

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aline Corrêa Ribeiro

**Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica em CLAE-
UV para monitoramento terapêutico de metabólitos da azatioprina em
pacientes com doença de Crohn**

Juiz de Fora
2017

Aline Corrêa Ribeiro

Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica em CLAE-UV para monitoramento terapêutico de metabólitos da azatioprina em pacientes com doença de Crohn

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

**Juiz de Fora
2017**

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

Ribeiro, Aline Corrêa .

Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica em CLAE-UV para monitoramento terapêutico de metabólitos da azatioprina em pacientes com doença de Crohn / Aline Corrêa Ribeiro. – 2017.

108 f. : il.

Orientador: Jorge Willian Leandro Nascimento

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Doença de Crohn. 2. Azatioprina. 3. Tiopurina. 4. CLAE-UV. I. Nascimento, Jorge Willian Leandro, orient. II. Título.

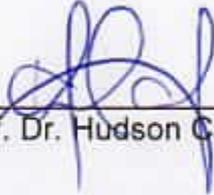
**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em CLAE-UV
para monitoramento terapêutico dos metabólitos da azatioprina em
pacientes com doença de Crohn**

**Nome do aluno
Aline Corrêa Ribeiro**

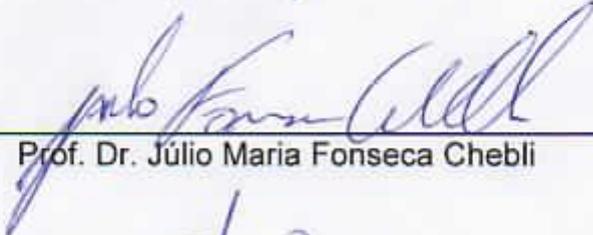
**Orientador (a):
Prof. Dr. Jorge Willian Leandro do Nascimento**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

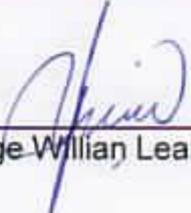
Aprovada em 29/08/2017



Prof. Dr. Hudson Caetano Polonini



Prof. Dr. Júlio Maria Fonseca Chebli



Prof. Dr. Jorge Willian Leandro do Nascimento

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento, os meus sinceros agradecimentos pela liderança, incentivo e pelo exemplo de perspicácia como cientista e professor. Agradeço a confiança passada nos momentos delicados e a paciência nos difíceis. Levarei comigo os seus exemplos de dedicação, ética e profissionalismo de um pesquisador e de um professor que tem por objetivo o desenvolvimento do aluno.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Júlio Maria Fonseca Chebli, obrigada por acreditar em meu potencial e pela ajuda prestada durante a orientação deste trabalho, principalmente na fase de qualificação da dissertação.

Ao Prof. Carlos Alberto Mourão Júnior pela preciosa colaboração nas análises estatísticas.

Ao Professor Hudson Caetano Polonini por ter aceito o convite para esta banca.

Ao Hospital Universitário HU CAS UFJF, diretor e funcionários, por toda credibilidade que foi dada às minhas ideias, por ter aberto as portas e abraçar este projeto como algo realmente nosso.

Ao Prof. Alexandre Freire Pinto, Ronaldo Rodrigues da Costa e Carmen Perches Gomide Pinto, por gentilmente em ceder o espaço de trabalho e os recursos para que eu conduzisse as atividades. Espero que as sementes deste trabalho retribuam a enorme gentileza.

Aos professores Alexandre Freire Pinto, Carla Malaguti, Marcelo Silva Silvério, Pâmela Souza Almeida Silva, que participaram da banca de qualificação, muito obrigada pela leitura dedicada e todas as observações valiosíssimas que aprimoraram o trabalho.

Ao meu esposo Giuliano, parceiro de alegrias, tristezas, raivas, amores e todos os afins, meu muito obrigado jamais será suficiente pelo que faz por mim e pelo nosso sucesso. Sem esquecer da Amora!!

À minha linda família, especial meus pais Zilene e Eduardo, obrigada por todo o amor, pelo apoio integral, palavras nunca irão expressar meu amor e carinho por tudo que me proporcionam.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos. À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento concedido para execução deste projeto de pesquisa.

Um obrigado especial ao Robert, por ter me prestado incrível auxílio e instrução em diversos momentos. Obrigada!

Aos amigos que fiz no mestrado: Débora, Patrícia, Poliana, Vinícius, pelos momentos de descontração no meio de tantos trabalhos.

Às colegas do Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE – ICB/UFJF), Dalyara, Franciely, Milany, Marcela e, principalmente, Luciana por dividirem conhecimentos e experiências.

Agradeço a Deus toda força e por me guiar pelos caminhos da vida, sempre me fazendo encontrar pessoas maravilhosas ao longo dessa trajetória.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da UFJF e ao Departamento de Farmacologia pela infraestrutura oferecida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, fica aqui registrada a minha gratidão.

