Dose média diária	150 mg	2000 mg
Custo médio da dose unitária (R\$)	0,18	1,60
Custo médio diário (R\$)	0,54	6,40
Custo médio mensal (R\$)	16,20	192,00

Apesar dos estudos iniciais terem apontado que a eficácia clínica do MMF é superior à AZA na imunossupressão pós-transplante, novos estudos indicam que a eficácia clínica da AZA em transplantes de rim pode ser igual ou superior à do MMF^(34,35) e que a substituição do MMF pela AZA pode reduzir substancialmente os gastos com a terapêutica sem prejuízo clínico⁽³⁶⁾.

A questão do custo-benefício na terapêutica pós-transplante também foi avaliada por Remuzzi *et al.* ⁽³⁷⁾. Neste trabalho dois grupos de pacientes que recebiam AZA e MMF obtiveram evolução clínica semelhante, sendo que durante os 6 meses de duração do estudo o custo médio com o tratamento foi de € 253 para o primeiro grupo e de € 3880 para o segundo.

1.4. FARMACOCINÉTICA

A AZA é um pró-fármaco e para exercer sua função terapêutica necessita ser metabolizada e bioativada por meio de um metabolismo complexo que envolve rotas anabólicas e catabólicas. Primeiramente a molécula é convertida de forma não enzimática em 6-MP, pela clivagem do grupamento imidazol em uma reação dependente da glutatona ⁽³⁸⁾ (Figura 7). Cerca de 88% da AZA é convertida em 6-MP, que corresponde a cerca de 55% do peso molecular da AZA ⁽³⁹⁾. Após entrar nas células a 6-MP é bioativada pela ação da HPRT em 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP) que pode seguir duas rotas distintas, a metilação pela tiopurina metiltransferase (TPMT) transformando-se em 6-metiltioinosina monofosfato (6-MeTIMP) ou a conversão pela inosina-5-monofosfato desidrogenase (IMPDH) em 6-tioxantosina monofosfato (6-TXMP), que finalmente pela ação da guanidina 5-monofosfato sintetase (GMPS) forma os nucleotídeos de 6-TG (6-TGN), metabólito ativo. Esses nucleotídeos são a soma de moléculas de 6-tioguanina monofosfato (6-TGMP), 6-tioguanina difosfato (6-TGDP) e 6-tioguanina trifosfato (6-TGTP) (Figura 7) ⁽⁴⁰⁾.

Pelas rotas catabólicas a AZA pode ser inativada por duas enzimas, a TPMT e a xantina oxidase (XO). A TPMT está presente em praticamente todos os tecidos corpóreos e inativa a 6-MP pela adição de um radical metila à molécula, convertendo-a em 6-metilmercaptipurina (6-MMP). Pela ação da XO, presente principalmente no fígado e na mucosa intestinal, é formado o ácido 6-tioúrico (6-TU), eliminado pela via urinária. Esta segunda via de inativação da 6-MP pode ser parcialmente bloqueada pelo uso de alopurinol (Figura 7) ⁽⁴⁰⁾.

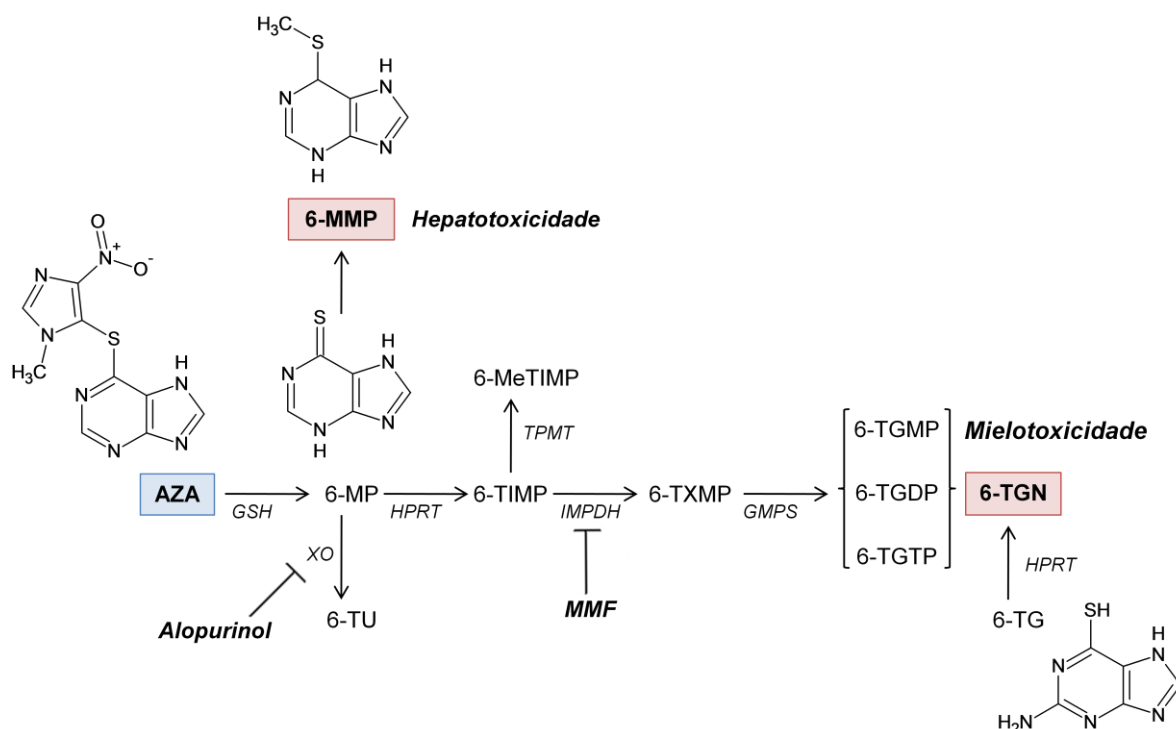


Figura 7. Representação esquemática do metabolismo da AZA: após absorção a AZA é convertida em 6-MP pela ação das GSH. A 6-MP é bioativada pela ação da HPRT em 6-TIMP que pode seguir duas rotas distintas, a metilação pela TPMT transformando-se em 6-MeTIMP ou a conversão pela IMPDH em 6-TXMP, que finalmente pela ação da GMPS forma os 6-TGN: 6-TGMP, 6-TGDP e 6-TGTP. Contudo, a AZA pode ser inativada por duas enzimas, a TPMT e XO. Pela ação enzimática da TPMT a 6-MP é inativada e convertida em 6-MMP. Pela ação da XO há formação de 6-TU. Esta segunda via de inativação da 6-MP pode ser parcialmente bloqueada pelo uso de alopurinol. Vale ilustrar que o MMF, outro imunossupressor, inibe a enzima IMPDH e portanto não pode ser utilizado concomitantemente à AZA.

A biodisponibilidade da AZA foi avaliada após administração oral e retal em voluntários sadios. A biodisponibilidade da 6-MP foi de 47% (intervalo de 27 a 83%), quando administrada na forma oral. Por via retal, não ultrapassou 7%⁽⁴¹⁾. Em estudo realizado com marcador radioativo para AZA encontrou-se mais de 50% do fármaco na urina nas primeiras 24h após a administração oral. Em amostras de fezes colhidas nas 48h seguintes encontrou-se 12% de AZA e 22% de 6-MP, aparentemente não absorvidas⁽⁴²⁾. Aproximadamente 30% da 6-MP absorvida ligam-se às proteínas plasmáticas, sendo que as meias-vidas plasmáticas da AZA e da 6-MP são curtas, variando entre 1 e 2h^(41, 42, 43, 44). No entanto, os nucleotídeos

de 6-TGN acumulam-se nos eritrócitos, com uma meia-vida que pode variar entre 3 e 13 dias^(44, 45).

Em transplantados renais o perfil farmacocinético da AZA ainda não foi totalmente avaliado, no entanto alguns estudos trazem dados relevantes. Um desses estudos relatou baixo pico plasmático e meia-vida curta da 6-MP, o que sugere a rápida conversão desta em outros metabólitos. O pico plasmático do ácido tioúrico (6-TU) foi observado após $3,5 \pm 0,6$ h após a ingestão da AZA. A forte correlação ($R^2 = 0,98$; $P = 0,0008$) entre a meia-vida do ácido 6-TU e a creatinina sérica reforça a ideia de que este metabólito, proveniente da inativação do fármaco, é primariamente excretado pelos rins. Apesar da grande variabilidade entre os níveis de 6-TGN nos indivíduos, estes não se alteram significativamente em um mesmo paciente no período de 24h, com coeficiente de variação (CV) intraindividual variando entre 4,4 e 29,8%⁽⁴⁴⁾.

Ohlman *et al.*⁽⁴⁵⁾ avaliaram a variabilidade farmacocinética por dois dias consecutivos em um grupo de dez transplantados renais em diferentes condições. O comprometimento da função renal aparentemente não afetou a farmacocinética do medicamento nesse período. Os tempos médios de meia-vida para a AZA e para a 6-MP foram de 1,7 e 1,2h, respectivamente. Não houve correlação entre a dose de AZA e a área sobre a curva (AUC - *area under curve*) (0-6h) da AZA, bem como entre a dose de AZA e a AUC (0-6h) da 6-MP. No entanto observou-se uma forte correlação entre as AUC (0-6h) da AZA e da 6-MP após duas horas da ingestão do medicamento. Quando a variabilidade farmacocinética foi analisada por dois dias consecutivos, concluiu-se que intraindividualmente não é estatisticamente diferente, sendo maior a variabilidade interindivíduos.

Lennard *et al.*⁽⁴⁶⁾ investigaram por seis meses a variação intraindividual dos metabólitos 6-MP e 6-TGN em 37 transplantados com função renal estável. Os autores não observaram grande variação nos níveis plasmáticos destes metabólitos. No decorrer do período avaliado a concentração plasmática da 6-MP variou de 66 a 209 pmol/mL e as concentrações de 6-TGN de 30 a 425 pmol/ 8×10^8 RBC.

Lin *et al.*⁽⁴⁷⁾ avaliaram o perfil farmacocinético do uso de AZA intravenosa e encontraram o pico de concentração plasmática da AZA de 0,6 µg/mL após 15 minutos da injeção de doses que variaram de 100 a 200 mg. Após 90 minutos a concentração diminuiu, chegando a 10 ng/mL. Ao analisar a concentração

plasmática da AZA após dose oral de 100 mg esse pico não foi encontrado, o que sugere que este é menor que o limite de detecção do método cromatográfico utilizado nesse estudo, de 0,5 ng/mL.

1.5. POLIMORFISMO GENÉTICO DA TPMT

A TPMT é uma enzima citoplasmática, responsável pela metilação das tiopurinas. Não se conhece nenhum substrato natural para esta enzima, bem como a sua função biológica. O polimorfismo genético da TPMT foi primeiramente descrito por Weinshilboum & Sladek ⁽⁴⁸⁾, estes pesquisadores mediram a atividade da TPMT em 298 americanos de origem caucasiana. Entre esses indivíduos 88,6% apresentaram atividade enzimática alta, 11,1% atividade enzimática intermediária e 0,3% atividade enzimática nula. O alelo selvagem (*wild type*), o de maior prevalência entre as populações, primeiramente identificado foi denominado TPMT*1. Com cerca de 34 kb de comprimento, 10 éxons e 9 íntrons, o gene está localizado na banda p22.3 do cromossomo 6 ⁽⁴⁹⁾. A identificação dos alelos responsáveis pelo polimorfismo desta enzima vem sendo realizada por diversos pesquisadores em todo o mundo. Atualmente tem-se o conhecimento de 25 alelos, sendo os alelos mutantes mais comuns o TPMT*2, TPMT*3A e TPMT*3C ⁽⁵⁰⁾.

Reis *et al.* ⁽⁵¹⁾ realizaram um trabalho no Instituto Nacional do Câncer (INCA) em que foram analisados o fenótipo e o genótipo da TPMT em 303 indivíduos sadios da população brasileira. Estes indivíduos foram classificados segundo sua ancestralidade autodeclarada, como eurodescendentes (n = 81), afrodescendentes (n = 18) ou mestiços (n = 204). A atividade da TPMT apresentou distribuição trimodal, exibindo indivíduos com fenótipos para atividade enzimática alta (89,9%), intermediária (9,8%) e baixa (0,3%). As frequências dos alelos TPMT*2, TPMT*3A e TPMT*3C não diferiram entre indivíduos classificados como eurodescendentes (0,76%, 2,03% e 2,54%, respectivamente) e mestiços (0,60%, 1,81% e 1,81%, respectivamente). Além disso, dentro de cada um destes grupos, as frequências dos alelos TPMT*3A e TPMT*3C não foram significativamente diferentes.

A relação entre o polimorfismo dos genes que codificam a TPMT, as reações adversas atribuídas à AZA e a evolução clínica dos transplantados foi estudada em poucos trabalhos. A contribuição do polimorfismo da TPMT nas reações de mielotoxicidade induzidas pela AZA foi investigada em 122 transplantados renais. Os casos de leucopenia nos pacientes heterozigotos para algum gene de baixa metabolização e nos homozigotos para o tipo selvagem foram significativamente diferentes, sendo de 53,8% e 23,5%, respectivamente. Houve severa leucopenia em um paciente homozigoto composto (3A/*3C). O estudo sugere que 12,5% dos casos de leucopenia em transplantados renais são causados por mutações no gene da TPMT ⁽⁵²⁾.

Em estudo recente, Xin *et al.* ⁽⁵³⁾ investigaram a relação entre a atividade enzimática da TPMT, seu polimorfismo genético e o surgimento de reações adversas ao uso da AZA em 150 transplantados renais. Em 30 (20%) destes pacientes foi necessária a redução da dose ou suspensão do medicamento devida à ocorrência de reações adversas. O alelo mutante *3C foi encontrado em sete (4,7%) pacientes, que apresentaram atividades enzimáticas inferiores dos pacientes com somente o alelo selvagem. Entre os pacientes com o alelo mutante *3C, dois apresentaram mielotoxicidade e dois, hepatotoxicidade.

As frequências dos alelos da TPMT (TPMT*2, *3A, *3B e *3C) e a associação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento de reações adversas foram avaliadas em 122 pacientes chineses transplantados renais. Os dados clínicos e bioquímicos foram avaliados retrospectivamente após o transplante renal. Dos 122 pacientes, nenhum era heterozigoto para os alelos TPMT*2, *3A, *3B ou homozigoto para TPMT*3C. Oito desses pacientes (3,28%) eram heterozigotos para o alelo TPMT*3C sendo que quatro apresentaram mielotoxicidade. Apenas um paciente que não era heterozigoto para o alelo TPMT*3C apresentou mielotoxicidade. Esses resultados sugerem que a genotipagem dos principais alelos da TPMT pode ser uma ferramenta importante na otimização da terapia com AZA ⁽⁵⁴⁾.

Um estudo realizado em 134 pacientes brasileiros por Chocair *et al.* ⁽⁵⁵⁾ avaliou a variação da atividade enzimática da TPMT em indivíduos de diferentes origens, que se autodeclararam brancos (n = 33), negros (n = 39), japoneses (n = 32) e mulatos (n = 30). A atividade da enzima apresentou distribuição bimodal nas diferentes populações, o que demonstra o polimorfismo genético. A população de

japoneses não apresentou distribuição polimórfica, indicando que são homozigotos para algum alelo de metilação rápida (Figura 8).

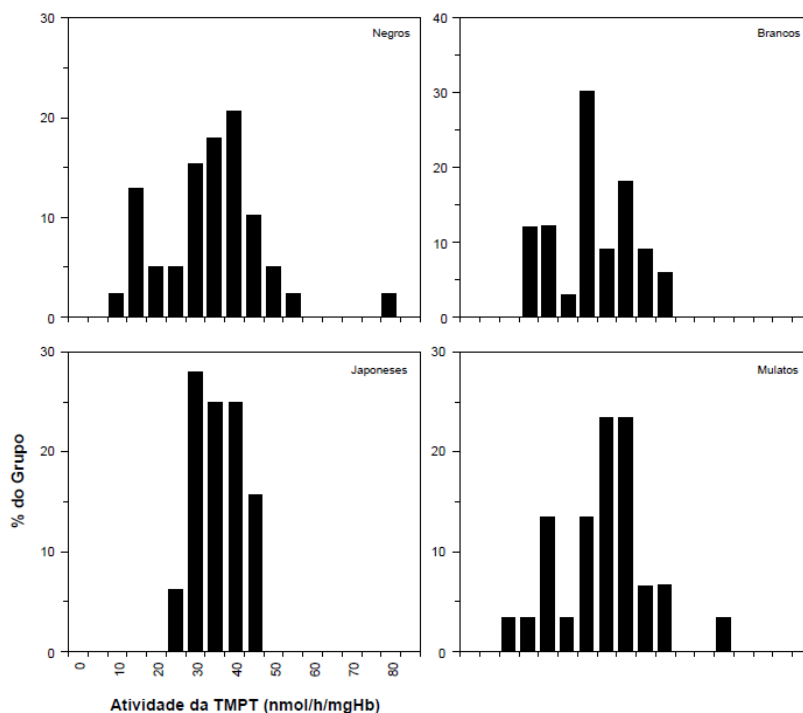


Figura 8. Distribuição da atividade da TPMT nas diferentes populações de brasileiros. Adaptado de Chocair *et al.* ⁽⁵⁵⁾.

Evidentemente a grande variação interindividual da atividade da TPMT em todas as populações tem importantes implicações em relação ao sucesso da terapia com AZA, já que a alta atividade enzimática reduz a disponibilidade de 6-MP e consequentemente de 6-TGN. Essa importância pode ser evidenciada em um estudo brasileiro que mediu a atividade enzimática da TPMT em 68 transplantados de rim. Neste estudo apenas três pacientes apresentaram total intolerância à AZA, sendo que dois desses tinham atividade enzimática muito baixa. O terceiro caso de intolerância foi atribuído ao uso concomitante de clotrimazol. Ainda neste estudo, entre os 29 pacientes que receberam rim de doador cadavérico e tomavam apenas AZA e prednisona, 24 apresentaram melhor evolução clínica relacionada com a atividade enzimática da TPMT significativamente menor que nos outros cinco pacientes do mesmo grupo. Entre o grupo de 30 pacientes que recebiam AZA,

prednisona e ciclosporina foram encontradas na mesma associação inversa entre a atividade da TPMT e evolução clínica do enxerto; menor a atividade da TPMT, melhor a evolução do transplante ⁽⁵⁶⁾.

A relação entre a variação intraindividual da atividade da TPMT e os episódios de rejeição também foi investigada em crianças transplantadas renal. Em 22 pacientes a variação da atividade da TPMT medida no primeiro e no trigésimo dia após o transplante foi maior em 10 pacientes que apresentaram algum episódio de rejeição quando comparada aos 12 pacientes que não apresentaram sinais de rejeição nos três primeiros meses e no primeiro ano. Esses dados sugerem que a atividade enzimática da TPMT aumenta nos primeiros meses pós-transplante e esse aumento da inativação da 6-MP está relacionado à evolução insatisfatória do transplante ⁽⁵⁷⁾.

O polimorfismo da TPMT também influencia a dose de AZA após o transplante renal. Fabre *et al.* ⁽⁵⁸⁾ analisaram 172 pacientes que recebiam doses iniciais de 1,5 mg/Kg/dia. Foram encontrados 12 indivíduos com um alelo mutante para o gene que codifica a TPMT, 11 mutações *3A e uma *3C. Entre esses, 58% necessitaram de redução de dose por conta de episódios de leucopenia, enquanto no grupo de pacientes sem mutação 30% necessitaram de redução da dose pelo mesmo motivo.

1.6. TOXICIDADE

Após décadas de uso as reações adversas relacionadas ao uso da AZA são bem conhecidas e documentadas. Dezenas de trabalhos descrevem reações relacionadas principalmente aos altos níveis intraeritrocitários de 6-TGN e 6-MMP.

A mielotoxicidade é o principal efeito adverso relacionado aos níveis de 6-TGN ^(56,59), que pode se manifestar na forma de anemia, plaquetopenia, leucopenia e mais raramente leucopenia severa e pancitopenia ^(60,61).

Os episódios de mielossupressão podem acontecer em cerca de 7% dos casos e em sua maior parte estão associados à baixa atividade enzimática da TPMT ^(62,63). Um estudo publicado em 2009 avaliou a presença do genótipo TPMT*1/*3C e

a ocorrência de episódios de mielossupressão induzida pela AZA em 139 transplantados renais. Concluiu-se que os pacientes portadores desse genótipo apresentam chances significativamente maiores de manifestarem o efeito tóxico ⁽⁶⁴⁾.

A associação inadvertida de AZA e alopurinol geralmente resulta em episódios de mielossupressão, conforme demonstrou um estudo retrospectivo que avaliou 24 transplantados de pulmão e coração. Nesses pacientes, a ocorrência desses episódios não foi completamente abolida mesmo com a dose de AZA reduzida em um terço da dose usual, como recomenda a literatura ⁽⁶⁵⁾.

Outras reações inesperadas menos frequentes já foram observadas. O uso de AZA já foi associado ao surgimento de leucemia mieloide aguda em um paciente com doença de Crohn e deficiência na atividade enzimática da TPMT ⁽⁶⁶⁾. O mesmo já foi observado em transplantados de diferentes órgãos ⁽⁶⁷⁾. Em transplantados renais a leucemia mieloide crônica (LMC) foi associada ao uso de AZA em um grupo de 11 pacientes, entre eles uma criança que fazia uso concomitante de hormônio do crescimento, o que provavelmente contribuiu para o surgimento da leucemia ⁽⁶⁸⁾.

Em relação à 6-MMP o principal efeito tóxico conhecido é a hepatotoxicidade ⁽⁶⁹⁾, atribuída à depleção dos níveis hepáticos de GSH. Em cultura celular de hepatócitos de ratos, baixos níveis de GSH resultaram em lesão mitocondrial e na morte celular por necrose. Neste experimento a adição de GSH às culturas protegeu as células, possivelmente por esta ser responsável pela eliminação da 6-MMP formada durante o metabolismo da AZA. A adição de alopurinol às culturas também reduziu as lesões celulares, nesse caso por diminuir a formação de 6-MMP ^(70,71).

A relação entre a hepatotoxicidade e os níveis de 6-MMP não está completamente esclarecida. Alguns autores sugerem que essa relação deve ser monitorada através da avaliação do perfil de enzimas hepáticas, como as aminotransferases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) ⁽⁷²⁾.

Outros bioindicadores como a fosfatase alcalina (ALP), a gama-glutamil transferase (GGT) e a bilirrubina também podem ser indicativos de hepatotoxicidade quando a monitorização dos níveis de 6-MMP não estiverem disponíveis. Gisbert *et al.* ⁽⁷³⁾ monitoraram 786 pacientes portadores de doença inflamatória intestinal (IBD - *inflammatory bowel disease*) durante cinco anos e encontraram em 15% dos pacientes

valores acima dos considerados normais para essas enzimas e, em 5%, valores duas vezes superiores aos níveis considerados normais.

A hepatotoxicidade associada ao uso de AZA também foi relatada em um paciente transplantado renal há mais de 30 anos e portador de hepatite C. Neste caso o comprometimento das funções metabólicas do fígado certamente contribuiu para o desenvolvimento dos efeitos tóxicos ⁽⁷⁴⁾.

A ocorrência de hepatotoxicidade e colestase pelo uso da AZA também foi associada aos altos níveis do metabólito 6-MMP em dois pacientes transplantados de fígado. Com a suspensão do medicamento esses efeitos desapareceram em poucas semanas ⁽⁷⁵⁾. Entretanto um episódio fatal de toxicidade hepática e colestase já foi documentado em transplantados de fígado ⁽⁷⁶⁾.

1.7. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais mais sensíveis e específicas tornou possível a dosagem dos medicamentos imunossupressores nos fluidos biológicos. Algumas vezes é possível determinar a concentração do fármaco em seu sítio de ação, como o metabólito ativo 6-TGN, reduzindo assim a influência das variações farmacocinéticas.

A monitorização terapêutica de fármacos (*TDM - therapeutic drug monitoring*) permite a individualização da dose do medicamento, ao contrário da dose padronizada em mg/kg de massa corporal. A TDM também possibilita a adequação dos níveis do metabólito 6-TGN à faixa terapêutica, a manutenção das concentrações de 6-TGN e de 6-MMP em níveis em que as reações adversas sejam mais raras e também a identificação dos casos de não aderência ao tratamento.

A TDM é indicada para fármacos que possuam as seguintes características ⁽⁷⁷⁾:

- Correlação entre a concentração do fármaco e o efeito terapêutico;
- Estreita faixa terapêutica, isto é, pequenas variações nas doses podem causar reações adversas graves;
- Significativas diferenças metabólicas entre indivíduos;

- Efeito terapêutico difícil de ser distinguido das reações adversas;

Apesar de existirem poucos estudos que avaliam a TDM para a AZA, as variáveis metabólicas e os efeitos adversos dose-dependentes evidenciam a importância da sua monitorização terapêutica.

O primeiro estudo que analisou a importância da TDM da AZA em transplantados renais foi publicado somente em 1994 por Bergan *et al.* ⁽⁷⁸⁾. Acompanharam-se os níveis de 6-TGN intraeritrocitários em 65 pacientes desde o dia do transplante até cerca de dois meses após. Os pacientes foram separados em dois grupos de acordo com os níveis de 6-TGN, sendo: 15 pacientes com resultados superiores a $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (média de $552 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e 50 com resultados inferiores a $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (média de $82 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$). A maior ocorrência de mielotoxicidade em pacientes com resultados superiores a $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ reforçou a hipótese de que esta reação teria sido causada pelos altos níveis de 6-TGN.

O mesmo grupo que apresentou este estudo pioneiro publicou outros dois trabalhos avaliando a monitorização dos níveis de 6-TGN em transplantados renais. No segundo o objetivo dos autores era estabelecer a correlação entre a variabilidade da atividade da TPMT e os níveis de 6-TGN, bem como a influência sobre os episódios de rejeição. Compararam-se os resultados em dois grupos de pacientes: um de 39 pacientes que recebiam AZA de acordo com a massa corpórea, correspondente a 3 mg/kg nos primeiros dias pós-transplante e redução para o uso contínuo de 1 mg/kg na manutenção, e um de 43 pacientes que recebiam dosagens mais elevadas, correspondentes a 3 mg/kg de massa. Os autores não encontraram uma correlação inversa entre a atividade da TPMT e as concentrações de 6-TGN. Além disso, doses maiores de AZA não foram suficientes para elevar os níveis de 6-TGN até as concentrações desejadas (entre 100 e $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$). A mediana dos níveis de 6-TGN foi semelhante nos dois grupos, assim como a incidência de episódios de rejeição. Com base nestes resultados os autores sugerem que, para o desenvolvimento da terapêutica imunossupressora, o uso de doses mais altas de AZA deve ser avaliado em conjunto com a monitorização dos níveis intraeritrocitários da 6-TGN ⁽⁷⁹⁾.

No terceiro trabalho destes pesquisadores, 360 pacientes que recebiam ciclosporina, corticoides e AZA foram separados aleatoriamente em dois grupos. Um usava baixas doses de AZA: 3 mg/kg no dia do transplante, em seguida, 2 mg/kg na primeira semana e 1 mg/kg nos dias subsequentes. O outro usava altas doses de AZA: 5 mg/kg diários. Uma vez estabelecido o esquema terapêutico a dose era ajustada para manutenção das concentrações de 6-TGN entre 100 e 200 pmol/8 x 10⁸ RBC. As concentrações eram medidas duas vezes por semana. A incidência de episódios de rejeição primária foi 21% menor no grupo que tomava doses mais altas de AZA, sendo de 49,4% neste grupo e de 62,8% no grupo que tomava doses menores. A concentração de 6-TGN também foi significativamente maior no grupo que tomava doses maiores de AZA durante os primeiros meses e a redução dos episódios de rejeição ocorreu no mesmo período. Esses resultados sugerem que podem ser utilizadas doses mais altas de AZA na terapia triplíce a fim de se obter uma significativa redução dos episódios de rejeição aguda, desde que os níveis de 6-TGN sejam monitorados, mantendo-se a mielotoxicidade dentro de limites aceitáveis ⁽⁸⁰⁾.

Outro estudo realizado em transplantados renais avaliou o metabolismo da AZA através da monitorização das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e de 6-MMP em dois grupos. Um era formado por 27 transplantados renais, saudáveis, e o outro por 10 transplantados renais acometidos de glomerulonefrite. Seis pacientes do primeiro grupo receberam alopurinol juntamente com a AZA e 21 somente AZA. As medianas das concentrações dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP nos 21 receptores de transplante renal (sem alopurinol) foram de 122 pmol/8 x 10⁸ RBC (intervalo de <60 a 298 pmol/8 x 10⁸ RBC) e 280 pmol/8 x 10⁸ RBC (intervalo de <150 a 1330 pmol/8 x 10⁸ RBC), respectivamente. Não houve correlação entre as concentrações dos dois metabólitos. Quando esse grupo foi dividido em dois subgrupos que recebiam diferentes doses de AZA (100 ou 50 mg/dia), as medianas das concentrações de 6-TGN não apresentaram diferenças significativas: 131 e 122 pmol/8 x 10⁸ RBC ⁽⁸¹⁾.

Nos pacientes que receberam alopurinol a mediana das concentrações de 6-TGN apresentou significativo aumento em comparação ao grupo sem alopurinol, mesmo com redução da dose de AZA. Os valores encontrados foram 363 (intervalo de 129 a 623 pmol/8 x 10⁸ RBC) e 122 pmol/8 x 10⁸ RBC (p <0,004),

respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de 6-MMP em ambos os grupos ⁽⁸¹⁾.

No grupo de transplantados saudáveis houve uma correlação negativa significativa entre a contagem de glóbulos brancos e a concentração de 6-TGN ($r = -0,59$, $p < 0,005$). No grupo de pacientes com glomerulonefrite ($n = 10$) os valores das medianas das concentrações de 6-TGN e de 6-MMP foram de $108 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (intervalo de 0 a $297 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e $420 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ (intervalo de 0 a $1440 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$), respectivamente. Nesse grupo não foram encontradas correlações significativas entre a contagem de glóbulos brancos e as concentrações de 6-TGN ou entre as concentrações de 6-TGN e de 6-MMP ⁽⁸¹⁾.

Outro benefício da monitorização terapêutica da AZA é a possível identificação de pacientes que não aderem ao tratamento, já que esta é uma causa conhecida de intercorrências na evolução dos transplantes renais. A adesão de 180 pacientes transplantados de rim foi analisada nos seis primeiros meses pós-transplante por Nevins *et al.* ^(82, 83). Os autores observaram que a adesão ao tratamento variou de 16 a 100% entre os indivíduos e 18% destes pacientes deixaram de tomar o medicamento por quatro ou mais dias em um único mês. A baixa adesão nos primeiros 90 dias foi considerada importante fator de rejeição. O grupo de pacientes que apresentou os menores índices de adesão teve maior probabilidade de rejeição aguda (13,9%; IC = 95%, $p = 0,001$) e de perda do órgão (4,3%; IC = 95%, $p = 0,032$) ⁽⁸²⁾. Quando estes mesmos 180 pacientes foram acompanhados por um tempo médio de 8,7 anos após o transplante, os resultados foram semelhantes. Quanto menor adesão inicial ao tratamento, com maior falha e maior intervalo entre as doses, maior a probabilidade de rejeição, perda do rim e morte ⁽⁸³⁾.

1.8. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS

Não existem conjuntos de diagnóstico disponíveis comercialmente para a quantificação dos metabólitos da AZA. Vários métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *high performance liquid chromatography*) já foram descritos

para a determinação da 6-TGN e da 6-MMP. A maioria dos métodos envolve hidrólise ácida a altas temperaturas para a liberação dos nucleotídeos em suas bases livres, seguida de um processo de extração e posterior injeção no cromatógrafo e detecção ultravioleta-visível (UV-Vis). As principais diferenças entre os métodos encontrados na literatura estão no preparo da amostra, hidrólise e extração e no tipo de detector utilizado (Tabela 2).

A primeira metodologia descrita para a monitorização terapêutica dos níveis intraeritrocitários de 6-TGN foi desenvolvida por Lennard & Maddocks⁽⁸⁴⁾ e serviu como base para o desenvolvimento de outros métodos e para a busca do estabelecimento dos intervalos terapêuticos no tratamento com a AZA.

Em 1987 Lennard⁽⁸⁵⁾ descreveu um método em que foi possível analisar por HPLC-UV o metabólito ativo 6-TGN. Neste, o cromatograma mostrou um pico desconhecido com tempo de retenção em 12,5 minutos. Inicialmente, achou-se que este seria um composto intraeritrocitário endógeno só detectado com a adição de acetato de fenil mercúrio (AFM) e aquecimento da amostra durante o processo de extração.

Lennard & Singleton⁽⁸⁶⁾ continuaram seus estudos com purinas e padronizaram a primeira metodologia para a quantificação simultânea dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP por HPLC-UV. Neste trabalho foi possível identificar o pico até então “desconhecido” no trabalho anterior, sendo o comprimento de onda fixado em 322 nm. Tratava-se do metabólito 6-MMP, que nesta metodologia foi detectado em 303 nm.

No fim dos anos 90, Dervieux & Boulieu⁽⁸⁷⁾ padronizaram uma metodologia para a quantificação simultânea dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP por HPLC-UV, em que o sangue era coletado em tubos com heparina e ditioneitol (DTT). Neste método as etapas de lavagem e preparo da amostra foram simplificadas.

Como o intuito de otimizar o método para a quantificação simultânea dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP por HPLC-UV, Pike *et al.*⁽⁸⁸⁾ padronizaram uma metodologia para a quantificação desses compostos em sangue total⁽⁸⁸⁾. O primeiro método padronizado no Brasil para a quantificação simultânea dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP por HPLC-UV foi publicado somente em 2004⁽⁸⁹⁾.

Em relação à cromatografia de fase líquida acoplada a um detector de massas (*LC-MS - liquid chromatography-mass spectrometry*), um único estudo publicado em 2005 apresentou a quantificação simultânea dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP. Nesse trabalho as fases pré-analíticas se assemelham às realizadas em HPLC-UV pelo mesmo grupo de pesquisadores ⁽⁸⁷⁾. Os autores compararam a metodologia LC-MS com o método desenvolvido por Lennard e Singleton ⁽⁸⁶⁾ e por meio da regressão Deming concluiu-se que os métodos podem ser considerados equivalentes ⁽⁹⁰⁾ (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo das características dos métodos descritos para a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA em amostras colhidas com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA).

Ref.	Técnica/ Detector	λ 6-TGN/ 6-MMP (ηm)	Extração e hidrólise
(84)	Espectrofluorimetria/ Fluorescência	342/-	Solução de Hanks, DTT, ácido sulfúrico, NaOH, tolueno, pentanol, AFM e HCl
(85)	HPLC-UV	342/-	Solução de Hanks, DTT, ácido sulfúrico, NaOH, tolueno, pentanol, AFM e HCl
(86)	HPLC-UV/ Arranjo de diodos	342/303	Solução de Hanks, DTT, ácido sulfúrico, NaOH, tolueno, pentanol, AFM e HCl
(88)	HPLC-UV/ Fluorescência e arranjo de diodos	330 (ex) e 410 (em)/288	DTT, ácido sulfúrico, ácido perclórico e diclorometano
(89)	HPLC-UV/ Arranjo de diodos	342/303	Solução de Hanks, ácido perclórico e DTT
(90)	LC-MS/Triplo-quadrupolo	168→151/ 158→110 m/z	DTT, NaCl (0,9%), ácido perclórico

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação dos metabólitos intraeritrocitários da azatioprina, 6-TGN e 6-MMP, por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV);
- Estabelecer os níveis desses metabólitos em uma população de transplantados renais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. CONSUMÍVEIS

Tubos de poliestireno (12 x 75 mm)	Alfa (São Paulo, Brasil)
Microtubos de polipropileno (1,5 mL)	Brand (Essex, Inglaterra)
Tubo Vacutainer com EDTA (4 mL)	BD (Franklin Lake, EUA)
Seringa (5 mL)	BD (Franklin Lake, EUA)
Unidade filtrante para seringa (0,45 µm, 13 mm)	Millipore (Bedford, EUA)
Membrana filtrante (0,5 µm, 47 mm)	Millipore (Bedford, EUA)
Ponteiras descartáveis	EasyPath (São Paulo, Brasil)
<i>Vial</i> de borosilicato com tampa (1,5 mL, 12 x 32 mm)	Sun Sri (Rockwood, EUA)
<i>Insert</i> de borosilicato (0,2 mL)	Sun Sri (Rockwood, EUA)
Coluna HPLC Inertsil ODS 3 (5 µm, 150 x 4,6 mm)	Alltech (Deerfiel, EUA)

3.1.2. VIDRARIA

Balões volumétricos de 10, 25, 100, 250 e 1000 mL

Sistema de filtração a vácuo para soluções

3.1.3. EQUIPAMENTOS

Balança analítica Adam	Adam Equipment (Buckinghamshire, Reino Unido)
pHmetro Mettler	Mettler Toledo (São Paulo, Brasil)
Centrífuga para microtubos	Abbott (Illinois, EUA)
Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R	Eppendorf (Hamburg, Alemanha)
Banho-maria seco Nova Ética 330/2D	Nova Ética (São Paulo, Brasil)
Banho ultrassom Thornton	Thornton (São Paulo, Brasil)
Agitador vórtex	Quimis (São Paulo, Brasil)
Pipeta Finnpiptete (40 – 200 µL)	Thermo (Waltham, EUA)
Pipeta Research (100 – 1000 µL)	Eppendorf (Hamburg, Alemanha)
Pipeta Transferpette (0,5 – 5,0 mL)	Brand (Essex, Inglaterra)
Congelador	Brastemp (São Paulo, Brasil)
Refrigerador	Brastemp (São Paulo, Brasil)
Sistema de purificação de água Milli-Q	Millipore (Bedford, EUA)
Contador hematológico XT-Sysmex 1800i	Sysmex (Kobe, Japão)
HPLC	Shimadzu (Kioto, Japão)

A cromatografia é uma técnica de separação baseada na distribuição dos compostos de uma mistura entre a fase móvel (tampão) e a fase estacionária (coluna cromatográfica). A distribuição destes compostos está fundamentada nas diferentes interações químicas entre a fase móvel e a coluna.

Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna de fase reversa Inertsil ODS-3 (150 x 4,6 mm, 5 µm) Alltech. O equipamento de HPLC utilizado é composto de duas bombas de alta pressão LC-10AD, controlador de gradiente SCL-10A, forno CTO-10A (não utilizado), controlador CBM-20A, injetor automático SIL-10A, detectores UV-Vis SPD-10AV e de fluorescência RF-535 (não utilizado) e *software* operacional LC Solution (Figura 9).



Figura 9. Equipamento HPLC modular utilizado nos experimentos, composto dos seguintes itens: reservatório da fase móvel A (A), reservatório da fase móvel B (B), coletor de resíduos (C), registro do gás hélio do degaseificador (D), controlador (E), bomba da fase móvel A (F), bomba da fase móvel B (G), forno onde está localizada a coluna (H), injetor automático (I), detector UV-Vis (J), detector de fluorescência (L), computador com *software* operacional (M), impressora para os cromatogramas (N).

3.1.4. REAGENTES

6-TGN \geq 96%	Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA)
6-MMP \geq 96%	Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA)
DTT > 99%	Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA)
NaCl 99%	Synth (São Paulo, Brasil)
NaOH 97%	Nuclear (São Paulo, Brasil)
Fosfato de potássio monobásico 99%	Vetec (Rio de Janeiro, Brasil)
HCl 37%	IMPEX (São Paulo, Brasil)
Ácido perclórico 70 – 72%	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ácido orto-fosfórico 85%	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Metanol HPLC 99,8%	Nuclear (São Paulo, Brasil)

Os compostos 6-TGN, 6-MMP e o DTT usados no preparo dos padrões apresentavam grau de pureza analítica, assim como os demais reagentes: cloreto de sódio, hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, ácido clorídrico, ácido perclórico e ácido orto-fosfórico. O metanol utilizado era de grau HPLC.

Durante todos os experimentos utilizou-se água Grau I purificada em sistema Milli-Q.