RESUMO

Devido à importância que o sistema imune desempenha na doença de Crohn (DC), as tiopurinas são os imunomoduladores mais indicados na terapia. Entretanto, as tiopurinas, como a Azatioprina (AZA) e seus metabólitos intraeritrocitários, levam a uma série de reações adversas ou falha terapêutica, podendo ocasionar em não adesão ou abandono da terapia. A conversão da AZA para os nucleotídeos ativos de 6-tioguanina (6-TGN) é necessária para a eficácia clínica, entretanto, outro metabólito, a 6-metilmercaptipurina (6-MMP), é formado através de uma via concorrente pela tiopurina metil transferase e está relacionado à hepatotoxicidade. Devido à ampla variabilidade interindividual da tiopurina metil transferase e a uma faixa terapêutica estreita, torna-se importante a realização do monitoramento terapêutico do metabólito ativo 6-TGN e da 6-MMP. Neste trabalho, um método cromatográfico (CLAE/HPLC-UV) foi desenvolvido e validado para a quantificação dos metabólitos nos eritrócitos, envolvendo um procedimento de tratamento simples baseado na desproteinização por ácido perclórico seguido de hidrólise ácida e aquecimento para a conversão dos metabólitos em suas respectivas bases livres. A cromatografia foi realizada em coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu em mistura de solução tampão fosfato de potássio (0,02 mol/L, pH = 3), acetonitrila e metanol, eluição por gradiente, num fluxo de 1,0 mL/minuto, com detecção de UV em 291 nm e 342 nm. Os tempos de retenção foram de 6,2 min (6-TGN); 23,1 min (6-MMP) e 24,7 min (cafeína: padrão interno). A resposta do detector foi linear na concentração de 0,89-29,91 µmol/L ($r=0,999$) para 6-TGN e entre 0,90-30,08 µmol/L ($r=0,999$) para 6-MMP. Os limites de detecção foram de 0,29 µmol/L e 0,30 µmol/L e os limites de quantificação foram de 0,89 µmol/L e 0,90 µmol/L, para 6-TGN e 6-MMP respectivamente. As médias das recuperações de 87,9% para 6-TGN e 91,9% para 6-MMP. Os CV da repetibilidade, de 5,48 e 10,48% (intradia) e 9,23 e 10,48% (interdia), enquanto os EPR da reprodutibilidade de 11,36 e 9,85% (intradia) e 10,48 e 7,32% (interdia) para 6-TGN e 6-MMP, respectivamente. As concentrações de 6-TGN e 6-MMP foram determinadas para todos os pacientes do estudo e os resultados encontrados variaram de 4,51 a 1515,27 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos para a 6-TGN e de 169,98 a 53951,53 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos para a 6-MMP. Observou-se uma correlação entre os pacientes em terapia combinada AZA e alopurinol e a diminuição da dosagem de AZA, conseqüentemente a diminuição significativa dos níveis de 6-MMP (2030,71 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos) em comparação com o grupo de pacientes sob monoterapia (9098,43 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos). Um outro achado foi a diminuição estatisticamente significativa da transaminase TGO/AST

(25,03 ± 18,62 U/L) no grupo de pacientes que apresentavam a doença em atividade, com os níveis de 6-TGN a 540,51 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos e de 6-MMP a 7952,32 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos, semelhante a relatos anteriores da literatura. O método proposto de quantificação por CLAE-UV mostrou-se preciso, exato e reprodutível, podendo ser utilizado como uma importante ferramenta na rotina de monitorização terapêutica de pacientes com DC, permitindo a individualização da dose, o acompanhamento dos efeitos adversos relacionados com a terapia farmacológica, o monitoramento da adesão ao tratamento e a avaliação da evolução clínica do paciente.

Palavras-Chaves: Doença de Crohn. Azatioprina. Tiopurina. CLAE-UV.

ABSTRACT

The conversion of azathioprine (AZA) to active nucleotides of 6-thioguanine (6-TGN) is essential for clinical efficacy in Crohn's disease. However, other metabolite, 6-methylmercaptopurine (6-MMP), which is formed through a competitive pathway for thiopurine methyltransferase (TPMT), is related to hepatotoxicity of this drug. Due to the wide interindividual variability of TPMT and a narrow therapeutic range it is important to accomplish the therapeutic monitoring of active metabolite 6-TGN and 6-MMP, which is an unusual procedure in Brazil. In this study, a HPLC-UV method for simultaneous quantification of these metabolites was developed, validated and applied in 37 Crohn's disease patients. The chromatographic process was performed on C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m i.d.), mobile phase consisted of potassium phosphate buffer (0.02 mol/L, pH = 3), acetonitrile and methanol, flow rate at 1.0 ml/min and UV detection at 291 nm and 342 nm. Retention times were 6.2 min (6-TGN); 23.1 min (6-MMP) and 24.7 min (caffeine: internal standard). The detector response was linear at 0.89-29.91 μ mol/L ($r=0.999$) for 6-TGN and 0.90-30.08 μ mol/L ($r=0.999$) for 6-MMP. Limits of detection were 0.29 μ mol/L and 0.30 μ mol/L, while the quantification limits were 0.89 μ mol/L and 0.90 μ mol/L, for 6-TGN and 6-MMP respectively. Precision, accuracy and recovery, were according FDA and ANVISA guidelines. The concentrations of 6-TGN and 6-MMP were determined in patients' blood and the results found ranged from 4.51 to 1515 μ mol/ 8×10^8 erythrocytes for 6-TGN and from 169.98 to 53.951 μ mol/ 8×10^8 erythrocytes for 6-MMP. It was observed a reduction of levels of 6-MMP in patients using AZA + allopurinol therapy (2030.7 μ mol/ 8×10^8 erythrocytes) when compared with patients undergoing monotherapy (9098.43 μ mol/ 8×10^8 erythrocytes). Another finding was the correlation between the decrease in GOT transaminase in the group of patients who had the active disease with the increase in the 6-TGN levels, similar to previous reports in the literature. These results indicate that the method developed was reliable, accurate and reproducible, and can be used as an important tool in the routine monitoring of patients with Crohn's disease, allowing the individualization of the dose, the monitoring of the adverse effects related to the pharmacological therapy, monitoring the adherence to the treatment and the evaluation of the clinical evolution of these patients.