3.2. MÉTODO

3.2.1. PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS SOLUÇÕES

a) Solução padrão de 6-TGN 200 µg/mL

Após pesagem de 0,005 g de 6-TGN em balança analítica, dissolveram-se em 1 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e água q.s.p. 25 mL em balão volumétrico. Foram separadas alíquotas de 1 mL em tubos de poliestireno com tampa conservados em congelador (-15 a -25 °C).

b) Solução padrão de 6-MMP 200 µg/mL

Após pesagem de 0,005 g de 6-MMP em balança analítica, dissolveram-se em 1 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e água q.s.p. 25 mL em balão volumétrico. Foram separadas alíquotas de 1 mL em tubos de poliestireno com tampa conservados em congelador (-15 a -25 °C).

c) Soluções intermediárias de 6-TGN e 6-MMP 20 µg/mL

Diluiu-se em balão volumétrico a solução estoque com água na proporção de 1 mL de solução estoque para 10 mL de volume final de solução intermediária. Foram separadas alíquotas de 1 mL em tubos de poliestireno com tampa conservados em congelador (-15 a -25 °C).

d) Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Após pesagem de 4,12 g de hidróxido de sódio (97%) em balança analítica, dissolveram-se em água q.s.p. 100 mL em balão volumétrico. Acondicionou-se em frasco plástico leitoso à temperatura ambiente (21 a 23 °C).

e) Solução de ácido clorídrico 0,1 M

Diluíram-se em balão volumétrico 0,83 mL de ácido clorídrico (37%) em água q.s.p. 100 mL. Acondicionou-se em frasco âmbar à temperatura ambiente (21 a 23 °C).

f) Solução de cloreto de sódio 0,9%

Após pesagem de 9,0 g de cloreto de sódio em balança analítica, dissolveram-se em água q.s.p. 1000 mL em balão volumétrico. Acondicionou-se em frasco plástico leitoso em refrigerador (2 a 8 °C).

g) Solução de DTT 3,0 mg/mL

Após pesagem de 30,0 mg de DTT em balança analítica, dissolveram-se em água q.s.p. 10 mL em balão volumétrico. Acondicionou-se em frasco âmbar em refrigerador (2 a 8 °C).

h) Solução de ácido orto-fosfórico 0,1 M

Diluíram-se em balão volumétrico 0,67 mL de ácido orto-fosfórico (85%) em água q.s.p. 100 mL. Acondicionou-se em frasco âmbar à temperatura ambiente (21 a 23 °C).

i) Solução de fosfato de potássio monobásico 1,0 M

Após pesagem de 13,6 g de fosfato de potássio monobásico em balança analítica, dissolveram-se em água q.s.p. 100 mL em balão volumétrico. Acondicionou-se em frasco plástico leitoso à temperatura ambiente (21 a 23 °C).

j) Tampão fosfato 0,02 M pH \cong 3

Diluíram-se em balão volumétrico 20 mL de solução de fosfato de potássio monobásico 1 M, 10 mL de ácido orto-fosfórico 0,1 M com aproximadamente 500 mL de água. Mediu-se o pH e quando necessário ajustou-se para aproximadamente 3 com ácido orto-fosfórico 0,1 M. Completou-se com água q.s.p.1000 mL. Filtrou-se em sistema de filtração a vácuo com membrana filtrante (0,5 μ m, 47 mm). Acondicionou-se em frasco plástico leitoso em refrigerador (2 a 8 °C).

3.2.2. PREPARO DA PAPA DE HEMÁCIAS (BRANCO)

Amostras de sangue de alguns indivíduos que não estavam em terapia com AZA foram coletadas em tubo contendo EDTA e centrifugadas à velocidade de 160 g, por 10 minutos, à temperatura 4 °C. O plasma foi descartado e os leucócitos, plaquetas e a camada superior de eritrócitos foram removidos com pipeta. As amostras foram lavadas duas vezes com solução salina de NaCl (0,9%), repetindo-se entre as lavagens as condições de centrifugação acima citadas. Depois desse processo as diferentes papas de hemácias foram misturadas formando-se um pool ou branco, utilizado para o preparo dos calibradores e dos controles de qualidade.

3.2.3. PREPARO DOS CALIBRADORES

Os calibradores foram preparados em papa de hemácias para se reproduzir as condições da matriz onde seriam analisados os metabólitos. Para a construção das curvas analíticas foram preparados calibradores em sete níveis diferentes, nas concentrações de 0,30, 2,99, 14,95, 29,90, 44,56, 59,81, 89,71 μ mol/L para a 6-TGN e 0,31, 3,13, 15,64, 31,29, 46,93, 62,58, 93,86 μ mol/L para a 6-MMP.

3.2.4. PREPARO DOS CONTROLES DE QUALIDADE

Durante a validação e as análises das amostras dos pacientes foram utilizados controles de qualidade preparados em papa de hemácias para se reproduzir as condições da matriz onde seriam analisados os metabólitos. Foi preparado um controle misto nas concentrações de 2,42 $\mu\text{mol/L}$ (faixa de aceitação de 2,19 a 2,65 $\mu\text{mol/L}$) para a 6-TGN e de 50,46 $\mu\text{mol/L}$ (faixa de aceitação de 45,45 a 55,67 $\mu\text{mol/L}$) para a 6-MMP.

As faixas de variação aceitáveis foram determinadas através da análise seriada de 20 amostras. Após a determinação das médias e desvios padrão (DP), foram considerados como aceitáveis os resultados compreendidos entre a média e dois DP. A evolução dos controles de qualidade durante as análises foi evidenciada e acompanhada através do gráfico de Levey-Jennings.

3.2.5. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas por punção venosa em tubos de 4 mL contendo EDTA e rapidamente centrifugadas à velocidade de 160 g, por 10 minutos, à temperatura 4 °C. O plasma foi descartado e os leucócitos, plaquetas e a camada superior de eritrócitos foram removidos com pipeta. As amostras foram lavadas duas vezes com solução salina de NaCl (0,9%), repetindo-se entre as lavagens as condições de centrifugação acima citadas. Separou-se uma alíquota de 500 μL da amostra, encaminhada para o Serviço de Hematologia para contagem de eritrócitos em contador hematológico automatizado. O restante da amostra foi armazenado em congelador (-15 a -25 °C) até o momento das análises.

3.2.6. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Após descongelamento e homogeneização da amostra transferiram-se 400 μL dos eritrócitos lavados para um micro tubo de 1,5 mL e adicionaram-se 100 μL de solução de DTT 3 mg/mL. A desproteíntização foi realizada adicionando-se 100 μL de ácido perclórico 70% (v/v), e após homogeneização centrifugou-se a 3000 g à temperatura ambiente (21 a 23 $^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado, acondicionado em *vial* de borosilicato com tampa e em seguida aquecido em banho-maria seco a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 45 minutos para completar a hidrólise ácida dos nucleotídeos em suas bases livres. Depois de resfriada à temperatura ambiente (21 a 23 $^{\circ}\text{C}$), com o auxílio de uma seringa, a amostra foi filtrada em filtro com membrana (0,45 μm , 13 mm) e acondicionada em *vial* de borosilicato com *insert* de 200 μL .

3.2.7. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a eluição dos metabólitos a fase móvel utilizada era composta de duas soluções: fase móvel A, fosfato de potássio (0,02 mol/L, pH \cong 3) e fase móvel B, metanol. O fluxo da fase móvel foi ajustado em 1 mL/minuto. Para a separação satisfatória dos compostos otimizou-se o gradiente, definido como: 2,5% de fase móvel B, até ao décimo quarto minuto, aumentando-se de 2,5% para 15% nos onze minutos seguintes. No próximo minuto foi diminuído de 15% para 2,5%, e assim mantido pelos últimos seis minutos. O volume de injeção foi de 100 μL e a quantificação de ambos os metabólitos foi realizada em 342 nm, num tempo total de corrida de 32 minutos.

3.2.8. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Durante a validação analítica avaliaram-se os parâmetros de linearidade, sensibilidade (limites de quantificação e detecção), seletividade, especificidade, recuperação, repetibilidade (variação intraensaio) e reprodutibilidade (variação interensaio), robustez e estabilidade da amostra.

Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em um determinado intervalo ⁽⁹¹⁾. A linearidade do método foi determinada através da construção de uma curva de calibração com sete níveis de concentração, sendo que em cada nível as determinações foram realizadas em triplicatas e considerados os valores médios. As concentrações foram de 0,30, 2,99, 14,95, 29,90, 44,56, 59,81, 89,71 µmol/L para a 6-TGN e 0,31, 3,13, 15,64, 31,29, 46,93, 62,58, 93,86 µmol/L para a 6-MMP. O gráfico e os resultados foram tratados por métodos estatísticos apropriados, para determinação do coeficiente de correlação (R^2) e da relação entre o sinal (área) e a concentração ⁽⁹¹⁾.

Sensibilidade: limite de quantificação e limite de detecção

O LQ é estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O pico de resposta do composto no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões ⁽⁹¹⁾. O LQ foi definido como o menor valor

que pode ser determinado com CV inferior a 20% em cinco análises consecutivas. O LQ foi calculado a partir de diluições seriadas de padrões de 6-TNG e 6-MMP.

O LD é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, ou seja, a menor concentração em que o HPLC é capaz de gerar algum sinal, sendo que a determinação em triplicata apresenta CV superiores a 20%. O LD foi calculado a partir de diluições seriadas de padrões de 6-TNG e 6-MMP ⁽⁹¹⁾.

Seletividade e Especificidade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental. É a medida da indiferença do método à presença de espécies que poderiam interferir na determinação do analito na amostra ⁽⁹²⁾.

Antes de se determinar a seletividade e a especificidade, soluções aquosas de 6-TGN, 6-MMP e DTT foram submetidas ao tratamento de amostra descrito no item 4.6 e injetadas separadamente nas condições do método já descritas no item 4.7. Este procedimento teve o objetivo de determinar os tempos de retenção individuais da 6-TGN e da 6-MMP a fim de assegurar que a separação fosse adequada e que um composto não interferisse na análise do outro. Nesse caso observou-se separação adequada dos compostos a serem quantificados.

Analisaram-se amostras da matriz biológica obtidas de indivíduos em diferentes condições (hemolisadas, ictéricas e lipêmicas). A amostra branco foi analisada utilizando-se os procedimentos e as condições cromatográficas propostas, itens 4.6 e 4.7. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com a solução aquosa dos analitos ⁽⁹¹⁾.

Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. São desejáveis porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100%. O teste foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações, contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. A recuperação do método foi avaliada nas concentrações de 0,60, 11,96 e 41,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e 0,63, 12,51 e 41,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP e o cálculo da recuperação foi feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído ⁽⁹¹⁾.

Repetibilidade (Precisão intraensaio)

A repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, três concentrações, contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração em um mesmo dia, em idênticas condições de ensaio pré-estabelecidas. Pode ser expressa como DP ou coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 15% ⁽⁹¹⁾.

A repetibilidade do método foi avaliada através do cálculo do CV de dez análises consecutivas realizadas sob as mesmas condições analíticas no mesmo dia, em amostras nas concentrações de 0,60, 12,52, 61,78 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e 0,73, 12,52, 43,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP.

Reprodutibilidade (Precisão interensaio)

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo analito, efetuadas sob condições variadas. A reprodutibilidade expressa variações intralaboratoriais, como diferentes dias de análise, diferentes analistas e diferentes equipamentos ⁽⁹²⁾.

A reprodutibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, três concentrações, contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, uma determinação por dia, por cinco dias consecutivos. Pode ser expressa como desvio padrão (DP) ou coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 15% ⁽⁹¹⁾.

A reprodutibilidade do método foi avaliada através do CV de 10 análises realizadas em 10 dias consecutivos, em amostras nas concentrações de 0,60, 12,52, 61,78 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e 0,73, 12,52, 43,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP.

Robustez

Robustez é uma medida da capacidade de um método de não sofrer alteração em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método, como diferentes lotes de reagentes, diferentes equipamentos e operadores ⁽⁹²⁾, é um indicativo de sua confiança durante o uso na rotina ⁽⁹¹⁾.

A robustez do método foi avaliada no decorrer de três anos de análises, através do acompanhamento dos controles de qualidades, nesse período ocorreram variações que poderiam alterar os parâmetros do método.

Estabilidade da amostra

Para a realização do estudo de estabilidade os demais parâmetros devem estar previamente validados. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Existem diferentes formas de avaliar a estabilidade de uma amostra, a melhor maneira deve ser escolhida de acordo com as necessidades e os procedimentos de rotina estabelecidos.

As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência ⁽⁹¹⁾.

Podem ser avaliadas: a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração, estabilidade pós-processamento ⁽⁹¹⁾.

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, exceto quando se tratar do LQ, para o qual se aceita desvio de até 20% ⁽⁹¹⁾.

A estabilidade da amostra foi avaliada nas condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições em que foi avaliada a estabilidade da amostra

Amostra	Condição de armazenamento		
Lavada	Congelador	Refrigerador	Ambiente
	(-15 a -25 °C)	(2 a 8 °C)	(21 a 23 °C)
Extraída	Congelador	Refrigerador	Ambiente
	(-15 a -25 °C)	(2 a 8 °C)	(21 a 23 °C)

3.2.9. ANÁLISES QUANTITATIVAS

A presença de 6-TGN e 6-MMP nos eritrócitos foi analisada por comparação e sobreposição dos seus tempos de retenção em relação a um padrão externo.

As concentrações de 6-TGN e 6-MMP foram determinadas a partir de suas áreas em relação às do padrão, de acordo com a equação:

$$Ca = \frac{(Aa \times Cp)}{Ap}$$

Ca - concentração de 6-TGN ou 6-MMP na amostra ($\mu\text{mol/L}$);

Aa - área do pico de 6-TGN ou 6-MMP na amostra;

Cp - concentração de 6-TGN ou 6-MMP no padrão ($\mu\text{mol/L}$);

Ap - área do pico de 6-TGN ou 6-MMP no padrão.

Nas amostras dos pacientes os resultados encontrados em $\mu\text{mol/L}$ foram corrigidos para a unidade usual $\text{pmol}/ 8 \times 10^8 \text{ RBC}$, através da equação deduzida e simplificada:

$$Cc = \frac{(Ca \times 2000)}{\text{Eritrócitos}}$$

Cc - concentração de 6-TGN ou 6-MMP em $\text{pmol}/ 8 \times 10^8 \text{ RBC}$;

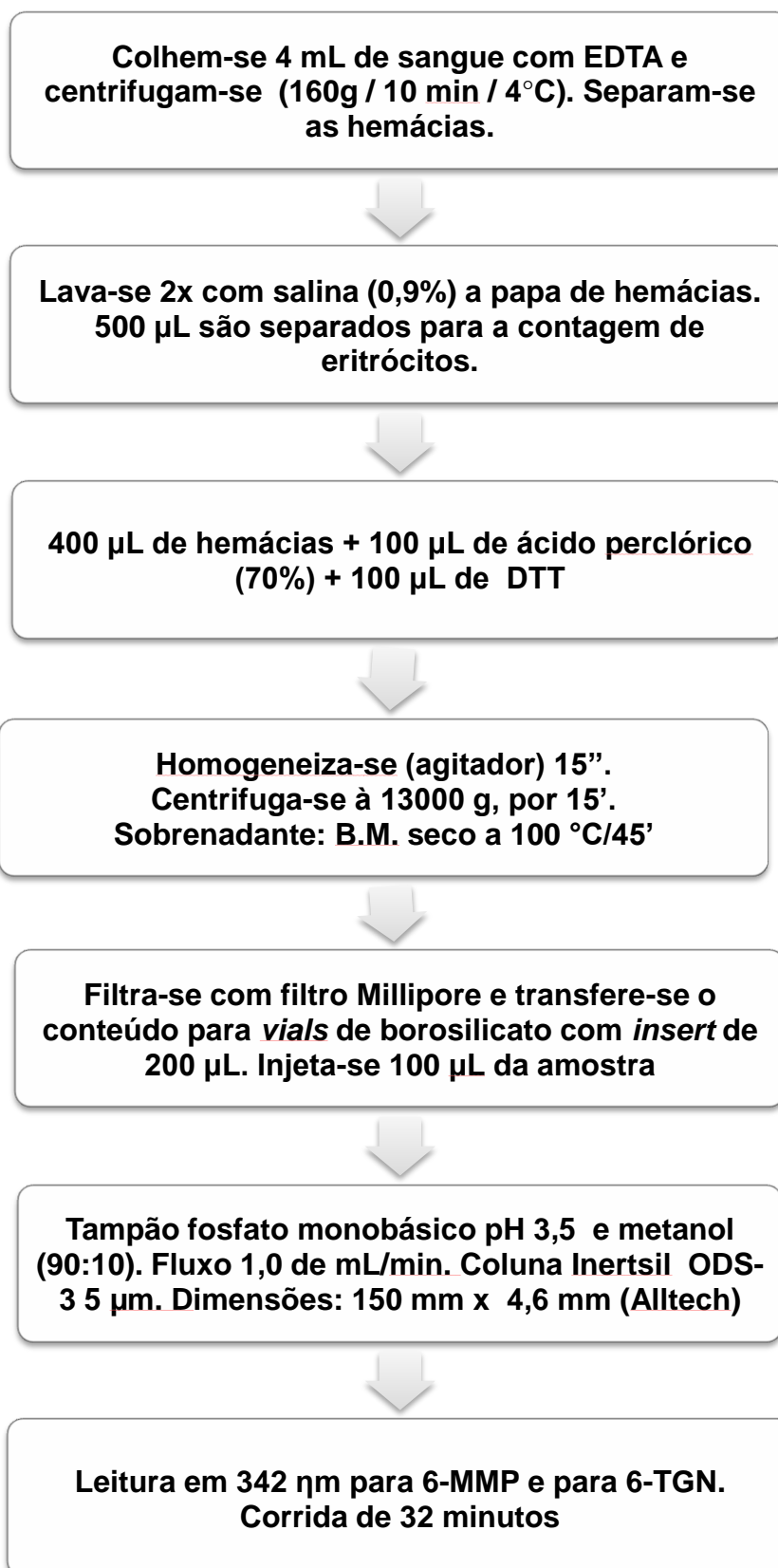
Ca - concentração de 6-TGN ou 6-MMP na amostra ($\mu\text{mol/L}$);

Eritrócitos - número de eritrócitos por $1 \mu\text{L}$ sem as unidades de milhões (10^6);

Exemplo 1: em uma amostra com resultado de $1,24 \mu\text{mol}/ \text{L}$ de 6-TGN e contagem de eritrócitos de $7,51 \times 10^6 \text{ RBC}/ \mu\text{L}$. Temos $1,24 \times 2000/ 7,51 \cong 330 \text{ pmol}/ 8 \times 10^8 \text{ RBC}$.

Exemplo 2: em uma amostra com resultado de 21,38 $\mu\text{mol/L}$ de 6-MMP e contagem de eritrócitos de $7,51 \times 10^6 \text{ RBC}/\mu\text{L}$. Temos $21,38 \times 2000 / 7,51 \cong 5693 \text{ pmol} / 8 \times 10^8 \text{ RBC}$.

3.2.10. FLUXOGRAMA DO MÉTODO ANALÍTICO



3.2.11. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

As amostras foram coletadas de pacientes do ambulatório da Unidade de Transplante Renal (UTR) do HCFMUSP que utilizavam AZA como regime de imunossupressão pós-transplante renal há pelo menos seis meses. Apenas dois pacientes faziam uso unicamente de AZA, os demais usavam prednisona ou ainda ciclosporina/tacrolimus em regimes variados (Anexo 1). Todos os pacientes incluídos neste estudo tinham mais de 18 anos no momento da coleta, que ocorreu entre os meses de agosto de 2007 e novembro de 2009 com a permissão formalizada através da leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). As características da população estão detalhadas na Tabela 4.

Tabela 4. Características da população de transplantados renais estudada

Casuística	124
Número de transplantes (1/ 2 ou 3) ^a	108 (87,10%)/ 16 (12,90%)
Ano do transplante	1970 - 2009
Sexo (M/ F) ^a	57 (45,97%)/ 67 (54,03%)
Doador (Cadáver/ Vivo) ^a	51 (41,12%)/ 73 (58,88%)
Idade no transplante ^b	36,26 (11 - 68) anos
Idade na coleta ^b	48,01 (22 - 79) anos
Tempo pós-transplante ^b	11,75 (0,5 - 39) anos
Dose média de AZA ^b	1,84 (0,33 - 3,29) mg/kg
Esquema Terapêutico	
AZA ^a	2 (1,62%)
AZA + prednisona ^a	33 (26,61%)
AZA + prednisona + ciclosporina ^a	45 (36,29%)
AZA + prednisona + tacrolimus ^a	44 (35,48%)

^aValores absolutos, percentual entre parênteses.

^bValores expressos como média, intervalo entre parênteses.

3.2.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES

Para a melhor observação dos resultados, as medidas de 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) foram classificadas e descritas usando-se as frequências absolutas e relativas, as distribuições desses valores foram ilustradas usando-se gráficos box-plot.

Calcularam-se as correlações de Spearman entre as variáveis tempo pós-transplante (anos) e os níveis da 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e da 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e entre as variáveis dose de AZA (mg/kg) e os níveis da 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e da 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) para se verificar a existência de relação entre essas medidas.

O teste do qui-quadrado foi utilizado para se avaliar a associação entre a dose de AZA (mg/kg) e a ocorrência de concentração de 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$.

O teste da razão de verossimilhanças foi utilizado para a comparação do percentual de valores de 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ entre pacientes que realizaram um único transplante renal e os pacientes que realizaram 2 ou 3 transplantes.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5% e para tais análises utilizaram-se os softwares Excel 2007 e SPSS 15.0 - *Statistical Package for the Social Sciences* 15.0.

ÉTICA

4. ÉTICA

A pesquisa foi registrada em 27/03/2007 no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Sisnep), sob folha de rosto FR - 12841 (Anexo 3). O projeto foi aprovado em 09/05/2007 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP sob número de protocolo 0298/07 (Anexo 4) e também aprovado em 23/08/2007 pela Comissão de Ética da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP (Anexo 5).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.1.1. LINEARIDADE

As soluções de calibração foram preparadas em papa de hemácias e as determinações realizadas em triplicata para cada concentração. Para a construção da curva consideraram-se os valores médios das três áreas obtidas para cada concentração. Os resultados obtidos para a determinação da linearidade do método nas concentrações de 6-TGN de 0,30 a 89,71 $\mu\text{mol/L}$ estão apresentados na Figura 10 e na Tabela 5.

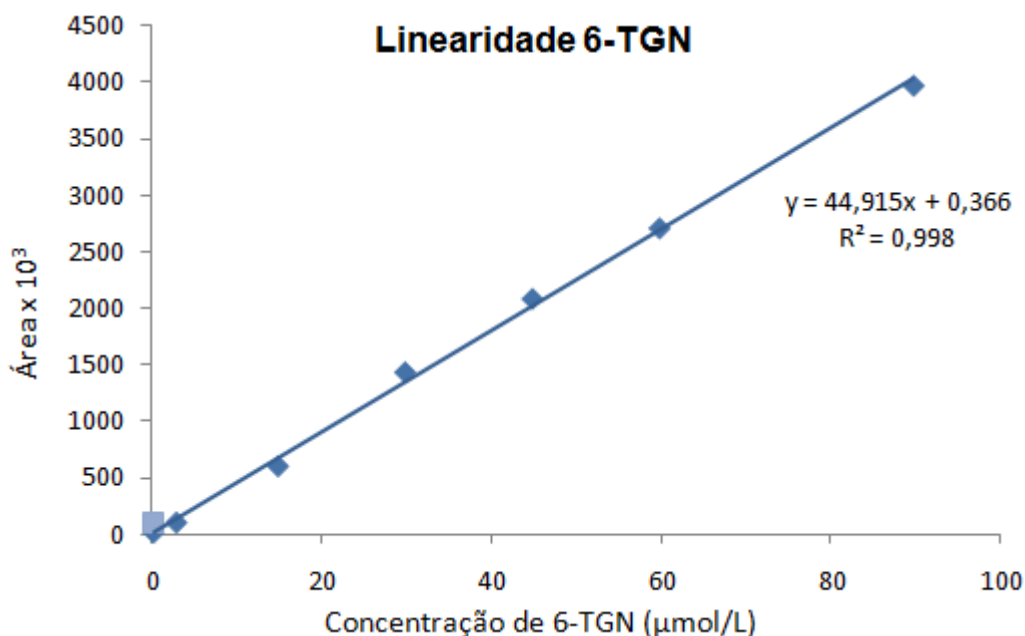


Figura 10. Curva de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de 6-TGN

Tabela 5. Concentração de 6-TGN em papa de hemácias *versus* média das áreas e coeficientes de variação (CV) dos picos detectados nos cromatogramas

6-TGN ($\mu\text{mol/L}$)	Área média	CV (%)
0,30	10798	2,44
2,99	100078	0,96
14,95	598943	0,37
29,90	1430707	1,41
44,86	2180866	0,08
59,81	2538566	1,11
89,71	3968758	0,58

Para a 6-MMP a linearidade foi testada nas concentrações de 0,31 a 93,86 $\mu\text{mol/L}$ e os resultados estão apresentados na Figura 11 e Tabela 6.

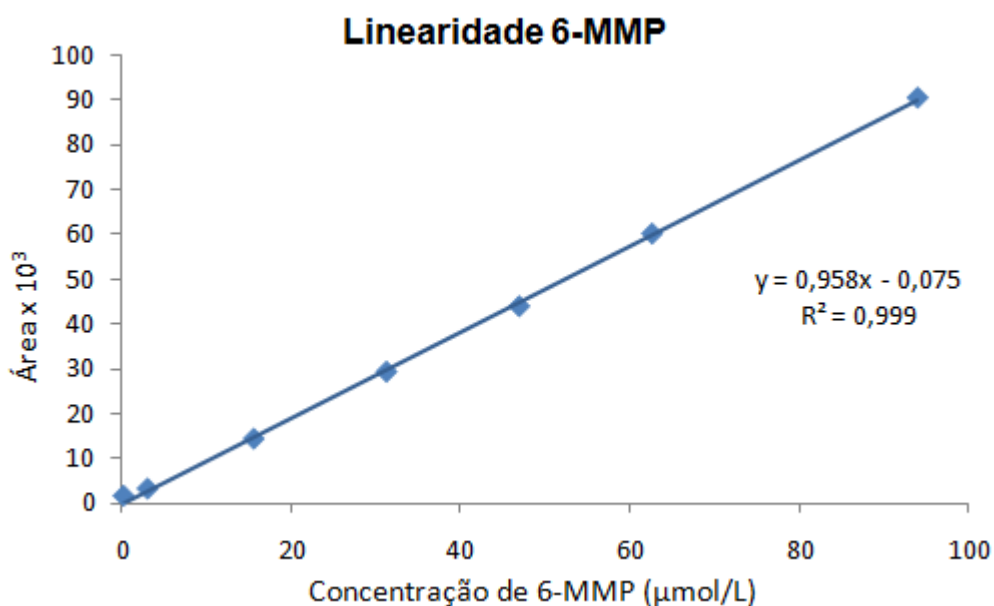


Figura 11. Curva de calibração do valor médio da área de cada pico em função da concentração de 6-MMP.

Tabela 6. Concentração de 6-MMP em papa de hemácias *versus* média das áreas e coeficientes de variação (CV) dos picos detectados nos cromatogramas

6-MMP ($\mu\text{mol/L}$)	Área média	CV (%)
0,31	1480	7,46
3,13	3091	1,94
15,64	14245	3,91
31,29	29223	4,09
46,93	43862	0,88
62,58	60104	1,02
93,86	90477	0,78

A equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R^2) obtido para os dois metabólitos testados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de correlação linear (R^2) obtidos nos testes de linearidade para 6-TGN e 6-MMP

Metabólito	Linearidade ($\mu\text{mol/L}$)	Equação	R^2
6-TGN	0,30 – 89,71	$y = 44,915x + 0,3658$	0,998
6-MMP	0,31 – 93,86	$y = 0,9577x - 0,075$	0,999

5.1.2. SENSIBILIDADE: LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO

O LQ, definido como o menor valor que pode ser determinado com CV inferior a 20% em cinco análises consecutivas, foi calculado a partir de diluições seriadas de padrões de 6-TNG e 6-MMP. O valor encontrado foi de 0,30 $\mu\text{mol/L}$ para ambos os metabólitos.

O LD, definido como o menor valor que pode ser detectado pelo aparelho com CV superior a 20%, foi calculado a partir de análises em triplicata de diluições seriadas dos padrões de 6-TNG e 6-MMP na concentração de 0,30 $\mu\text{mol/L}$. O valor encontrado foi de 0,13 $\mu\text{mol/L}$ para ambos os metabólitos (Tabela 8).

Tabela 8. Limites de quantificação e de detecção e seus CV obtidos durante o estudo de sensibilidade do método.

Metabólito	LQ ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	LD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
6-TGN	0,30	7,8	0,13	36,1
6-MMP	0,30	9,2	0,13	45,9

5.1.3. SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE

A seletividade do método foi verificada aplicando-se as mesmas condições metodológicas descritas num *pool* de hemácias de pacientes que não utilizavam AZA e o mesmo *pool* adicionado dos metabólitos em concentrações de 1,20 e 60,15 $\mu\text{mol/L}$ de 6-TGN e 6-MMP, respectivamente. Injetando-se matrizes de pacientes em diferentes condições adicionadas com padrões observou-se a separação satisfatória dos metabólitos. Dois picos foram obtidos com tempos de retenção de 11,4 e 22,9 minutos, correspondentes à 6-TGN e à 6-MMP, respectivamente. Um terceiro pico foi encontrado em 24,8 minutos, correspondente à solução de DTT 3,0 mg/mL adicionada durante o tratamento da amostra (Figura 12 A).

A especificidade do método foi avaliada comparando-se o cromatograma obtido a partir da matriz adicionada de padrões com o cromatograma obtido a partir de uma amostra de paciente sob tratamento com AZA (Figura 12 B). Os tempos de retenção dos padrões e o das amostras dos pacientes foram os mesmos.

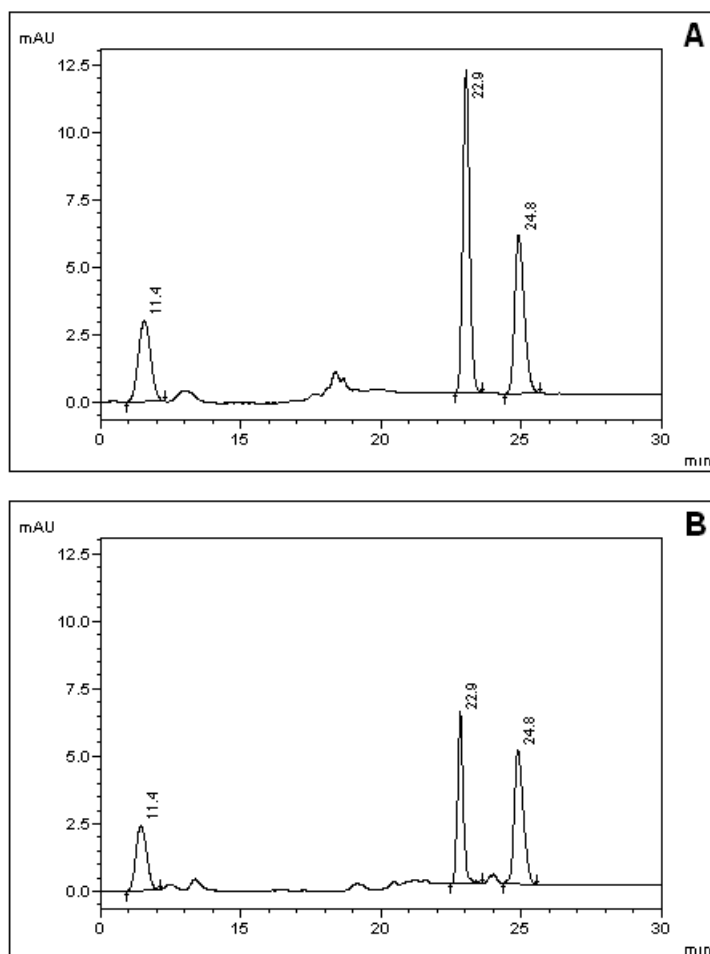


Figura 12. A. Cromatograma (342 nm) de um calibrador preparado em sangue nas concentrações de 1,20 $\mu\text{mol/L}$ e 60,15 $\mu\text{mol/L}$ de 6-TGN e 6-MMP, respectivamente. B. Cromatograma (342 nm) da amostra sanguínea de paciente, concentrações de 1,24 $\mu\text{mol/L}$ e 21,38 $\mu\text{mol/L}$ de 6-TGN e 6-MMP, respectivamente. O pico em 24,8 minutos, correspondente à solução de DTT 3,0 mg/mL adicionada durante o tratamento da amostra

5.1.4. RECUPERAÇÃO

A recuperação do método foi avaliada em três diferentes concentrações para cada metabólito, 0,60, 11,96 e 41,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e 0,63, 12,51 e 41,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP. As concentrações foram determinadas em triplicata para cada nível e a recuperação foi expressa pela razão entre os valores encontrados e a concentração real.

A recuperação para as concentrações testadas variou de 95,08 a 100,80% para a 6-TGN (Tabela 9) e 95,38 a 105,06% para a 6-MMP (Tabela 10).

Tabela 9. Valores das concentrações esperadas e obtidas e porcentagem de recuperação do processo de extração da 6-TGN em três concentrações diferentes

Concentração esperada ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol/L}$)	Recuperação (%)
0,60	0,57	95,08
11,96	11,70	97,76
41,87	42,21	100,80

Tabela 10. Valores das concentrações esperadas e obtidas e porcentagem de recuperação do processo de extração da 6-MMP em três concentrações diferentes

Concentração esperada ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol/L}$)	Recuperação (%)
0,63	0,66	104,79
12,51	11,94	95,38
41,87	43,98	105,06

5.1.5. REPETIBILIDADE (PRECISÃO INTRAENSAIO)

A repetibilidade do método foi avaliada através do cálculo do CV de dez análises consecutivas realizadas sob as mesmas condições analíticas no mesmo dia, sendo três amostras em três níveis de concentração, 0,60, 12,52 e 61,78 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e 0,73, 12,52 e 43,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP. Os valores da precisão intraensaio estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11. Valores dos CV (%) da precisão intraensaio obtidos a partir de três concentrações de 6-TGN e 6-MMP aplicando-se o método proposto em *pool* hemácias adicionado dos padrões.

Concentração 6-TGN ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	Concentração 6-MMP ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
0,60	3,50	0,73	5,59
12,52	5,06	12,52	2,84
61,78	1,09	43,87	3,57

5.1.6. REPRODUTIBILIDADE (PRECISÃO INTERENSAIO)

A reprodutibilidade do método foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação CV de 10 análises realizadas em dias consecutivos, sendo três amostras nas concentrações 0,60, 12,52 e 61,78 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e 0,73, 12,52 e 43,87 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP. Os valores da precisão interensaio estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12. Valores dos CV (%) da precisão interensaio obtidos a partir de três concentrações de 6-TGN e 6-MMP aplicando-se o método proposto em *pool* hemácias adicionado dos padrões

Concentração 6-TGN ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	Concentração 6-MMP ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
0,60	8,65	0,73	12,73
12,52	7,18	12,52	6,40
61,78	8,44	43,87	4,88

5.1.7. ROBUSTEZ

Para se garantir a qualidade das análises, estas foram invariavelmente acompanhadas por controles de qualidade preparados com *pool* de hemácias adicionado de concentrações conhecidas de 6-TGN e 6-MMP.

As faixas de variação aceitáveis foram determinadas após 20 dosagens dos analitos, cálculo da média e do DP e as análises foram acompanhadas pelo gráfico de Levey-Jennings.

A evolução dos resultados dos controles de qualidade obtidos durante as análises das amostras dos pacientes estão expressos nas Figuras 13 e 14 e na Tabela 13.

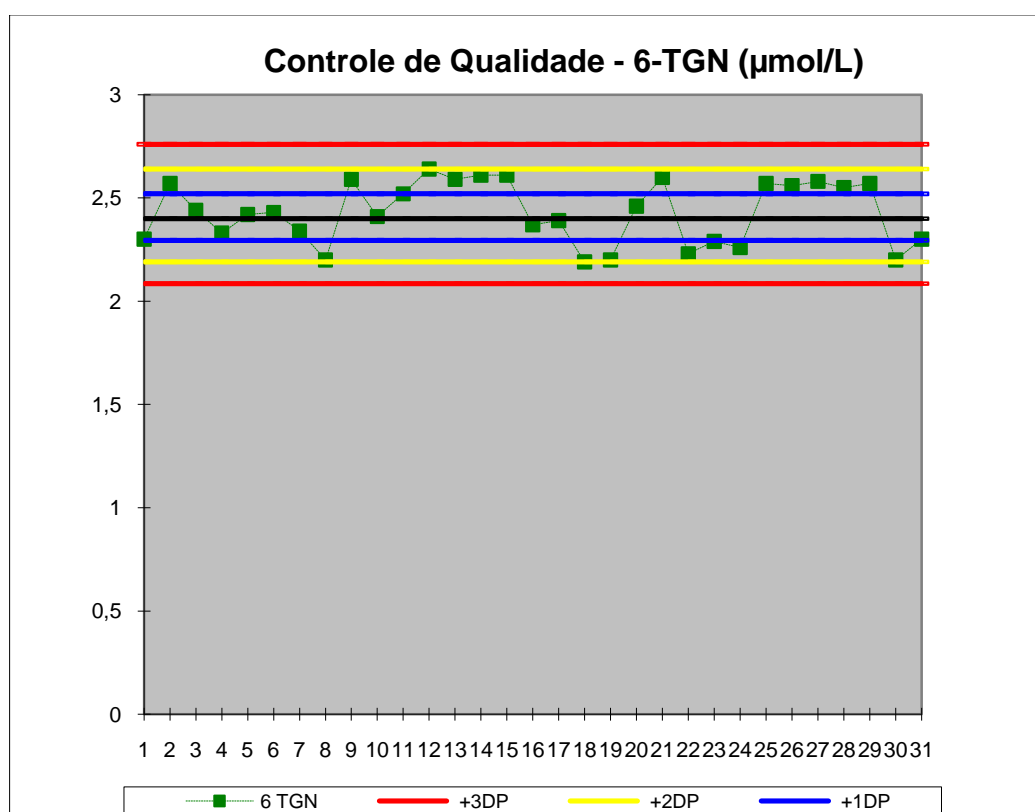


Figura 13. Evolução dos resultados dos controles de qualidade da 6-TGN durante as análises das amostras dos pacientes. A faixa de aceitação estipulada como a média ± 2 DP foi de 2,19 a 2,64 $\mu\text{mol/L}$ (média de 2,40 $\mu\text{mol/L}$)

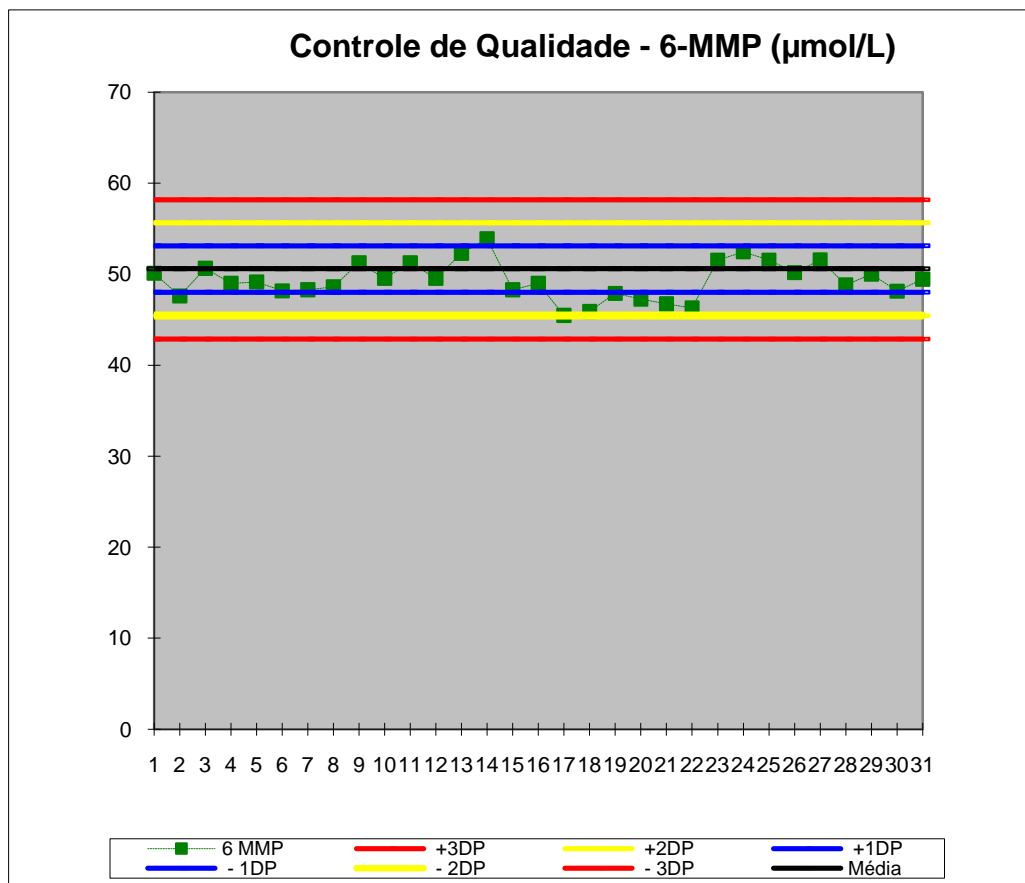


Figura 14. Evolução dos resultados dos controles de qualidade da 6-MMP durante as análises das amostras dos pacientes. A faixa de aceitação estipulada como a média ± 2 DP foi de 45,45 a 55,66 (média de 50,60 $\mu\text{mol/L}$)

Tabela 13. Resultados dos controles de qualidade da 6-TGN e da 6-MMP durante as análises das amostras dos pacientes

Dia	CV (%) mensal	
	6-TGN	6-MMP
01	2,30	50,10
02	2,57	47,61
03	2,44	50,66
04	2,33	49,01
05	2,42	49,15
06	2,43	48,17
07	2,34	48,30
08	2,20	48,60
09	2,59	51,27
10	2,41	49,54
11	2,52	51,27
12	2,64	49,54
13	2,59	52,30
14	2,61	53,90
15	2,61	48,30
16	2,37	49,00
17	2,39	45,47
18	2,19	45,90
19	2,20	47,89
20	2,46	47,26
21	2,60	46,75
22	2,23	46,30
23	2,29	51,55
24	2,26	52,46
25	2,57	51,55
26	2,56	50,18
27	2,58	51,56
28	2,55	48,82
29	2,57	50,00
30	2,20	48,14
31	2,30	49,45

Foi possível observar que o método manteve sua resposta em meio às mudanças no ambiente de análise. Durante o período avaliado nenhuma alteração nas condições analíticas influenciou a exatidão do método de forma significativa, mantendo os resultados dos controles de qualidade dentro das faixas aceitáveis.