Key Words: Crohn's Disease. Azathioprine. Thiopurine. HPLC-UV.

LISTA DE ANEXOS, ILUSTRAÇÕES, QUADROS E TABELAS

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	103
Anexo A: Questionário clínico estruturado do índice harvey-bradshaw e parâmetros hematológicos, bioquímicos e metabólicos do paciente.....	107
Anexo B: Projeto de pesquisa registrado na plataforma brasil e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do hospital universitário - UFJF / MG (CEP HU-UFJF).....	108
Imagem 1: Localização do processo inflamatório na doença de Crohn e na colite ulcerativa	20
Imagem 2: Ilustração do acometimento intestinal nas DII's.....	20
Figura 1: Características típicas da DC (imagens endoscópicas).....	22
Figura 2: Vias metabólicas da AZA.....	28
Figura 3: Fórmula estrutural dos fármacos (caféina, AZA, 6-MP) e dos metabólitos intraeritrocitários (6-MMP e 6-TG).....	56
Figura 4: Cromatogramas das substâncias avaliadas para a escolha do padrão interno...	57
Figura 5: Condição final determinada para a identificação e quantificação da 6-TGN e 6-MMP em papas de hemácias.....	58
Figura 6: Cromatogramas do 6-TGN em solução, da matriz de papa de hemácias (branco) e da amostra de paciente tratado com AZA.....	59
Figura 7: Cromatogramas da 6-MMP em solução, da matriz de papa de hemácias (branco) e da amostra de paciente tratado com AZA.....	60
Figura 8: Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de correlação linear (r) obtidos para os metabólitos intraeritrocitários da AZA.....	62
Figura 9: Avaliação do Efeito Residual.....	63
Figura 10: Cromatogramas de papas de hemácias com metabólitos e PI.....	73
Figura 11: Avaliação dos pacientes quanto à atividade ou remissão da doença, relacionada à concentração do metabólito 6-TGN.....	77
Figura 12: Avaliação da contagem de linfócitos e da concentração de 6-TGN nos pacientes com doença em atividade.....	78
Figura 13: Avaliação da contagem de transaminases e da concentração de 6-TGN nos	79

pacientes com doença em atividade.....	
Figura 14: Avaliação os pacientes quanto à monoterapia ou terapia combinada com alopurinol.....	82
Fluxograma 1: Casuística.....	37
Fluxograma 2: Coleta de amostras sanguíneas.....	39
Fluxograma 3: Preparo das amostras e quantificação dos metabólitos intraeritrocitários.	47
Quadro 1: Tratamento convencional da DC e respectivas ações dos medicamentos.....	26
Quadro 2: Métodos de CLAE descritos na literatura para análise dos metabólitos da AZA.....	45
Quadro 3: Condições cromatográficas avaliadas para a identificação e quantificação da 6-TGN e 6-MMP.....	55
Quadro 4: Características dos pacientes com DC que participaram do estudo.....	70
Quadro 5: Dosagens bioquímicas, hematológicas e dos metabolitos da AZA dos pacientes.....	75
Quadro 6: Valores dos metabólitos relacionados à atividade ou remissão da DC.....	77
Quadro 7: Valores dos metabólitos relacionados à atividade da DC.....	80
Tabela 1: Condição da eluição por gradiente.....	46
Tabela 2: Precisão e Exatidão Intradia e Interdia para 6-TGN.....	64
Tabela 3: Precisão e Exatidão Intradia e Interdia para 6-MMP.....	64
Tabela 4: Recuperação dos metabólitos da papa de hemácias.....	65
Tabela 5: Estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento.....	66
Tabela 6: Estabilidade pós-processamento (na bandeja do injetor).....	66
Tabela 7: Estabilidade de Curto Prazo.....	67
Tabela 8: Resultados obtidos na validação.....	68
Tabela 9: Valores bioquímicos e dos metabólitos relacionado à atividade da DC.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-MeTIMP	6-metiltioinosina monofosfato
6-MMP	6-metil-mercaptopurina
6-MP	6-mercaptopurina
6p22.3	locus 22.3 do cromossomo 6
6-TGDP	6-tioguanina difosfato
6-TGMP	6-tioguanina monofosfato
6-TGN	nucleotídeos 6-Tioguanina
6-TGTP	6-tioguanina trifosfato
6-TIMP	6-tioinosina monofosfato
6-TU	ácido 6-tioúico
6-TXMP	6-tioxantosina monofosfato
ACN	acetonitrila
ALT	alanina aminotransferase
anti-TNF α	anti-fator de necrose tumoral alfa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	transaminases aspartato aminotransferase
ATP	5-trifosfato-adenosina
AZA	azatioprina
Bcl-xl	gene antiapoptótico
C18	coluna analítica com cadeia alifática de 18 carbonos
CAAE	certificado de apresentação para apreciação ética
CARD15	<i>caspase recruitment domain-containing protein 15</i>
CD28	<i>(Cluster of Differentiation 28)</i> co-estimulatória de Linfócitos T
CDAI	Índice de Atividade da Doença de Crohn
CEP HU	Comitê de Ética em Pesquisa do Laboratório Universidade (UFJF)
CLAE-UV	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CQA	amostras de controle de qualidade - concentração alta
CQB	amostras de controle de qualidade - concentração baixa
CQM	amostras de controle de qualidade - concentração média
CU	colite ulcerativa