5.1.8. ESTABILIDADE DA AMOSTRA

Ambos os metabólitos são estáveis por pelo menos oito semanas nas hemácias que foram lavadas e armazenadas em congelador (-15 a -25 °C) ou refrigerador (2 a 8 °C). Quando as amostras lavadas foram armazenadas em temperatura ambiente (21 a 23 °C) por 24h somente a 6-TGN apresentou estabilidade satisfatória.

Os resultados dos estudos de estabilidade da 6-TGN e da 6-MMP nestas amostras estão expressos nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Decaimento (%) dos valores da 6-TGN em amostras de hemácias em três concentrações, lavadas com salina 0,9% e armazenadas por diferentes períodos e condições de armazenamento

Concentração esperada (µmol/L)	Congelador (-15 a -25 °C)			Refrigerador (2 a 8 °C)			Ambiente (21 a 23 °C)		
	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas
0,60	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	9,7%	6,6%	NA ^a	NA
11,96	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,8%	5,0%	NA	NA
41,87	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	NA	NA

^a NA: não avaliado

Tabela 15. Decaimento (%) dos valores da 6-MMP em amostras de hemácias em três concentrações, lavadas com salina 0,9% e armazenadas por diferentes períodos e condições de armazenamento

Concentração esperada (μmol/L)	Congelador (-15 a -25 °C)			Refrigerador (2 a 8 °C)			Ambiente (21 a 23 °C)		
	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas
0,63	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	6,8%	100,0%	NA ^a	NA
12,52	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,0%	32,5%	NA	NA
41,87	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%	1,3%	NA	NA

^a NA: não avaliado

Nas amostras desproteinizadas e hidrolisadas, prontas para a injeção cromatográfica, quando armazenadas em congelador (-15 a -25 °C) ambos os metabólitos são estáveis por até 24h. Em refrigerador (2 a 8 °C) somente a 6-MMP apresentou estabilidade satisfatória após 24h. Os resultados dos estudos de estabilidade da 6-TGN e da 6-MMP nestas amostras estão expressos nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Decaimento (%) dos valores da 6-TGN em amostras em três concentrações, desproteinizadas e hidrolisadas e armazenadas por diferentes períodos e condições de armazenamento

Concentração esperada (μmol/L)	Congelador (-15 a -25 °C)			Refrigerador (2 a 8 °C)			Ambiente (21 a 23 °C)		
	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas
0,60	5,1%	22,2%	37,9%	60,2%	NA ^a	NA	NA	NA	NA
11,96	0,1%	14,5%	14,8%	20,9%	NA	NA	NA	NA	NA
41,87	0,0%	11,3%	16,0%	21,1%	NA	NA	NA	NA	NA

^a NA: não avaliado

Tabela 17. Decaimento (%) dos valores da 6-MMP em amostras em três concentrações, desproteinizadas e hidrolisadas e armazenadas por diferentes períodos e condições de armazenamento

Concentração esperada (µmol/L)	Congelador (-15 a -25 °C)			Refrigerador (2 a 8 °C)			Ambiente (21 a 23 °C)		
	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas	24 horas	7 dias	8 semanas
0,63	9,1	42,8	100,0	0,0	NA ^a	NA	NA	NA	NA
12,52	2,6	18,1	23,6	0,0	NA	NA	NA	NA	NA
41,87	0,0	19,5	17,5	0,0	NA	NA	NA	NA	NA

^a NA: não avaliado

5.2. RESULTADOS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES

Os resultados encontrados nas análises das amostras dos pacientes variaram de valores indetectáveis a 1569 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-TGN e de valores indetectáveis a 113057 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-MMP (Anexo 2).

Na Tabela 18 pode-se observar que, em um intervalo de confiança de 95% (IC 95%), a média dos níveis dos metabólitos na população encontra-se no intervalo de 238,60 a 342,50 pmol/8 x 10⁸ RBC para 6-TGN e no intervalo de 7336,05 a 12961,08 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-MMP.

Tabela 18. Média, DP, mediana, mínimo, máximo e média (IC 95%) dos níveis de concentração de 6-TGN e 6-MMP encontrados na população

Variável (pmol/8 x 10 ⁸ RBC)	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	IC 95%
6-TGN	290,55	295,14	200,50	0	1569	238,60 - 342,50
6-MMP	10148,56	15979,29	5166	0	113057	7336,05 - 12961,08

A Tabela 19 mostra que a maior parte dos pacientes avaliados apresentou valores de 6-TGN inferiores a $400 \text{ pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$ (75,0%), neste grupo 29,0% apresentaram valores inferiores a $60 \text{ pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$. Em relação à 6-MMP a maior parte dos pacientes avaliados apresentou valores inferiores a $10000 \text{ pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$ (80,7%), sendo que 48,4% apresentaram valores inferiores a $5000 \text{ pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$.

Tabela 19. Descrição da frequência dos valores de 6-TGN ($\text{pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$) e 6-MMP ($\text{pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$) observados na população avaliada

Variável	Frequência	%
6-TGN ($\text{pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$)		
< 60	36	29,0
60 a 200	26	21,0
201 a 400	31	25,0
401 a 600	13	10,5
601 a 800	10	8,1
> 800	8	6,5
6-MMP ($\text{pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$)		
0 a 5000	60	48,4
5001 a 10000	24	19,4
10001 a 15000	16	12,9
15001 a 20000	10	8,1
> 20000	14	11,3

Para a 6-TGN, o primeiro, segundo e terceiro quartis foram 60, 200 e 389 $\text{pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$, respectivamente. Para a 6-MMP foram 2104, 5125 e 11862 $\text{pmol/8 x } 10^8 \text{ RBC}$, respectivamente.

As Figuras 15 e 16 sugerem que os valores de 6-TGN e de 6-MMP apresentam distribuições assimétricas na população, ou seja, são incompatíveis com a distribuição normal ou gaussiana.

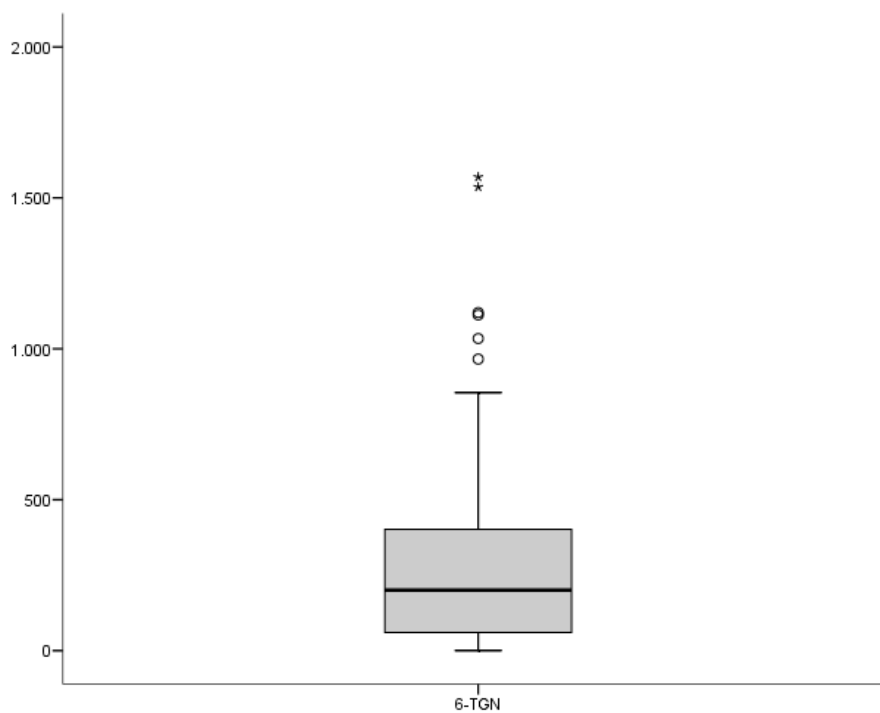


Figura 15. Box-plot dos valores encontrados para a 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)

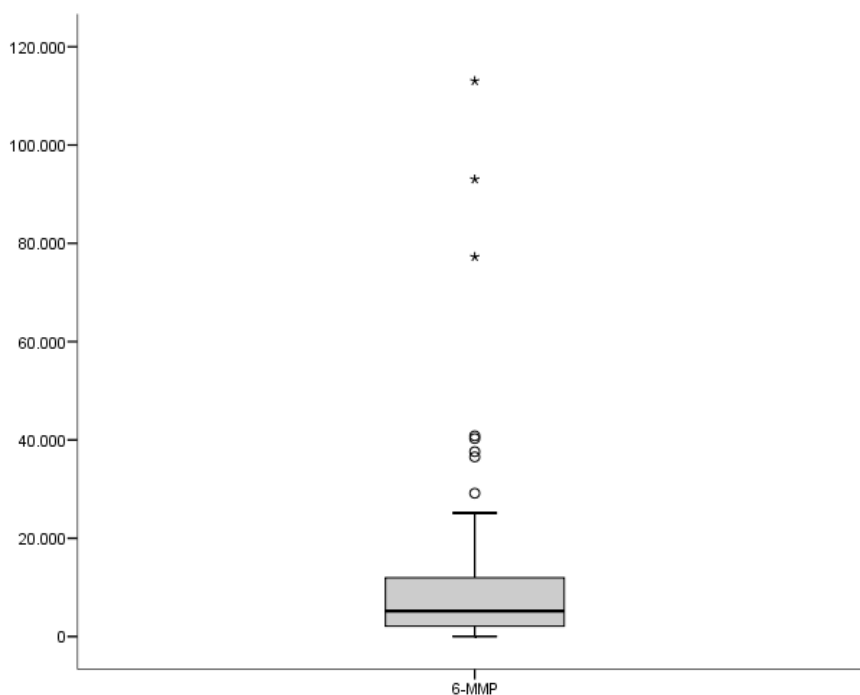


Figura 16. Box-plot dos valores encontrados para a 6-MMP (pmol/8 x 10⁸ RBC)

A Tabela 20 mostra que o nível de 6-TGN (pmol/8 x 10⁸ RBC) está diretamente correlacionado com a dose de AZA ingerida, isto é, existe uma tendência no aumento do valor da 6-TGN ($r = 0,198$ e $p = 0,027$) quando se aumenta a dose de AZA, porém, não existe correlação estatisticamente significativa entre os níveis da 6-TGN (pmol/8 x 10⁸ RBC) e o tempo pós-transplante.

Ainda na Tabela 20 é possível observar que o nível de 6-MMP (pmol/8 x 10⁸ RBC) não se correlaciona de forma estatisticamente significativa com a dose de AZA ingerida, no entanto, está diretamente correlacionado com o tempo pós-transplante ($r = 0,251$ e $p = 0,005$) e com o aumento da 6-TGN ($r = 0,201$ e $p = 0,025$), isto é, a concentração da 6-MMP (pmol/8 x 10⁸ RBC) tende a aumentar com o passar dos anos pós-transplante e tende ser maior à medida que os valores de 6-TGN aumentam.

Tabela 20. Correlações de Spearman entre os níveis de 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e de 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e as variáveis tempo pós-transplante (anos) e dose de AZA (mg/kg)

Correlação		Tempo pós-transplante (anos)	AZA (mg/kg)	6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$)
6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$)	r	0,032	0,198	
	p	0,725	0,027	
6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$)	r	0,251	0,082	0,201
	p	0,005	0,366	0,025

Analisaram-se os pacientes categorizados segundo sexo, número de transplantes de rim e dose de AZA ingerida. Os níveis de 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) encontrados nos diferentes grupos estão expressos na Tabela 21, bem como os resultados dos testes estatísticos realizados.

Observou-se que os níveis de 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) foram estatisticamente maiores nos pacientes do sexo feminino ($p = 0,024$).

As demais variáveis avaliadas não influenciaram estatisticamente os níveis de 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) e de 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) ($p > 0,05$).

Tabela 21. Níveis de 6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) e 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) encontrados nos grupos de pacientes categorizados segundo sexo, número de transplantes de rim e dose de AZA ingerida e resultados dos testes estatísticos

Variável	Categoria	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Sexo								
6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)	F	285,2	306,8	200	0	1569	67	0,514 ^a
	M	296,8	283,4	212	0	1536	57	
6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)	F	13626,8	20576,7	5791	0	113057	67	0,024^a
	M	6060,1	5507,8	4535	0	20841	57	
Transplante								
6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)	1º	296,8	305,1	205,5	0	1569	106	0,446 ^a
	2º ou 3º	253,9	231,8	121,5	60	631	18	
6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)	1º	10683,5	16984,4	5169	0	113057	106	0,399 ^a
	2º ou 3º	6998,5	7309,9	4785,5	0	24732	18	
AZA (mg/Kg)								
6-TGN ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)	< 2,0	259,3	288,5	151	0	1569	76	0,068 ^b
	2,0 a 2,5	331,6	322,7	259,5	0	1536	38	
	> 2,5	371,8	214,4	354	60	631	10	
6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC)	< 2,0	8361,6	9328,9	5120	0	40838	76	0,713 ^b
	2,0 a 2,5	14437,9	25112,4	5166	335	113057	38	
	> 2,5	7430,4	7676,4	5366,5	504	24732	10	

^a Resultado do teste Mann-Whitney

^b Resultado do teste Kruskal-Wallis

A Tabela 22 mostra que não há associação estatisticamente significativa entre a dose de AZA (mg/kg) e a ocorrência de concentração de 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC ($p = 0,244$), mas é evidente a redução do percentual de pacientes com 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC com o aumento da dose de AZA.

Pode-se também observar na Tabela 22 que os pacientes que realizaram um único transplante renal, quando comparados aos pacientes que realizaram 2 ou 3 transplantes, apresentam de forma estatisticamente significativa ($p = 0,034$) um menor percentual com valores de 6-TGN inferiores a $60 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$.

Tabela 22. Descrição dos valores de 6-TGN categorizados segundo dose de AZA (mg/kg) e número de transplantes e resultados dos testes de associação

Variável	6-TGN ($\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$)				Total	p
	< 60		≥ 60			
	n	%	n	%		
Dose AZA (mg/kg)						0,244^a
< 2,0	25	32,9	51	67,1	76	
2,0 a 2,5	10	26,3	28	73,7	38	
> 2,5	1	10,0	9	90,0	10	
Transplante						0,034^b
1º	27	25,5	79	74,5	106	
2º ou 3º	9	50,0	9	50,0	18	
Total	36	29,0	88	71,0	124	

^a Resultado do teste da razão de verossimilhanças

^b Resultado do teste qui-quadrado

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 MÉTODO

Desenvolvida no início dos anos 60, a AZA permitiu que o transplante renal se tornasse realidade ⁽¹⁴⁾. Em 1965 foi realizado o primeiro transplante renal da América Latina no HCFMUSP, o paciente foi tratado somente com AZA e sobreviveu por dez anos ⁽¹⁵⁾. Por mais de 25 anos a imunossupressão em transplantados renais consistiu somente de AZA e corticoides, ficando conhecida como imunossupressão clássica. No início dos anos 80 surgiram os inibidores da calcineurina, a ciclosporina e posteriormente o tacrolimus ^(18,19,20). Em meados dos anos 90 o FDA aprovou o MMF, medicamento que pode substituir a AZA na terapia imunossupressora, ⁽²⁹⁾ para uso exclusivo em transplantes ⁽²⁹⁾.

A Divisão de Farmácia do HCFMUSP adquire os comprimidos genéricos de AZA junto à FURP e fornece o mesmo a 2423 pacientes de diversas clínicas. Entre janeiro de 1985 e fevereiro de 2009 foram realizados 2298 transplantes de rim no HCFMUSP. Atualmente são acompanhados cerca de 440 transplantados ativos, entre os quais 250 recebem AZA e 190 MMF (Figura 6). É importante observar que o custo mensal do tratamento com MMF é cerca de 12 vezes superior ao custo do tratamento com a AZA (Tabela 1).

Apesar dos estudos iniciais terem apontado que a eficácia clínica do MMF é superior à da AZA na imunossupressão pós-transplante, novos estudos indicam que a eficácia clínica da AZA pode ser igual ou superior à do MMF ^(34, 35, 36, 37). É importante observar que esses estudos foram realizados em centros de pesquisa localizados em países desenvolvidos, em que o fator custo é menos relevante que no Brasil.

A AZA apresenta um metabolismo complexo que envolve rotas anabólicas e catabólicas e seu perfil farmacocinético em transplantados renais ainda não foi totalmente avaliado. Poucos estudos apresentam dados relevantes sobre este tópico ^(44, 45, 46, 47). A relação entre o polimorfismo dos genes que codificam a TPMT, as

reações adversas atribuídas à AZA e a evolução clínica dos transplantados foi estudada em alguns trabalhos e a grande variação interindividual da atividade da TPMT em todas as populações mostrou importantes implicações em relação ao sucesso da terapia com AZA ^(52, 53, 54, 55, 56, 57, 58).

Após quase meio século de uso, as reações adversas relacionadas ao uso da AZA são bem conhecidas e documentadas. Dezenas de trabalhos descrevem reações relacionadas principalmente aos altos níveis intraeritrocitários de 6-TGN e 6-MMP. A mielotoxicidade é o principal efeito adverso relacionado aos níveis de 6-TGN ^(56, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65). No entanto, já foram observadas reações inesperadas menos frequentes, como as leucemias ^(66, 67, 68). Em relação à 6-MMP o principal efeito tóxico conhecido é a hepatotoxicidade ^(69, 70, 71), contudo, sua relação com os níveis de 6-MMP não está completamente esclarecida ^(72, 73, 74, 75, 76).