CV	coeficiente de variação
DC	doença de Crohn
DII	doença inflamatória intestinal
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvios padrão
DTT	reagente de ditioneitol
EDTA	anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	desvio padrão relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	fase estacionária
FM	fase móvel
GMPS	guanidina 5-monofosfato sintetase
GSH	glutathiona reduzida
GST	glutathiona S transferases
H ₃ PO ₄	solução de ácido orto-fosfórico
HGPRT	enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase
HPLC-UV	<i>high-performance liquid chromatography with UV detection</i>
HPRT	enzima hipoxantina-fosforibosil transferase
HU/CAS-UFJF	Hospital Universitário/Centro de Atenção à Saúde Unidade Dom Bosco
i.d	diâmetro interno (coluna LC18)
IMPDH	inosina-5-monofosfato desidrogenase
<i>insert</i>	recipiente de vidro, microvolume, utilizado no interior do <i>vial</i> , (200µL) para a quantificação de amostras por CLAE
IS	imunossupressores
KH ₂ PO ₄	solução de fosfato de potássio monobásico
LaFaCE-ICB/UFJF	Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Juiz de Fora
LD	limite de detecção
LIQ	limite inferior de quantificação
LSQ	limite superior de quantificação
M	molaridade
mg	miligramas
mg/kg/dia	miligramas por quilogramas por dia

mg/L	miligramas por litro
MeOH	metanol
mtDNA	DNA mitocondrial
MTF/TDM	(<i>therapeutic drug monitoring</i>) monitorização terapêutica de fármacos
N	normalidade
n	número amostral
NaCl	solução salina / cloreto de sódio
NaOH	solução hidróxido de sódio
NF-κB	fator nuclear kappa B
nm	nanômetro
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing</i>
ODS	octadecilsilano, coluna analítica com 18 carbonos
PCR	proteína C-reativa
pH	potencial Hidrogeniônico
PI	padrão interno
pmol	picomol
q.s.p.	quantidade suficiente para
r	coeficiente de correlação
Rac1	gene codificador da proteína guanosina trifosfato
RBC	(<i>Red Blood Cell</i>), eritrócitos ou hemácias
RDC	resolução da diretoria colegiada
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
SAS/MS	Secretaria Nacional de Assistência à Saúde do Ministério da Saúde
<i>spp</i>	sub-espécie bacteriana
SPSS	software estatístico <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> TM
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
p	nível de significância
Teste t de Student	teste estatístico
TGO	(transaminase glutâmico oxalacético), atualmente AST
TGP	(transaminase glutâmico pirúvica), atualmente ALT
T°C Ambiente	temperatura ambiente (em grau Celsius)

TPMT	enzima tiopurina metil-transferase
TPMT*2,*3A,*3C	polimorfismo de alelos selvagens / polimórficos da enzima
v/v	volume / volume
<i>vial</i>	recipiente de vidro de microvolume (250µL) para amostras quantificadas pela CLAE
XO	enzima xantina oxidase
µg/mL	microgramas por mililitros
µL	microlitros
µm	micrômetro
µmol/L	micromolar por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. DOENÇA DE CROHN	19
2.2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	25
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. EQUIPAMENTOS	34
4.2. SOLVENTES E PADRÕES DE REFERÊNCIA	34
4.3. PACIENTES	35
4.4. APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E ANAMNESE DO PACIENTE	36
4.5. OBTENÇÃO DA AMOSTRA SANGUÍNEA	37
4.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS	38
4.7. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA AZATIOPRINA	39
4.7.1. PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS SOLUÇÕES	40
4.7.1.1. SOLUÇÃO PADRÃO DE 6-TGN 200 MG/M _L	40
4.7.1.2. SOLUÇÃO PADRÃO DE 6-MMP 200 MG/M _L	40
4.7.1.3. SOLUÇÃO DE CAFEÍNA 100 MG/M _L (PADRÃO INTERNO)	40
4.7.1.4. SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA DE 4 MG/M _L (PADRÃO INTERNO)	40
4.7.1.5. SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 0,1 M	41
4.7.1.6. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 0,1 M	41
4.7.1.7. SOLUÇÃO DE DITIOREITOL (DTT 3,0 MG/M _L)	41
4.7.1.8. SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO 0,9%	41
4.7.1.9. SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO 1,0 M (KH ₂ PO ₄)	41
4.7.1.10. SOLUÇÃO DE ÁCIDO ORTO-FOSFÓRICO 0,1 M (H ₃ PO ₄)	41
4.7.1.11. TAMPÃO FOSFATO 0,02 M PH \cong 3	42
4.7.2. COLETA E PREPARO DAS PAPAS DE HEMÁCIAS (MATRIZ/BRANCO)	42
4.7.3. CONTROLE DE QUALIDADE	42
4.7.4. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES	43
4.7.5. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS (MATRIZ/BRANCO E DOS PACIENTES)	43
4.7.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E MÉTODOS APLICADOS À SEPARAÇÃO DOS METABÓLITOS 6-TGN E 6-MMP	44
4.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE CLAE-UV	48
4.8.1. PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	48
4.8.1.1. SELETIVIDADE	48
4.8.1.2. SENSIBILIDADE: LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ) E LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	49
4.8.1.3. LINEARIDADE	49
4.8.1.4. CURVA DE CALIBRAÇÃO	50
4.8.1.5. EFEITO RESIDUAL (CARRYOVER)	50
4.8.1.6. PRECISÃO	50

4.8.1.7.	EXATIDÃO-----	51
4.8.1.8.	RECUPERAÇÃO-----	51
4.8.1.9.	ESTABILIDADE DA AMOSTRA -----	52
4.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	52
5.	RESULTADOS	54
5.1.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO	54
5.1.1.	SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO -----	56
5.1.2.	SELEÇÃO DA CONDIÇÃO CROMATOGRÁFICA -----	58
5.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO-----	59
5.2.1.	SELETIVIDADE -----	59
5.2.2.	SENSIBILIDADE: LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	61
5.2.3.	LINEARIDADE -----	61
5.2.4.	EFEITO RESIDUAL (<i>CARRYOVER</i>) -----	62
5.2.5.	PRECISÃO E EXATIDÃO -----	63
5.2.6.	RECUPERAÇÃO DOS METABÓLITOS DA PAPA DE HEMÁCIAS -----	65
5.2.7.	ESTABILIDADE -----	65
5.3.	PACIENTES E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS -----	69
5.3.1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES -----	69
5.3.2.	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUANTO AO USO DAS TIOPURINAS -----	72
5.3.3.	ANÁLISES DE AMOSTRAS DE PACIENTES -----	72
6.	DISCUSSÃO	81
7.	CONCLUSÃO.....	93
8.	REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) crônica incurável de etiologia desconhecida, que pode afetar qualquer segmento do tubo digestivo, associada a manifestações extraintestinais e outras alterações imunológicas (CROHN et al., 2000; CHEBLI et al., 2007). Sua apresentação clínica depende da localização da doença e inclui diarreia, dor abdominal, perda de peso, febre, mucorreia ou sangramento gastrointestinal, fissuras ou fístulas perianais, dentre outras (BECHARA et al., 2015a).

O comportamento da doença caracteriza-se por períodos de exacerbação alternados com períodos de remissão. A apresentação típica é o envolvimento descontínuo de segmentos do sistema gastrointestinal, podendo levar ao desenvolvimento de complicações, como estenoses, abscessos e fístulas (DHARMASIRI et al., 2014; BECHARA et al., 2015a; 2015b).

A causa da DC, assim como da colite ulcerativa (CU), ambas classificadas como DII, provavelmente envolve respostas do sistema imunológico desregulado à microbiota bacteriana intestinal em indivíduos predispostos geneticamente (VIDIGAL et al., 2014). Devido à importância que o sistema imune desempenha nas DII, a terapêutica se baseia na modulação imune.

Os fármacos tiopurinas, 6-mercaptopurina (6-MP) e o seu pró-fármaco azatioprina (AZA), continuam sendo os imunomoduladores mais indicados na terapia em conjunto com uso de glicocorticoides, visto que estudos afirmam que essa terapêutica mantém a remissão clínica por alguns anos em pacientes com DII (BRADFORD E SHIH, 2011; DE SOUZA et al., 2013).

Entretanto, apesar das tiopurinas serem a primeira linha de escolha no tratamento da DC, elas possuem uma série de reações adversas ou apresentam falha terapêutica em cerca de 30 a 40% dos pacientes (PREFONTAINE et al., 2009; BLAKER et al., 2014; CHEBLI et al., 2015). Alternativamente, estudos recentes fornecem evidências de que os pacientes podem se beneficiar da adição do medicamento alopurinol à terapêutica, promovendo redução na dose de tiopurinas e diminuição do uso de corticosteroides, melhorando de forma geral, a qualidade de vida destes pacientes (PACHECO NETO, 2010; CURKOVIC et al., 2013).