A estreita janela terapêutica dos imunossupressores é um fator limitante no uso desses medicamentos. A TDM permite a individualização da dose do medicamento, ao contrário da dose padronizada em mg/kg de massa corporal. Além disso, possibilita a adequação dos níveis do metabólito 6-TGN à faixa terapêutica, a identificação dos casos de não aderência ao tratamento e a manutenção das concentrações de 6-TGN e de 6-MMP em níveis em que as reações adversas sejam mais raras.

Além da monitorização biológica, existe a necessidade de se estudar os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, importantes no ajuste da dose necessária a cada paciente. Por essas razões a AZA certamente se inclui entre os fármacos que necessitam de TDM ⁽⁷⁷⁾.

O primeiro estudo que analisou a importância da TDM da AZA em transplantados renais foi publicado somente em 1994 e os resultados deste e de trabalhos posteriores reforçaram a hipótese de que a TDM da AZA é essencial durante todo o tratamento ^(78, 79, 80, 81, 82, 83). Com o avanço do conhecimento em áreas como a química analítica, a toxicologia e a farmacogenética, a medicina está cada vez mais personalizada. A TDM vem acompanhando esses avanços, ganhando espaço e importância no laboratório clínico.

Em países como EUA e Reino Unido, a TDM é uma prática rotineira que envolve os mais variados medicamentos, inclusive a AZA. Em geral, os

medicamentos que contam com a TDM pertencem às classes dos antibióticos, antiepilépticos, antidepressivos tricíclicos, benzodiazepínicos e imunossupressores.

No Brasil a TDM ainda é pouco utilizada devido à falta de laboratórios devidamente equipados e de profissionais qualificados, principalmente fora dos grandes centros. Para a TDM da AZA ainda há a dificuldade de não existirem conjuntos de diagnóstico disponíveis comercialmente para a quantificação de seus metabólitos.

A primeira metodologia descrita para a monitorização terapêutica dos níveis intraeritrocitários de 6-TGN foi desenvolvida por Lennard e Maddocks (1983) e serviu como base para o desenvolvimento de outros métodos e para a busca do estabelecimento dos intervalos terapêuticos no tratamento com a AZA ^(84, 85, 86, 87, 88, 89,90).

Nesse contexto nosso grupo teve como objetivo desenvolver, validar e implantar um método laboratorial simples e sensível para a determinação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA.

O processo que evidencia e documenta o desempenho de um método analítico é chamado de validação analítica ou validação de método analítico ⁽⁹²⁾. Para a adequação às normas internacionais e nacionais de validação de métodos analíticos este trabalho teve como base as diretrizes do FDA ⁽⁹³⁾ e do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ⁽⁹⁴⁾, antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), além da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) ⁽⁹¹⁾, que adota os mesmos critérios dos órgãos internacionais na validação de métodos bioanalíticos.

Na determinação da linearidade do método observou-se que a resposta do equipamento foi uma função linear da concentração no intervalo de 0,30 a 89,71 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN e de 0,31 a 93,86 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP. Quando se convertem esses valores para a unidade usual ($\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$), conforme o item 4.9, têm-se os intervalos de linearidade aproximados de 60 a 17942 $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ para a 6-TGN e de 62 a 18772 $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ para 6-MMP.

Os métodos desenvolvidos na década de 80 não avaliaram os níveis de 6-MMP ^(84,85) e apresentaram intervalo linear para os níveis de 6-TGN entre 30 e 30000 $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$. Lennard & Singleton ⁽⁸⁶⁾ realizaram um estudo com menor

intervalo linear para 6-TGN – 30 a 900 pmol/8 x 10⁸ RBC – e pela primeira vez quantificaram a 6-MMP, com intervalo linear entre 300 e 3000 pmol/8 x 10⁸ RBC. Quando os valores encontrados em nossa população são analisados, observa-se que esses intervalos lineares não são adequados, já que não contemplam todos os níveis de metabólitos de nossos pacientes (Tabela 18).

Nos resultados obtidos por nosso grupo, os limites superiores testados para ambos os metabólitos são cerca de 300 vezes maiores que os limites inferiores, abrangendo valores abaixo da faixa terapêutica até níveis tóxicos^(91, 92, 93, 94).

Os trabalhos realizados por Dervieux *et al.*^(87, 90) apresentaram intervalos lineares entre 0,25 e 50 µmol/L RBC para 6-TGN e entre 1,5 e 200 µmol/L RBC para 6-MMP, valores próximos aos avaliados neste estudo e, portanto, mais adequados à nossa população.

A sensibilidade do método está adequada às nossas análises. O valor encontrado para o LQ foi de 0,30 µmol/L e para o LD, de 0,13 µmol/L para ambos os metabólitos. Para a 6-TGN a totalidade dos pacientes apresentou resultados inferiores ao limite superior de linearidade testado, contudo, valores inferiores ao LQ (60 pmol/8 x 10⁸ RBC) normalmente são relatados^(81, 87, 89).

A maioria dos trabalhos da literatura apresenta apenas os valores encontrados para o LQ ou para o LD^(84, 85, 86, 87, 88). Somente dois estudos relataram ambos os parâmetros tanto para a 6-TGN quanto para a 6-MMP. No primeiro, Oliveira *et al.*⁽⁸⁹⁾ obtiveram LQ de 8 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-TGN e de 70 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-MMP, enquanto os valores para o LD foram de 3 pmol/8 x 10⁸ RBC e de 25 pmol/8 x 10⁸ RBC, respectivamente. Já Dervieux *et al.*⁽⁹⁰⁾ encontraram LQ de 18 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-TGN e de 110 pmol/8 x 10⁸ RBC para a 6-MMP, e os valores de LD de 7 pmol/8 x 10⁸ RBC e de 37 pmol/8 x 10⁸ RBC, respectivamente.

Observa-se que os limites indicados em nosso estudo são ligeiramente superiores aos apontados por outros autores, principalmente para a 6-TGN^(88, 89, 90). Essa diferença pode ser atribuída a uma limitação do nosso equipamento, que possui um detector UV simples e não permite a leitura simultânea das concentrações dos metabólitos em seus comprimentos de onda de absorção

máxima. No entanto, este não é um ponto limitante do método, já que as faixas de interesse foram contempladas.

Em relação à 6-TGN, nenhum dos nossos pacientes apresentou resultado maior que o limite superior de quantificação testado e as concentrações inferiores ao LQ ($60 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$) eram esperadas, já que o mesmo ocorreu em outros trabalhos encontrados na literatura ^(81, 88, 89).

Quanto à 6-MMP, cerca de 90% dos pacientes apresentaram valores inferiores ao limite superior testado. Nos casos em que o valor foi maior que esse limite, uma diluição na proporção de 1:10 com água foi suficiente para a sua confirmação. Concentrações de 6-MMP inferiores a $60 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ocorreram em menor proporção que para a 6-TGN provavelmente devido ao metabolismo da AZA ^(55, 56, 81).

A seletividade do método foi testada inicialmente com soluções aquosas dos metabólitos. A eluição isocrática, quando a fase móvel se mantém inalterada durante toda a análise, não possibilitou a separação satisfatória dos picos obtidos. Para que isso ocorresse, o uso do gradiente de eluição da fase móvel, metanol e tampão fosfato (0,02 M, $\text{pH} \cong 3$) foi essencial.

No comprimento de onda de interesse (342 nm) a análise do *pool* de hemácias (branco) não indicou nenhum composto interferente nos tempos de retenção dos metabólitos pesquisados, mesmo em amostras lipêmicas, ictéricas ou de pacientes que usavam outros medicamentos. Isto pode ser atribuído ao fato de que as amostras são previamente lavadas, restando somente as hemácias para a análise.

A comparação entre o cromatograma obtido a partir da análise de um *pool* de papa de hemácias adicionada de padrões e o cromatograma de uma amostra de paciente mostrou que os tempos de retenção dos padrões e os das amostras foram os mesmos e que, portanto, o método é específico (Figura 12).

A recuperação do método variou entre 95,08 e 100,80% para a 6-TGN e entre 95,38 e 105,06% para a 6-MMP, resultados próximos a 100% e com CV menores que 5%. Esses são considerados adequados, já que valores de recuperações entre 70 e 120% são aceitos na maioria dos procedimentos de validação analítica, desde que sejam precisos e exatos ⁽⁹²⁾. É possível notar que a eficiência do processo de

recuperação do método desenvolvido pelo nosso grupo é superior à de outros métodos encontrados na literatura ^(85, 86, 87, 89).

Nos estudos realizados por Lennard *et al.* ^(85, 86) a recuperação média do método foi inferior a 70% para a 6-TGN e de 73% para a 6-MMP. A concentração do AFM influenciou no processo de extração e recuperação, quanto maior a concentração desse composto maior a recuperação da 6-TGN. No entanto, o uso do AFM deve ser evitado por se tratar de um composto rico em mercúrio.

No método descrito por Dervieux *et al.* ⁽⁸⁷⁾ a recuperação média foi de 73,1% para a 6-TGN e de 84% para a 6-MMP, enquanto no método apresentado por Oliveira *et al.* ⁽⁸⁹⁾ a recuperação média foi de 73,2% e de 97,4%, respectivamente. Até o momento, os trabalhos descritos na literatura indicam apenas a recuperação média obtida, ao contrário do nosso trabalho, que aponta os valores de recuperação para cada concentração analisada. Além disso, é possível observar que em todos os estudos apresentados a recuperação da 6-MMP foi superior a da 6-TGN.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas realizadas sob as mesmas condições ⁽⁹²⁾. Os resultados de dez análises consecutivas apresentaram CV entre 1,09 e 5,06% para a 6-TGN e entre 2,84 e 5,59% para a 6-MMP. O método desenvolvido satisfaz os critérios de repetibilidade dos guias consultados, em que são aceitos CV de até 15%, podendo ser considerado adequado às exigências das legislações nacionais e internacionais ^(91, 93, 94). Apenas o trabalho realizado por Pike *et al.* ⁽⁸⁸⁾ traz os resultados dos estudos da repetibilidade do método, inferiores a 10% para ambos os metabólitos e, portanto, semelhante ao encontrado por nosso grupo.

A reprodutibilidade expressa variações intralaboratoriais, como diferentes dias de análise, diferentes analistas e diferentes equipamentos ⁽⁹²⁾. Os resultados de dez análises realizadas em diferentes dias apresentaram CV entre 7,18 e 8,65% para a 6-TGN e entre 4,88 e 12,73% para a 6-MMP. Lennard *et al.* ^(85, 86) apresentaram trabalhos em que os CV da reprodutibilidade foram ligeiramente inferiores aos encontrados por nosso grupo – entre 2,1 e 7,8% para a 6-TGN e entre 3,9 e 9,3% para a 6-MMP – enquanto Pike *et al.* ⁽⁸⁸⁾ indicaram valores semelhantes, menor que 7,5% e que 15%, respectivamente.

Como era previsto, os CV dos testes de reprodutibilidade foram superiores aos encontrados nos testes de repetibilidade, mas ainda assim o método desenvolvido satisfaz os critérios dos guias consultados, já que são aceitos CV de até 15%, e, portanto, pode ser considerado adequado às exigências das legislações nacionais e internacionais ^(91, 93, 94).

Na avaliação da robustez do método foi possível observar a evolução satisfatória dos controles de qualidade. Em nenhum momento as medições apresentaram variações superiores a ± 2 DP, e na maior parte das análises ocorreram variações inferiores a ± 1 DP. Além disso, as variações não acompanharam nenhuma tendência, nem para limites superiores, que poderiam indicar contaminação ou arraste durante as análises, e tampouco para limites inferiores, que poderiam indicar degradação dos controles de qualidade. Em nenhum dos artigos sobre métodos para a TDM da AZA encontraram-se dados referentes aos estudos de avaliação da robustez. Em nosso trabalho ficou claro que o método possui robustez intrínseca e, portanto, é adequado para uso rotineiro.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica, do material e das condições de acondicionamento utilizados ⁽⁹¹⁾. Os testes de estabilidade foram realizados de forma a simular as condições em que a amostra pode ser armazenada sem prejuízo das análises.

Ambos os metabólitos são estáveis por pelo menos oito semanas nas hemácias lavadas e armazenadas em congelador (-15 a -25 °C) ou refrigerador (2 a 8 °C). Em temperatura ambiente (21 a 23 °C) somente a 6-TGN foi estável por 24h, mas, como queremos quantificar ambos os metabólitos em uma única análise, sob estas condições a amostra foi considerada instável, já que a análise da 6-MMP está prejudicada.

As amostras desproteinizadas e hidrolisadas, prontas para a injeção cromatográfica, podem ser armazenadas em congelador (-15 a -25 °C) por até 24h, já que nessas condições ambos os metabólitos são estáveis. Em refrigerador (2 a 8°C) somente a 6-MMP apresentou estabilidade satisfatória por 24 horas. Contudo, sob estas condições a amostra foi considerada instável, já que a análise da 6-TGN está prejudicada.

Observou-se que a estabilidade da 6-MMP na amostra somente lavada é inferior à estabilidade da 6-TGN. No entanto, quando a amostra é extraída ocorre uma inversão. Este fato pode estar relacionado ao fato da 6-MMP ser encontrada na amostra somente após o processo de aquecimento e hidrólise. É provável que nesse processo ocorra alguma mudança estrutural na molécula que, além de permitir sua quantificação, também aumente sua estabilidade ^(85, 86).

Diversos trabalhos descritos na literatura apresentam estudos de estabilidade, contudo, a comparação entre eles é prejudicada pelas diferentes condições em que foram realizados. Um fato interessante observado nos trabalhos de Lennard *et al.* ^(84, 85) é a maior estabilidade encontrada nos estudos em que a extração foi realizada com o AFM. Este composto se liga aos nucleotídeos de 6-TGN formando adutos de mercúrio, estruturas altamente estáveis ^(84, 85). Os autores observaram que a 6-TGN é estável na amostra extraída por mais de uma semana a 4°C e por 36h em temperatura ambiente.

O trabalho realizado por Pike *et al.* ⁽⁸⁸⁾ não apresentou estudo de estabilidade para amostra extraída. Em sangue total armazenado à temperatura ambiente ocorreu um decaimento de 2 a 4% ao dia das concentrações de 6-TGN, enquanto a -80°C houve decaimento de 1% em uma semana e de 12% em seis meses. No caso da 6-MMP os autores observaram que este metabólito é estável por pelo menos seis meses a -80°C.

Em relação a métodos alternativos para determinação dos níveis de 6-TGN e de 6-MMP, a LC-MS pode ser útil. O único estudo ⁽⁹⁰⁾ publicado com essa metodologia quantificou simultaneamente os metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP e comparou os resultados com os obtidos com o método desenvolvido por Lennard e Singleton ⁽⁸⁶⁾. Os autores concluíram que os métodos são equivalentes, no entanto, o equipamento de LC-MS pode realizar as análises em metade, ou em alguns casos, em um quarto do tempo necessário a outros métodos por HPLC, o que é uma grande vantagem para laboratórios de rotina.

6.2 PACIENTES

Em nosso trabalho foram analisadas as concentrações de 6-TNG e 6-MMP em amostras de 124 (49,6%) pacientes, entre um total de 250 transplantados de rim que fazem uso de AZA e são acompanhados no HCFMUSP. Esta é uma parcela considerável dos indivíduos aptos a participar do estudo e representa uma das maiores populações de transplantados renais em que foram avaliados os níveis desses metabólitos ^(78, 80, 81).

Existe uma grande variação dos resultados encontrados nos trabalhos da literatura. De forma geral, os nossos estão em faixas terapêuticas próximas às encontradas em outros estudos envolvendo transplantados de rim ^(78, 80) ou portadores de outras patologias, como leucemias ^(86,89) e doenças inflamatórias intestinais ⁽⁸⁸⁾. Assim, o alcance dos estudos envolvendo a AZA torna-se ainda maior, já que o método desenvolvido nesse trabalho e testado em transplantados renais pode ser aplicado para TDM de todos os pacientes que usam a AZA, independente da patologia.

As semelhanças entre os resultados encontrados na nossa população e os encontrados em outros estudos são mais evidentes quando comparamos os valores de mediana e média, mas tais dados nem sempre estão disponíveis. Quando observamos os resultados dos níveis de 6-TGN na literatura, constantemente nos deparamos com valores de não detectáveis a superiores a $1000 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$. Em relação à 6-MMP é comum observarmos dados ainda mais discrepantes, já foram descritos valores de não detectáveis a aproximadamente $50000 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ^(88, 89).

Esses resultados justificam-se pela grande variabilidade farmacocinética da AZA ⁽³⁸⁻⁴⁷⁾, causada principalmente pelas diferenças interindividuais da atividade da TPMT ⁽⁴⁸⁻⁵⁸⁾ e também pelas características das populações avaliadas, como diferentes patologias, faixas etárias e regimes terapêuticos ^(78, 81, 86, 89).

Além disso, não foram excluídos do nosso estudo pacientes que eventualmente apresentassem algum sinal de toxicidade causada pelo

medicamento, o que pode explicar a ocorrência de valores superiores a $1000 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ para a 6-TGN ($n=5$, 4%) e $50000 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ para a 6-MMP ($n=3$, 2,4%).

A não aderência ao tratamento é outro fator que favorece a ocorrência de valores inferiores a $60 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ para ambos os metabólitos. A adesão ao tratamento foi avaliada por Nevins *et al.* ^(82, 83) e variou de 16 a 100% e foi considerada um fator importante na evolução do transplante.

Entre os pacientes avaliados em nosso estudo apenas 4% apresentaram valores de 6-TGN e de 6-MMP inferiores a $60 \text{ pmol}/8 \times 10^8$. Esses valores podem ocorrer raramente, devido a uma deficiência na atividade da GSH, que compromete a conversão da AZA em 6-MP (Figura 7) ^(39, 40). Salvo a ocorrência dessa deficiência, o mais provável é que estes pacientes não estejam aderindo ao tratamento adequadamente. A TDM dos metabólitos é precisa na avaliação da aderência ao tratamento, já que quando questionados sobre o uso dos medicamentos, alguns pacientes podem mentir ou se confundir em relação a doses e horários.

Em relação à faixa terapêutica de 6-TGN que apresenta os melhores resultados na terapia com a AZA, os dados da literatura são escassos e inconclusivos, principalmente em transplantados de rim. Um estudo com 360 transplantados renais sugeriu que o intervalo de 100 a $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ apresenta resultados clínicos superiores quando comparados aos obtidos em pacientes com níveis de 6-TGN inferiores a $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8$. No entanto esse estudo não avaliou os resultados em grupos com valores de 6-TGN superiores a $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ⁽⁸⁰⁾; em nosso estudo 50% dos pacientes apresentaram concentrações superiores a esse valor.

Em portadores de IBD, um estudo realizado com 92 pacientes sugere que os melhores resultados na remissão da doença são obtidos com níveis de 6-TGN superiores a $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ⁽⁹⁵⁾, um outro feito também em portadores de IBD sugere valores superiores a $250 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ⁽⁹⁸⁾.

O aumento dos níveis de 6-TGN até o limite em que não há mielotoxicidade pode ser alcançado com a adição de pequenas doses de alopurinol à terapia com AZA. Esse fato foi primeiramente reportado por Chocair *et al.* e aparenta ser uma promissora alternativa na imunossupressão pós-transplante ⁽¹⁵⁾. Além disso, a adição

do alopurinol à terapia reduz o número de pacientes que apresentam níveis de 6-TGN indetectáveis e diminui os níveis de 6-MMP⁽⁸¹⁾.

Os estudos relacionados aos níveis de 6-MMP em que existe maior probabilidade de ocorrência de hepatotoxicidade são ainda mais raros. Em transplantados estes níveis ainda não foram descritos. Em portadores de IBD, um estudo realizado com 92 pacientes sugere que a ocorrência de hepatotoxicidade ocorre em níveis de 6-MMP superiores a $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ⁽⁹⁵⁾. Por outro lado, em estudo mais recente não foi encontrada correlação entre os níveis de 6-MMP e a ocorrência de hepatotoxicidade⁽⁹⁶⁾.

Entre os pacientes avaliados em nosso estudo 54% apresentaram valores inferiores a $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$. Os dados encontrados na literatura são insuficientes para estabelecer uma comparação com os nossos.