É importante ressaltar que as falhas terapêuticas ao tratamento convencional da DC implicam em sofrimento ao paciente, avanço da morbidade, além de elevado custo

para os sistemas de saúde, uma vez que o tratamento de resgate da doença é geralmente realizado com anticorpos monoclonais anti-TNF α , como o infliximabe ou adalimumabe, os quais possuem custo dezenas de vezes mais elevado do que a combinação de AZA com alopurinol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; NO SUS–CONITEC, 2014).

A monitorização terapêutica das tiopurinas permitiria a individualização da dose do medicamento, ao contrário da dose padronizada em miligramas do fármaco por massa corporal do paciente (mg/kg). Além disso, possibilitaria a adequação dos níveis dos metabólitos ativos da AZA, os nucleotídeos 6-tioguanina (6-TGN), à faixa terapêutica e à manutenção das concentrações destes metabólitos em níveis adequados, reduzindo a prevalência de reações adversas e toxicidade (PACHECO NETO, 2010). Outro benefício da monitorização terapêutica seria a identificação de pacientes que não aderem ao tratamento, já que esta é uma causa conhecida de recorrência da doença na evolução das DII.

Entretanto, no Brasil, a monitorização terapêutica de fármacos, ainda é pouco utilizada devido à falta de laboratórios devidamente equipados, de profissionais qualificados ou, ainda, desconhecimento desta ferramenta. No caso da monitorização das tiopurinas, ainda há a dificuldade de não existirem conjuntos diagnósticos disponíveis comercialmente para quantificação destes metabólitos.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método cromatográfico para determinação das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e 6-MMP em pacientes sob terapia com AZA, de forma a contribuir para que a terapêutica farmacológica seja realizada de forma otimizada e racional, visando o máximo de eficácia com o mínimo de efeitos adversos. Além disso, poderia possibilitar ao corpo clínico, a individualização das doses de AZA, aumentando o sucesso da terapia medicamentosa e reduzindo a substituição destes medicamentos por outros de custos mais elevados, como os anticorpos monoclonais anti-TNF α , proporcionando um impacto positivo na farmacoterapia e na qualidade de vida destes e de outros pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DOENÇA DE CROHN

A Doença de Crohn (DC) é descrita como uma doença inflamatória intestinal (DII), caracterizada como uma inflamação crônica da mucosa, podendo ser limitada à zona intestinal (a região do intestino delgado e grosso) ou abranger outros órgãos subjacentes. É uma doença bastante característica, por apresentar um acometimento da mucosa de forma segmentar, com áreas entrepostas, ou seja, caracterizada por possuir segmentos saudáveis que separam os segmentos inflamados (PAPACOSTA et al.,2017).

A DC é uma doença multifatorial, onde estudos recentes demonstram que sua prevalência e incidência variam de acordo com o meio ambiente, hábitos de vida, fatores genéticos e a própria microbiota intestinal, que predisõem ao surgimento de um possível agente entérico infeccioso (PAPACOSTA et al.,2017).

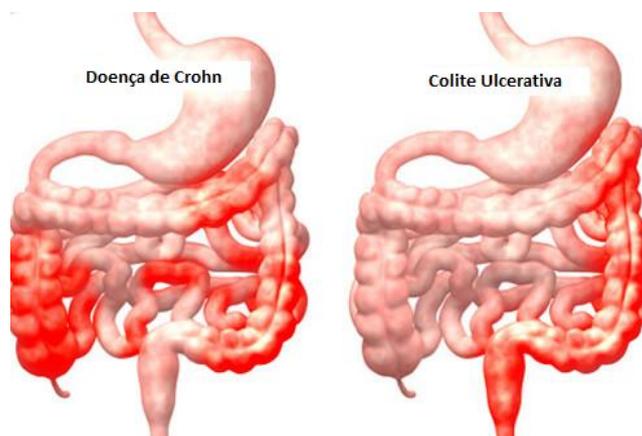
Apesar de semelhanças com a colite ulcerativa (CU), o diagnóstico diferencial reconhecendo a DC como uma enfermidade diferente foi relatado primeiramente em 1932, com a publicação de Crohn no artigo “Regional Ileitis: A Pathologic and Clinical Entity” (CROHN et al., 2000). Porém, como a DC foi inicialmente chamada de "ileite regional" ou "enterite regional", alguns casos foram relatados como sendo CU, e atualmente, sabe-se que eram relatos de DC (CROHN et al., 2000; MULDER et al., 2014)

A diferenciação de ambas, por muitas vezes, é um desafio para os profissionais de saúde, uma vez que apresentam quadro clínico semelhante, sendo comum apresentarem dores abdominais, diarreia, com sério risco de sangramento importante, astenia, emagrecimento, febre, anemia e déficit nutricional (MULDER et al., 2014; PAPACOSTA et al.,2017).

Hoje, a CU (Imagens 1 e 2) é considerada uma doença inflamatória do intestino grosso e reto, e caracteriza-se por inflamação e ulceração contínua da camada mais superficial do cólon. Já a DC (Imagens 1 e 2), é definida como uma DII progressiva transmural, que pode afetar qualquer segmento do sistema gastrointestinal, incluindo o intestino delgado e intestino grosso (cólon), tipicamente envolvendo toda a espessura da parede intestinal, podendo haver áreas de intestino normal entre as áreas doentes, chamadas áreas “poupadas”. A inflamação persistente pode evoluir para as formas

complicadas, levando à formação de estenose e ou de fístulas, que eventualmente, podem exigir tratamento cirúrgico (CHOUNG et al., 2016).

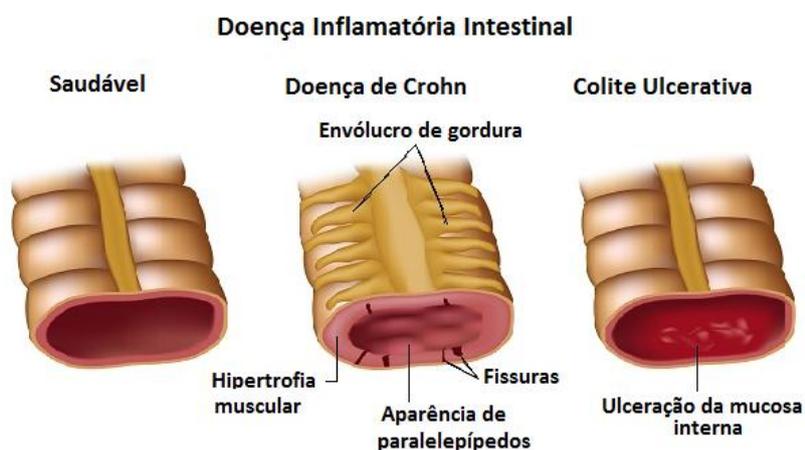
Imagem 1 – Localização do processo inflamatório na DC e na CU



Nota: DC é uma DII progressiva, que pode afetar qualquer segmento do sistema gastrointestinal, incluindo o intestino delgado e intestino grosso (cólon) e toda a espessura da parede intestinal, podendo haver áreas de intestino normal (poupadas) entre as áreas doentes. A colite ulcerativa (CU) é considerada uma doença inflamatória do cólon e reto, e caracteriza-se por inflamação e ulceração da camada mais superficial, sem nenhuma área normal, não lesionada, de intestino.

Fonte: <http://news4medico.com/tag/extraintestinal-manifestations-of-inflammatory-bowel-disease/>

Imagem 2 – Ilustração do acometimento intestinal nas DII's



Nota: A DC apresenta um processo inflamatório em todas as camadas do intestino, com dor na região abdominal devido aos movimentos peristálticos, podendo aparecer problemas perianais como fístulas, feridas anais e marcas na pele. Na colite ulcerativa, a inflamação está localizada na camada mais interna da parede intestinal, com dor intermitente, podendo ocorrer sangramento retal.

Fonte: <http://herintalk.com/crohns-disease-types-causes-symptoms-and-treatment/>

Estudos relatam que uma das causas da DC é a resposta imunológica desregulada para a microbiota intestinal em indivíduos geneticamente suscetíveis, podendo causar o desequilíbrio entre os antígenos luminais e a resposta imune da mucosa intestinal e assim, ampliar e perpetuar a reação de inflamação (CHOUNG et al., 2016; PAPACOSTA et al., 2017). Embora a etiologia ainda não seja bem compreendida, várias teorias têm sido propostas ao longo dos anos (GELLER E DE CAMPOS, 2015).

A subespécie *Mycobacterium avium paratuberculosis* spp (SHEPHERD, 2012) tem sido estudada como tendo uma possível relação com a patologia da DC, reforçada pela grande semelhança entre a DC e doença de Johne (doença infectocontagiosa, caracterizada por processo inflamatório granulomatoso no intestino dos ruminantes). Esta associação tem sido apoiada por muitos estudos, mas não foi comprovada com identificação da micobactéria em amostras de tecido ou em cultura de organismo (SIMMONS e JEWELL, 2001; GELLER E DE CAMPOS, 2015).

Outra teoria sugere que há uma resposta anormal à elevada carga bacteriana no lúmen gastrointestinal, resultando em uma resposta inflamatória exagerada, como exemplo o aumento da presença de *Escherichia coli* aderente-invasiva. Uma terceira hipótese sustentada é a de que estas alterações genéticas são responsáveis por uma resposta inflamatória diminuída e, por conseguinte, o acúmulo de estímulos no lúmen intestinal que ativam o sistema imune adaptativo (HEAD e JURENKA, 2004; SHEPHERD, 2012; GELLER E DE CAMPOS, 2015).