O objetivo do nosso estudo não foi propor os intervalos de referência da 6-TGN e da 6-MMP, mas sim estabelecer os níveis encontrados na população estudada. Contudo, futuras pesquisas randomizadas poderão indicar esses intervalos. Nosso estudo demonstrou que o nível de 6-TGN ($\text{pmol}/8 \times 10^8$ RBC) encontrado na população está diretamente correlacionado com a dose de AZA ingerida ($r = 0,198$ e $p = 0,027$), apesar de apresentar correlação fraca, inferior a 0,3 (Tabela 20). A correlação entre os níveis de 6-TGN e a dose de AZA já foi relatada em outros estudos e os resultados também demonstraram correlações fracas, $r = 0,0009$ ⁽⁹⁵⁾ e $r = 0,12$ e $r^2 = 0,015$ ⁽⁹⁶⁾. A fraca correlação entre a dose de AZA e os níveis de 6-TGN sustenta a necessidade da TDM no tratamento imunossupressor.

Nosso estudo indica que o nível de 6-MMP ($\text{pmol}/8 \times 10^8$ RBC) está diretamente correlacionado com o tempo pós-transplante ($r = 0,251$ e $p = 0,005$), isto é, a concentração da 6-MMP ($\text{pmol}/8 \times 10^8$ RBC) tende a aumentar com o passar dos anos pós-transplante (Tabela 20). Na literatura há trabalhos em que é reportado o aumento da TPMT com o passar dos anos de uso da AZA^(56,57), sendo o primeiro deles publicado por Chocair *et al.*. Provavelmente este aumento deve-se ao fato da enzima ser induzida pelo seu substrato, o que resulta em aumento dos níveis de 6-MMP e, possivelmente, ao da dose do medicamento⁽⁹⁷⁾.

Observou-se ainda que o nível de 6-MMP ($\text{pmol}/8 \times 10^8$ RBC) está diretamente correlacionado com o aumento da 6-TGN ($r = 0,201$ e $p = 0,025$), isto é,

a concentração da 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC) tende a crescer à medida que a concentração de 6-TGN aumenta (Tabela 20). A 6-TGN e a 6-MMP apresentam vias enzimáticas competitivas, por esse motivo esperava-se uma correlação negativa entre elas. No entanto, a correlação positiva entre esses metabólitos já foi relatada previamente ($r = 0,21$ e $p = 0,007$)⁽⁹⁵⁾.

Os resultados das análises dos pacientes categorizados segundo sexo, número de transplantes de rim e dose de AZA ingerida, indicaram que os níveis de 6-MMP ($\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC), segundo o teste Mann-Whitney, são estatisticamente maiores nos pacientes do sexo feminino ($p = 0,024$) (Tabela 21). Não se encontraram na literatura estudos sobre a influência do sexo no estabelecimento dos níveis de 6-MMP. Esta é a primeira vez que este dado é reportado.

Quando os valores de 6-TGN foram categorizados segundo a dose de AZA (mg/kg) ingerida e o número de transplantes, o resultado do teste da razão de verossimilhanças indicou que não há associação estatisticamente significativa entre a dose de AZA (mg/kg) e a ocorrência de concentração de 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC ($p = 0,244$). No entanto foi evidente a redução do percentual de pacientes com 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC à medida que se aumentou a dose de AZA (Tabela 22).

Pode-se também observar através do teste qui-quadrado que os 106 pacientes que realizaram um único transplante renal, quando comparados aos 18 pacientes que passaram por 2 ou 3 transplantes, apresentam menor percentual estatisticamente significativo ($p = 0,034$) de indivíduos com valores de 6-TGN $< 60 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ RBC, sendo 25,5% no primeiro grupo contra 50,0% no segundo grupo (Tabela 22).

A partir desse fato podemos especular que a rejeição do transplante e a perda do órgão está relacionada à não formação de 6-TGN em quantidade adequada, conforme sugeriu Bergan *et al.*⁽⁸⁰⁾. Teoricamente esses pacientes são candidatos ao uso de alopurinol em conjunto com a AZA, caso esses valores persistam mesmo com o aumento da dose do medicamento.

Atualmente, a metodologia desenvolvida está devidamente implantada em nosso laboratório. Semanalmente são realizadas análises das amostras de

pacientes provenientes das clínicas de nefrologia, gastroenterologia, neurologia e dermatologia.

O método cromatográfico proposto é simples, preciso e rápido na determinação das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e 6-MMP em pacientes sob terapia com AZA. Além disso, permite que o corpo clínico individualize as doses de AZA e identifique os casos de não aderência ao tratamento. Todas essas vantagens podem ser facilmente obtidas com uma boa relação custo-benefício, principalmente se levarmos em conta que o custo de uma dessas análises no *Mayo Medical Laboratory - Mayo Clinics (Rochester, USA)* é de aproximadamente US\$ 268,00 e que o único laboratório do país que faz essas análises rotineiramente é o Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

1. O método desenvolvido e validado apresentou características analíticas de acordo com as normas preconizadas por órgãos nacionais e internacionais.
2. Os níveis dos metabólitos, 6-TGN e 6-MMP, encontrados na população avaliada são compatíveis com os relatados em outros estudos.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Hitchings GH, Elion GB, Falco EA, Russell PB, Sherwood MB, VanderWerff H. Antagonists of nucleic acid derivatives I. The *Lactobacillus casei* model. *J Biol Chem.* 1950; 183:1-9.
- 2) Hitchings GH, Falco EA. Antagonists of nucleic acid derivatives II. Reversal studies with substances structurally related to thymine. *J Biol Chem.* 1950; 643-49.
- 3) Philips FS, Sternberg SS, Hamilton L, Clarke DA. The toxic effects of 6-mercaptopurine and related compounds. *Ann N Y Acad Sci.* 1954; 60(2):283-96.
- 4) Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leon IA, Karnof-Sky DA, Craver IF, Dargeon HW, Rhoads CP. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood.* 1953; 8(11):965-99.
- 5) Greenberg GR, Jaenicke L. The chemistry and biology of purines,. Ed. G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor, 1957, p. 204-32. London, UK.
- 6) Buchanan JM, Flaks JG, Hartman SC, Levenberg B, Lukens LN, Warren L. The chemistry and biology of purines. Ed. G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor, 1957, p. 233-52. London, UK.
- 7) Buchanan JM, Hartman SC. Enzymatic reactions in the synthesis of the purines. *Adv Enzymol.* 1959; 21:199.
- 8) Elion GB. Pharmacological basis of cancer chemotherapy. Ed. Williams and Wilkins, 1975, p. 547-64. Baltimore, USA.
- 9) Clarke DA, Elion GB, Hitchings GH, Stock CC. Structure-activity relationships among purines related to 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* 1958; 445:56.
- 10) Elion GB, Hitchings GH. Antineoplastic and immunosuppressive agents. Handbook of experimental pharmacology, 1975, v. 38(2), p. 404-25. Ed. A.C. Sartorelli and D.G. Jones. Berlin, DE.

- 11) Schwartz R, Stack J, Dameshek W. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958; 99(1):164-7.
- 12) Calne RY. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by drugs. *Ann R Coll Surg Engl.* 1963; 32(5):281-302.
- 13) Calne R Y, Alexandre GPJ, Murray JE. A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. *Ann N Y Acad Sci.* 1962; 99:743-61.
- 14) Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med.* 1963; 268:1315-23.
- 15) Chocair PR. Contribuição para o estudo da azatioprina. Potencialização de sua atividade imunossupressora pelo alopurinol em pacientes com transplante renal. São Paulo, 1994. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- 16) Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 1999; 1-21.
- 17) Adcock IM, Ito K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2000; 55(3):256-66.
- 18) Morris PJ, Chan L, French ME, Ting A. Low dose oral prednisolone in renal transplantations. *Lancet.* 1982; 1(8271):525-7.
- 19) Papadakis J, Brown CB, Cameron JS, Adu D, Bewick M, Donaghey R, Ogg CS, Rudge C, Williams DG, Taube D. High versus “low” dose corticosteroids in recipients of cadaveric kidneys: prospective controlled Trial. *Br Med J.* 1983; 286(6371):1097-100.
- 20) D’Apice AJ, Becker GJ, Kincaid-Smith P, Mathew TH, Ng J, Hardie IR, Petrie JJB, Rigby RJ, Dawborn J, Heale WF, Miach PJ. A prospective randomized trial of low-dose versus high-dose steroids in cadaveric renal transplantation. *Transplantation.* 1984; 37(4):373-7.
- 21) Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem.* 2002; 131(1):1-15.

- 22)** Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, Roy A, Murphy G, Tan A, Hendricks L, Guilbault N, Levy G. Peak cyclosporine levels (C_{max}) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of Neoral and Sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation*. 1999; 67(8):1133-7.
- 23)** Lindholm A, Albrechtsen D, Tufveson G, Karlberg I, Persson, Nils H, Groth CG. A randomized trial of cyclosporine and prednisolone versus cyclosporine, azathioprine and prednisolone in primary cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1992; 54(4):624-31.
- 24)** Hardie IR, Tiller DJ, Mahony JF, Miach PJ, Thomson NM, Thatcher GN, Rigby RJ, Menzies BL. Optimal combination of immunosuppressive agents for renal transplantation: first report of a multicentre, randomised trial comparing cyclosporine + prednisolone with cyclosporine + azathioprine and with triple therapy in cadaver renal transplantation. The Australian Collaborative Trials Committee. *Transplant Proc*. 1993, 25(1):583-4.
- 25)** Remuzzi G, Bertani T. Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. *Am J Kidney Dis*. 1989; 13(4):261-72.
- 26)** Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation*. 2004; 77(9):1457-9.
- 27)** Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, Dias L, Sarmento A M, Amil M. Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? *Transplant Proc*. 2004; 36(4): 877-9.
- 28)** Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet*. 2002; 359(9308):741-6.
- 29)** Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplantation*. 1996; 10(1 pt 2):77-84.
- 30)** The Tricontinental Mycophenolate Mofetil renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1996; 61(7): 1029-37.
- 31)** Bernabeu-Wittel M, Naranjo M, Cisneros JM, Cañas E, Gentil M, Algarra G, Pereira P, González-Roncero F, Alarcón A, Pachón J. Infections in renal transplant

recipients receiving mycophenolate versus azathioprine based immunosuppression. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21:173-180.

- 32) Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant*. 2004; 18(5):485-92.
- 33) Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995; 60(3):225-32.
- 34) Shah S, Collett D, Johnson R, Thuraisingham RC, Raftery MJ, Rudge CJ, Yaqoob MM. Long-term graft outcome with mycophenolate mofetil and azathioprine: a paired kidney analysis. *Transplantation*. 2006; 82(12):1634-9.
- 35) Schold JD, Kaplan B. AZA/tacrolimus is associated with similar outcomes as MMF/Tacrolimus among renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2009; 9(9):2067-74.
- 36) Woodroffe R, Yao GL, Meads C, Bayliss S, Ready A, Raftery J, Taylor RS. Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modelling study. *Health Technol Assess*. 2005; 9(21).
- 37) Remuzzi G, Lesti M, Gotti E, Ganeva M, Dimitrov BD, Ene-Iordache B, Gherardi D, Donati D, Salvadori M, Sandrini S, Valente U, Segoloni G, Mourad G, Federico S, Rigotti P, Sparacino V, Bosmans JL, Perico N, Ruggenenti P. Mycophenolate mofetil (MMF) versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation: a randomized trial. *Lancet*. 2004; 364:503-12.
- 38) Chalmers AH. Studies on the mechanism of formation of 5-mercapto-1-methyl-4-nitroimidazole, a metabolite of the immunosuppressive drug azathioprine. *Biochem Pharmacol*. 1974; 23(13):1891-901.
- 39) Elion GB. The comparative metabolism of Imuran and 6-mercaptopurine in man. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1969; 10:21.
- 40) Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992; 43(4):329-39.

- 41) Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Lipsky JJ. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut*. 1996; 39(1): 63-8.
- 42) Elion GB. Significance of azathioprine metabolites. *Proc R Soc Med*. 1972; March; 65(3):257-60.
- 43) Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neill D, Narang PK, Chabner B, Poplack DG. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med*. 1983; 308(17):1005-9.
- 44) Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 1990; 30: 358-63.
- 45) Ohlman S, Albertioni F, Peterson C. Day-to-day variability in azathioprine pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Clin Transplant*. 1994; 8(3 Pt 1):217-23.
- 46) Lennard L, Brown CB, Fox M, Maddocks JL. Azathioprine metabolism in kidney transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 1984; 18(5): 693-700.
- 47) Lin SN, Jessup K, Floyd M; Wang TPF, Van Buren CT, Caprioli RM, Kahan BD. Quantitation of plasma azathioprine and 6-mercaptopurine levels in renal transplant patients. *Transplantation*; 1980; 29(4):290-4.
- 48) Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980; 32(5): 651-62.
- 49) Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum RM. Thiopurine Methyltransferase Pharmacogenetics: Human Gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol*. 1996;15(1):17-30.
- 50) Salavaggione OE, Liewei W, Wiepert M, Yee VC, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15(11):801-15.

- 51) Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenet Genomics*. 2003; 13(6):371-3.
- 52) Kurzawski M, Dziewanowski K, Gawronska-Szklarz B, Domanski L, Drozdziak M. The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism on azathioprine-induced myelotoxicity in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2005; 27(4): 435-41.
- 53) Xin HW, Xiong H, Wu XC, Li Q, Xiong L, Yu AR. Relationships between thiopurine S-methyltransferase polymorphism and azathioprine-related adverse drug reactions in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009; 65:249-255.
- 54) Song DK, Zhao J, Zhang LR. TPMT genotype and its clinical implication in renal transplant recipients with azathioprine treatment. *J Clin Pharm Ther*. 2006; (6):627-35.
- 55) Chocair PR, Duley JA, Sabbaga E, Arap S, Simmonds HA, Cameron JS. Fast and slow methylators: do racial differences influence risk of allograft rejection? *Q J Med*. 1993; 86(6):359-63.
- 56) Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation*. 1992; 53(5):1051-6.
- 57) Dervieux T, Médard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, Loirat C, Jacqz-Aigrain E. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol*. 1999; 48(6): 793-800.
- 58) Fabre MA, Jones DC, Bunce M, Morris PJ, Friend PJ, Welsh KI, Marshall SE. The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms on azathioprine dose 1 year after renal transplantation. *Transpl Int*. 2004; 17(9): 531-9.
- 59) Soria-Royer C, Legendre C, Mircheva J, Premel S, Beauve P, Kreis H. Thiopurine-methyltransferase activity to assess azathioprine myelotoxicity in renal transplant recipients. *Lancet*. 1993; 341:1593-4.
- 60) Anstey A, Lennard L, Mayou SC, Kirby JD. Pancytopenia related to azathioprine - an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: a review. *J R Soc Med*. 1992; 85(12):752-6.

- 61) Leipold G, Schutz E, Haas JP, Oellerich M. Azathioprine-induced severe pancytopenia due to a homozygous two-point mutation of the thiopurine methyltransferase gene in a patient with juvenile HLAB27-associated spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:1896–8.
- 62) Schutz E, Gummert J, Mohr F, Oellerich M. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet.* 1993; 341(8842):436.
- 63) Ari ZB, Mehta A, Lennard L, Burroughs AK. Azathioprine-induced myelosuppression due to in thiopurine methyltransferase deficiency in a patient with autoimmune hepatitis heart transplant recipient. *Hepatol.* 1995; 23(3):351-4.
- 64) Vannaprasaht S, Angsuthum S, Avihingsanon Y, Sirivongs D, Pongskul C, Makarawate P, Praditpornsilpa K, Tassaneeyakul W, Tassaneeyakul W. Impact of the heterozygous TPMT*1/*3C genotype on azathioprine-induced myelosuppression in kidney transplant recipients in Thailand. *Clin Ther.* 2009; 31(7):1524-33.
- 65) Cummins D, Sekar M, Halil O, Banner N. Myelosuppression associated with azathioprine-allopurinol interaction after heart and lung transplantation. *Transplantation.* 1996; 61(11):1661-2.
- 66) Yenson PR, Forrest D, Schmiegelow K, Dalaw BI. Azathioprine-associated acute myeloid leukemia in a patient with Crohn's disease and thiopurine S-methyltransferase deficiency. *Am J Hematol.* 2008; 83(1):80-3.
- 67) Offman J, Opelz G, Doehler B, Cummins D, Halil O, Banner NR, Burke MM, Sullivan D, Macpherson P, Karran P. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood.* 2004; 104(3):822-8.
- 68) Mignozzi M, Picca S. Chronic myelogenous leukemia following kidney transplantation in a pediatric patient. *Pediatric Nephrology.* 2001; 16(11):852-3.
- 69) Johnson HE, Smith TR, Weaver SA. Azathioprine induced hepatotoxicity in inflammatory bowel disease: is it as rare as we think? *Gut.* 2007. 56:146-63.
- 70) DeLeve LD, Wang X, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease. *Hepatol.* 2003; 23(3),589-99.

- 71) Lee AU, Farrell GC. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. *Hepatology*. 2001; 35(6):756-64.
- 72) Shaye OA, Yadegari M, Abreu MT, Poordad F, Simon K, Martin P, Papadakis KA, Ippoliti A, Vasiliauskas E, Tran TT. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine (AZA) in adult IBD patients. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102(11):2488-94.
- 73) Gisbert JP, Luna M, González-Lama Y, D Pousa I, Velasco M, Moreno-Otero R, Maté J. Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients Inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13(9):1106-14.
- 74) Contreras AM, Monteón FJ, Flores MR, Mendoza-Sánchez F, Ruiz I. Drug-related hepatotoxicity in a renal transplant recipient with long-term survival and hepatitis C. *Ann Hepatol*. 2007; 6(1):70-3.
- 75) Kontorinis N, Agarwal K, Gondolesi G, Fiel MI, O'Rourke M, Schiano TD. Diagnosis of 6-mercaptopurine hepatotoxicity post liver transplantation utilizing metabolite assays. *Am J Transplant*. 2004; 4(9):1539-42.
- 76) Sterneck M, Wiesner R, Ascher N, Roberts J, Ferrell F, Ludwig J, Lake J. Azathioprine hepatotoxicity after liver transplantation. *Hepatology*. 2005; 14(5):806-10.
- 77) Johnston A, Holt DW. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 1999; 47:339-50.
- 78) Bergan S, Rugstad HE, Bentdal Ø, Stokke O. Monitoring of azathioprine treatment by determination of 6-thioguanine nucleotide concentrations in erythrocytes. *Transplantation*. 1994; 58(7):803-7.
- 79) Bergan S, Rugstad HE, Klemetsdal B, Giverhaug T, Bentdal Ø, Sødal G, Hartmann A, Aarbakke J, Stokke O. Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. *Ther Drug Monit*. 1997; 19(3):318-26.
- 80) Bergan S, Rugstad HE, Bentdal Ø, Sødal G, Hartmann A, Leivestad T, Stokke O. Monitored high-dose azathioprine treatment reduces acute rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation*. 1998; 66:334-9.
- 81) Chrzanowska M, Krzymanski M. Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine metabolites in renal transplantation recipients and patients

- with glomerulonephritis treated with azathioprine. *Drug Monitoring*. 1999; 21(2):231-7.
- 82)** Nevins TE, Kruse L, Skeans MA, Thomas W. The natural history of azathioprine compliance after renal transplantation. *Kidney Int*. 2001; 60(4):1565-70.
- 83)** Nevins TE, Thomas W. Quantitative patterns adherence after renal transplantation. *Transplantation*. 2009; 87(5):711-8.
- 84)** Lennard L, Maddocks JL. Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *J Pharm Pharmacol*. 1983; 35(1):15-8.
- 85)** Lennard L. Assay of 6-thioinosinic acid and 6-thioguanine nucleotides, active metabolites of 6-mercaptopurine, in human red blood cells. *J Chromatogr*. 1987; 423:169-78.
- 86)** Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr*. 1992; 583(1):83-90.
- 87)** Dervieux T, Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem*. 1998; 44:551-5.
- 88)** Pike MG, Franklin CL, Mays DC, Lipsky JJ, Lowry PW, Sandborn WJ. Improved methods for determining the concentration of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine nucleotides in blood. *J Chromatogr B*. 2001; 757:1-9.
- 89)** Oliveira BM, Romanha AJ, Alves TMA, Viana MB, Zani CL. An improved HPLC method for the quantitation of 6-mercaptopurine and its metabolites in red blood cells. *Braz J of Med Biol Res*. 2004; 37:649-58.
- 90)** Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Boulieu R, Neri B, Seidman E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy. *Clin Chem*. 2005; 51(11):2074-84.

- 91)** Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Resolução n.899, 29 de maio de 2003”, determina a publicação do Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos [acesso em jan de 2007]. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132.
- 92)** Lanças FM. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Paulo: RiMa, 2004.
- 93)** United States. Analytical Methods Technical Committee of the Chemistry Manufacturing Controls Coordinating Committee (CMCCC). Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Validation of chromatographic methods. Rockville, 1994 [acesso em janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>.
- 94)** Clinical and Laboratory Institute (CLSI). Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved Guideline - EP-5 A2, 2^a. ed. Wayne; 2006, 48 p.
- 95)** Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000; 118(4):705-13.
- 96)** Ooi CY, Bohane TD, Lee D, Naidoo D, Day AS. Thiopurine metabolite monitoring in paediatric inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 25:941-7.
- 97)** Gardiner SJ, Begg EJ, Barclay ML, Kirkpatrick CM. Genetic polymorphism and outcomes with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Adverse Drug React Toxicol Rev*. 2000; 19:293–312.
- 98)** Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001; 48:642–6.

ANEXOS

ANEXO 1

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN	6-MMP
					Vivo/ Cadáver										$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$	$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$
1	2007	62	M	1	V	1996	51	11	150	70	2,14	5,0	100	.	<60	10368
2	2007	32	M	1	C	1993	18	14	100	48	2,08	7,5	100	.	329	5693
3	2007	43	F	1	C	1992	28	15	150	59	2,54	7,5	.	.	202	7207
4	2007	34	F	1	C	1995	22	12	100	78	1,28	7,5	75	.	237	4741
5	2007	44	F	2	C	2000	37	7	75	49	1,53	5,0	.	4	<60	919
6	2009	55	M	1	C	2006	52	3	100	80	1,25	7,5	.	1	719	945
7	2007	33	M	2	V	1990	16	17	150	56	2,68	5,0	200	.	423	7804
8	2007	35	M	1	V	1999	27	8	100	86	1,16	5,0	.	4	<60	2830
9	2007	53	F	2	C	2003	49	4	100	57	1,75	5,0	.	3	<60	16505
10	2009	39	M	1	C	1996	26	13	100	103	0,97	10,0	175	.	<60	686
11	2007	39	F	1	V	1996	28	11	100	77	1,30	7,5	200	.	221	23010
12	2008	53	F	2	C	2005	50	3	125	67	1,87	5,0	.	6	<60	3253
13	2007	75	F	1	C	2000	68	7	100	58	1,72	5,0	100	.	831	4233
14	2009	52	M	1	C	2008	51	1	150	72	2,08	7,5	15	1,5	389	1367
15	2007	64	M	2	C	1997	54	10	25	75	0,33	5,0	150	.	<60	0
16	2008	63	M	1	V	1981	36	27	150	73	2,05	10,0	.	.	232	4205
17	2007	62	F	1	V	1986	41	21	150	66	2,27	7,5	.	.	560	7809

Continua

Continuação

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador Vivo/ Cadáver	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN	6-MMP
															$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$	$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$
18	2007	79	F	1	V	1990	62	17	150	74	2,03	5,0	.	.	200	113057
19	2007	25	F	1	V	1999	17	8	100	58	1,72	5,0	150	.	0	2104
20	2007	50	M	1	C	1991	34	16	100	74	1,35	7,5	150	.	212	2120
21	2008	49	F	1	C	2007	48	1	125	64	1,95	5,0	.	3	155	12262
22	2007	25	F	2	C	2003	21	4	100	55	1,82	5,0	.	2	<60	1028
23	2009	51	M	1	C	1997	39	12	175	87	2,01	7,5	200	.	494	3434
24	2007	55	F	1	V	1975	23	32	100	58	1,72	5,0	.	.	124	2505
25	2009	57	M	1	V	1970	18	39	150	89	1,69	.	.	.	166	5718
26	2007	34	F	2	V	2005	32	2	100	44	2,27	5,0	.	3	183	443
27	2007	43	F	1	V	2000	36	7	75	74	1,01	7,5	150	.	<60	6467
28	2009	51	F	1	C	1994	36	15	100	89	1,12	5,0	.	2	223	5653
29	2009	34	F	2	V	1990	15	19	100	38	2,63	5,0	50	.	187	547
30	2007	28	F	1	V	1991	12	16	100	54	1,85	5,0	.	6	966	19730
31	2007	28	F	1	V	2005	26	2	100	51	1,96	5,0	.	6	301	5027
32	2009	32	F	1	C	2007	30	2	100	40	2,50	5,0	.	3	200	2859
33	2007	38	M	1	V	1983	14	24	125	38	3,29	7,5	.	.	614	14328
34	2009	25	M	1	V	1995	11	14	125	58	2,16	5,0	100	.	1034	10268
35	2007	46	F	1	V	2000	39	7	100	81	1,23	5,0	.	2	1569	40281

Continua

Continuação

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador Vivo/ Cadáver	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN	6-MMP
															$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$	$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$
36	2007	57	M	1	C	2000	50	7	75	40	1,88	5,0	.	2	123	2510
37	2007	41	F	1	V	2002	36	5	100	62	1,61	5,0	.	2	283	6463
38	2007	49	F	2	C	1997	39	10	125	76	1,64	5,0	200	.	415	20232
39	2007	41	M	1	V	2000	34	7	175	112	1,56	15,0	150	.	102	5385
40	2008	54	M	1	C	2008	54	0	100	80	1,25	10,0	.	18	309	1848
41	2009	63	M	1	C	2007	61	2	100	60	1,67	5,0	.	2	680	1825
42	2007	41	M	1	C	1998	32	9	150	68,5	2,19	5,0	200	.	<60	2496
43	2007	60	M	1	C	2000	53	7	100	55	1,82	5,0	100	.	102	1845
44	2008	43	M	1	C	2000	35	8	100	72	1,39	10,0	100	.	121	1239
45	2007	51	M	1	V	2001	45	6	100	66,5	1,50	7,5	.	.	464	10595
46	2009	60	M	1	V	1977	28	32	175	82	2,13	10,0	.	5	376	8032
47	2007	29	F	1	V	1994	16	13	125	54	2,31	7,5	.	4	<60	1025
48	2007	47	M	1	V	2002	42	5	175	90	1,94	5,0	150	.	281	12314
49	2007	75	F	1	V	1992	58	17	100	54	1,85	7,5	.	.	237	6931
50	2007	47	F	1	V	1999	39	8	125	63	1,98	5,0	200	.	169	7813
51	2007	45	F	1	V	1986	24	21	100	66	1,52	7,5	.	.	1112	17320
52	2007	66	F	1	V	1972	31	35	150	76	1,97	10,0	.	.	120	37616
53	2007	63	F	1	V	1998	54	9	125	60	2,08	5,0	100	.	209	29159

Continua

Continuação

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador Vivo/ Cadáver	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN pmol/ 8 x 10 ⁸ RBC	6-MMP pmol/ 8 x 10 ⁸ RBC
54	2007	71	F	1	V	1989	53	18	125	52	2,40	15,0	.	.	113	3642
55	2007	49	F	1	V	1997	39	10	100	47	2,13	6,3	.	.	447	25123
56	2009	58	M	2	C	2009	58	0	125	49	2,55	10,0	.	8	<60	3526
57	2007	55	M	1	C	2006	49	6	100	75	1,33	7,5	150	.	<60	0
58	2008	27	M	1	V	2006	25	2	125	60	2,08	5,0	.	1,5	1536	1362
59	2007	46	M	2	C	1998	37	9	125	65	1,92	5,0	200	.	<60	6546
60	2007	28	M	1	V	1996	17	11	100	51	1,96	7,9	100	.	160	16516
61	2009	51	M	1	V	1992	34	17	150	104	1,44	7,5	.	.	280	10384
62	2009	49	M	1	V	1979	18	31	25	73	0,34	5,0	125	.	<60	<60
63	2009	69	M	2	V	2008	68	1	150	72	2,08	5,0	.	.	419	335
64	2009	63	M	1	V	1999	53	10	150	62	2,42	5,0	75	.	683	13534
65	2007	55	M	1	C	1995	43	12	100	68	1,47	7,5	250	.	<60	376
66	2007	52	F	1	V	1999	44	8	100	59	1,69	5,0	150	.	201	2329
67	2007	34	F	1	V	2001	28	6	100	45	2,22	5,0	.	6	332	3881
68	2007	61	F	1	V	1981	35	26	150	67	2,24	7,5	.	.	481	93028
69	2007	56	M	1	V	1974	23	33	150	96	1,56	10,0	.	.	591	17558
70	2009	65	F	1	C	1991	47	18	100	55	1,82	5,0	100	.	<60	0
71	2007	51	F	1	C	1997	41	10	150	68	2,21	7,5	150	.	<60	2242

Continua

Continuação

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador Vivo/ Cadáver	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN pmol/ 8 x 10 ⁸ RBC	6-MMP pmol/ 8 x 10 ⁸ RBC
72	2007	57	F	1	C	1995	45	12	100	61	1,64	7,5	150	.	<60	7069
73	2007	33	F	2	C	1998	24	9	150	74	2,03	10,0	100	.	564	11567
74	2007	29	F	1	C	2002	24	5	100	80	1,25	10,0	.	.	138	11862
75	2009	38	F	1	V	2005	34	4	100	54	1,85	5,0	.	4	855	4103
76	2007	38	M	1	V	2000	31	7	200	134	1,49	10,0	175	.	674	4651
77	2007	42	M	1	C	2001	36	6	200	120	1,67	10,0	.	4	152	4535
78	2007	68	F	1	V	2002	63	5	100	58	1,72	7,5	150	.	<60	40838
79	2007	38	M	1	V	2001	32	6	150	75	2,00	10,0	100	.	<60	4963
80	2009	22	M	1	V	2001	14	8	75	43	1,74	5,0	.	6	270	1841
81	2007	46	F	1	V	1986	25	21	125	60	2,08	5,0	.	.	<60	5791
82	2007	43	F	1	C	1999	35	8	100	75	1,33	10,0	.	6	<60	16544
83	2007	48	F	1	C	2002	43	5	125	88	1,42	7,5	.	4	<60	475
84	2007	43	F	1	V	1987	23	20	150	117	1,28	10,0	.	.	<60	3035
85	2007	69	F	1	C	2004	66	3	50	60	0,83	5,0	.	2	<60	4543
86	2009	52	F	3	C	2002	45	7	100	55	1,82	5,0	.	4	<60	4364
87	2007	55	F	1	C	1997	45	10	100	41	2,44	5,0	.	.	196	16632
88	2007	61	F	1	V	1997	51	10	150	62	2,42	10,0	.	.	0	5125
89	2007	47	F	1	C	1998	38	9	50	76	0,66	5,0	.	.	106	1380

Continua

Continuação

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador Vivo/ Cadáver	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN	6-MMP
															$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$	$\mu\text{mol}/$ $8 \times 10^8 \text{ RBC}$
90	2007	35	F	1	C	1992	20	15	50	74	0,68	5,0	150	.	305	36536
91	2009	47	F	1	C	2002	40	7	100	56	1,79	10,0	.	.	417	5213
92	2007	39	F	1	V	1999	31	8	200	105	1,90	12,5	150	.	658	2284
93	2007	50	M	1	C	1998	41	9	150	80	1,88	10,0	150	.	0,0	3101
94	2007	55	F	1	V	1974	22	33	100	50	2,00	5,0	.	.	381	77254
95	2009	61	F	2	V	2003	55	6	150	51	2,94	5,0	.	1	601	11423
96	2009	32	F	2	V	1993	16	16	150	54	2,78	5,0	.	4	631	24732
97	2007	52	F	1	V	2002	47	5	150	64	2,34	5,0	.	2	0	3766
98	2008	61	M	1	C	2007	60	1	100	73	1,37	5,0	.	1	108	19888
99	2007	63	F	1	C	2000	56	7	100	76	1,32	5,0	100	4	119	8490
100	2008	27	M	1	V	1994	13	14	200	125	1,60	5,0	.	6	635	6259
101	2008	41	M	1	V	2008	41	0	150	78	1,92	5,0	.	7	100	14989
102	2008	56	M	1	V	2009	47	9	75	54	1,39	5,0	150	.	150	1232
103	2008	26	M	1	V	2004	22	4	150	58	2,59	5,0	.	2	537	504
104	2007	59	F	1	C	1996	48	11	100	65	1,54	5,0	75	.	<60	15401
105	2009	42	M	1	V	1995	28	14	100	65	1,54	5,0	100	.	128	15007
106	2008	47	F	1	V	1996	35	12	125	47	2,66	7,5	100	.	285	2445
107	2007	23	F	1	V	1997	13	10	100	42	2,38	5,0	200	.	1120	2419

Continua

Conclusão

Pacientes	Coleta	Idade	Sexo	Nº Tx	Doador Vivo/ Cadáver	Ano Tx	Idade Tx anos	T pós Tx anos	AZA mg/dia	Peso kg	AZA mg/kg	Pred mg/dia	Ciclos mg/dia	Tacro mg/dia	6-TGN pmol/ 8 x 10 ⁸ RBC	6-MMP pmol/ 8 x 10 ⁸ RBC
108	2007	53	M	1	C	2003	49	4	100	65	1,54	5,0	.	4	362	10899
109	2008	48	M	1	C	2003	43	5	200	98	2,04	10,0	.	2	280	1655
110	2007	53	F	1	V	1970	16	37	125	64	1,95	10,0	.	.	<60	12062
111	2007	53	M	3	V	1990	36	17	150	80	1,88	10,0	.	.	607	7542
112	2008	53	M	1	V	1989	34	19	125	62	2,02	7,5	.	.	295	8752
113	2007	47	M	3	V	1998	38	9	125	62	2,02	5,0	.	.	<60	5207
114	2007	58	M	1	V	1972	23	35	100	42,5	2,35	.	.	.	303	2021
115	2009	69	M	1	V	1976	36	33	100	52	1,92	5,0	.	.	210	1775
116	2007	34	M	1	C	1996	23	11	100	62	1,61	5,0	.	.	249	10139
117	2009	22	F	1	V	2007	20	2	100	52	1,92	5,0	.	4	457	<60
118	2007	46	F	1	V	1982	21	25	150	67	2,24	10,0	.	.	268	21377
119	2009	59	M	1	C	2007	57	2	200	74	2,70	5,0	.	2	178	1788
120	2008	65	F	1	V	2008	65	0	150	70	2,14	5,0	.	4	246	14220
121	2007	36	F	1	V	2002	31	5	125	58	2,16	7,5	.	2	251	3687
122	2007	37	F	1	C	1985	15	22	100	66	1,52	10,0	.	.	155	1854
123	2008	62	M	1	V	1994	48	14	150	80	1,88	5,0	200	.	<60	9786
124	2007	53	M	1	V	1976	22	31	200	100	2,00	10,0	.	.	<60	20841

ANEXO 2

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE
.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M() F()
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE:
.....
CEP: TELEFONE: DDD (.....).

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
PESQUISADOR: Nairo Massakazu Sumita
CARGO/FUNÇÃO: Diretor Técnico do Serviço de Bioquímica Clínica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 61649

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Laboratório Central

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

<input checked="" type="checkbox"/> SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA :

No máximo 3 anos.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Vários estudos já demonstraram que a medida da azatioprina no sangue é muito importante no caso de várias doenças e também contra a rejeição em transplante de órgãos. Como as pessoas são diferentes, a dose do medicamento também deve ser diferente, assim o tratamento funciona melhor e tem menos efeitos colaterais. Estes efeitos podem ser problemas causados ao fígado e ao sangue, e em casos mais graves podem levar à perda do órgão transplantado. Neste trabalho nós usaremos um pouco do sangue do senhor (a) paciente para conseguir de uma forma, parecida com outras que já existem, a medida da azatioprina no sangue do paciente. Depois de medir essa substância será feito um estudo para se tentar evitar os efeitos colaterais nos pacientes.

Não haverá nenhum desconforto para o senhor (a), o sangue já é colhido normalmente no ambulatório da Unidade de Transplantes Renal - UTR. Esse trabalho poderá trazer benefícios ao tratamento como: ajuste da dose do medicamento, com redução dos efeitos colaterais, diminuição da rejeição, diminuição das infecções e internações.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

É garantido ao senhor (a) paciente o acesso, a qualquer momento, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. Também para o esclarecimento de qualquer dúvida. É livre a retirada de seu consentimento a qualquer momento da pesquisa, sem que isso prejudique a assistência ao paciente. Os nomes e demais dados pessoais dos participantes não serão revelados em nenhum momento da pesquisa. O HCFMUSP disponibiliza total assistência à saúde do paciente, lembrando que

os procedimentos realizados durante a pesquisa não trarão prejuízo ou desconforto nenhum.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:**

Dr. Alexandre Soriano Fortini - Setor de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo / DLC - HCFMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César
CEP: 05403-900 – São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 3069-6116

Dr^a. Atecla Nunciata Lopes Alves - Serviço de Toxicologia Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo / DLC - HCFMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César
CEP: 05403-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 3069-6116

Dr. Nairo Massakazu Sumita – Setor de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo / DLC – HCFMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César
CEP: 05403-900 – São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 3069-6116

Dr. Pedro Roberto Chocair – Unidade de Transplante Renal da Clínica Urológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / FMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César
CEP: 05403-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 3069-6029

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 3



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS					FR - 12841
Projeto de Pesquisa Desenvolvimento de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para monitorização terapêutica da azatioprina					
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Terap.				Grupo Grupo III	Nível
Área(s) Temática(s) Especial(s)					Fase Não se Aplica
Unitermos azatioprina, CLAE, monitorização terapêutica					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 120	Total Brasil 120	Nº de Sujeitos Total 120	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NAO	Wash-out NAO	Sem Tratamento Especifico NAO	Banco de Materiais Biológicos NAO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável NAIRO MASSAKAZU SUMITA			CPF 106.002.828-05	Identidade 12457965	
Área de Especialização PATOLOGIA CLÍNICA			Maior Titulação DOUTORADO	Nacionalidade BRASILEIRA	
Endereço R. LOPES DA COSTA 485			Bairro JAÇANÃ	Cidade SÃO PAULO - SP	
Código Postal 02279-060	Telefone 11-3069-6116 / 11-6216-7911		Fax 11-3069-7511	Email dlc.bioquimica@hcnet.usp.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.					
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.					
Data: 27 / 03 / 2007			Assinatura		
Instituição Onde Será Realizado					
Nome HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo		CNPJ 60.448.040/0001-22		Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Divisão de Laboratório Central/Serviço de Bioquímica Clínica		Participação Estrangeira NAO		Projeto Multicêntrico NAO	
Endereço Rua Dr. Ovídio Pires de Campos N. 225		Bairro Cerqueira Cesar		Cidade São Paulo - SP	
Código Postal 05403010	Telefone (11) 3069-6442		Fax (11) 3069-6442	Email cappesq@hcnet.usp.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.					
Nome: NAIRO MASSAKAZU SUMITA			Assinatura		
Data: 27 / 03 / 2007					

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 27/03/2007. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

⊙ Voltar

IMPRIMIR

ANEXO 4

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0298/07**, intitulado: "DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA AZATIOPRINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)", apresentado pela **ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita**

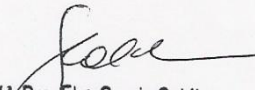
Pesquisador(a) Executante: **Maurílio Pacheco Neto**

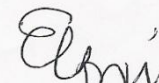
Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 28/05/07

CAPPesq, 09 de maio de 2007



PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa


Prof.ª Dra. Elia Garcia Caldini
Vice Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental


28/5/07

ANEXO 5

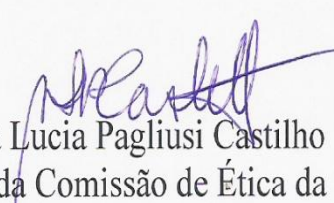
COMISSÃO DE ÉTICA

DIVISÃO DE LABORATÓRIO CENTRAL

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em reunião de **23-08-2007**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **004/07**, intitulado “ **Desenvolvimento de Metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**”, apresentado pelo(a) pesquisador(a) **Maurílio Pacheco Neto**

São Paulo, 23 de Agosto de 2007.


Dra. Vera Lucia Pagliusi Castilho
Coordenadora da Comissão de Ética da
Divisão de Laboratório Central