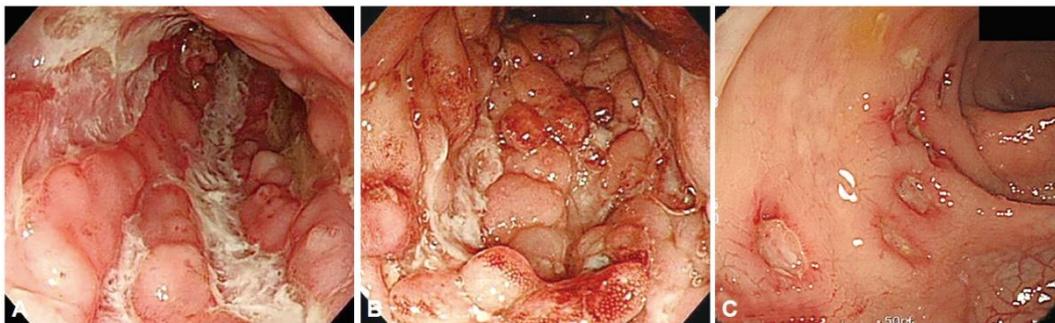
O surgimento e o agravamento da doença estão relacionados com a integridade da mucosa. Alguns pacientes podem ter o aumento da permeabilidade intestinal, mesmo estando em remissão, devido a uma anormalidade na camada epitelial ou na restituição epitelial após dano (SIMMONS e JEWELL, 2001).

Não há fatores dietéticos específicos relacionados ao desenvolvimento da doença, embora uma dieta com baixo consumo de leite parece aliviar os sintomas em alguns pacientes, e uma alta ingestão de açúcar, de proteína animal e uma baixa ingestão de fibra vegetal tenham sido associados a um aumento da incidência de DC em comparação com indivíduos saudáveis (SHEPHERD, 2012; URANGA et al., 2016).

O diagnóstico da DC geralmente é realizado com estudos de imagem, endoscopia, marcadores sorológicos e avaliação dos marcadores de atividade inflamatória (Figura 1). A colonoscopia é usada para estabelecer o diagnóstico, são observadas ulcerações entre áreas de aparência normal (poupadas) e alterações nas

mucosas intestinais. Raramente, pode-se desenvolver carcinoma após muitos anos de doença ativa (GELLER E DE CAMPOS, 2015; CHOUNG et al., 2016).

Figura 1 - Características típicas da DC (imagens endoscópicas).



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

Fonte: LEE e LEE, 2016.

A DC pode afetar as pessoas no início da infância até idade adulta, mas os indivíduos mais jovens, incluindo adolescentes e adultos na faixa dos 15 a 40 anos, são os mais afetados. No entanto, qualquer faixa etária pode ser acometida, desde crianças a idosos. A doença é ligeiramente mais comum em mulheres e representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas a problemas gastrointestinais em adultos jovens no Ocidente (SIMMONS e JEWELL, 2001).

É notória a diminuição na qualidade de vida nestes pacientes, por sua significativa morbidade. Esta doença apresenta, ainda, um impacto econômico significativo devido à maioria dos pacientes serem afetados em seus anos produtivos (SIMMONS e JEWELL, 2001; GELLER E DE CAMPOS, 2015).

A DC é menos comum do que a CU, com incidência anual de 2 a 5 diagnósticos por 100.000 habitantes, e uma prevalência de 35 a 50 por 100.000 em comunidades de origem do norte da Europa.

Nas últimas décadas, percebeu-se uma tendência de aumento no número de casos de DC em alguns países, como os da América Latina. Esta tendência ao aumento do número de casos pode ser atribuída ao aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos ou a um real crescimento da população doente. A incidência é de 7 para 100.000 pessoas/ano nos Estados Unidos e uma prevalência de 35 a 50 por 100.000 em comunidades do norte da Europa. No Brasil, não há dados oficiais, mas é possível que a

doença esteja sendo mais frequentemente diagnosticada nos serviços de saúde (SIMMONS e JEWELL, 2001; PAPACOSTA et al., 2017).

Os fatores ambientais, como mudanças no estilo de vida também podem impactar no desenvolvimento da doença. Vários estudos demonstraram que houve grande aumento mundial na incidência ao longo da segunda metade do século XX, o que também ocorreu no Brasil (GABURRI et al., 1998; SHIVANANDA et al., 1996; COLLI et al., 2008). A maior taxa tem sido relatada no Canadá (248/100.000 habitantes), enquanto na Ásia, a taxa é de menos de 6,3/100.000 habitantes (GELLER E DE CAMPOS, 2015).

A hereditariedade de DII tem sido relacionada a polimorfismos em vários genes, contribuindo de forma aditiva ao risco global de doença. O primeiro gene associado com a DC foi observado na proteína chamada CARD15 (caspase recruitment domain-containing protein 15), anteriormente conhecido como NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing*), onde 58 mutações no gene têm sido associadas a várias doenças, sendo que 80% dessas mutações estão ligadas especificamente com a DC (SIMMONS e JEWELL, 2001; UTHOFF et al., 2002; SHEPHERD, 2012; MOHANA e GRIMES, 2014).

As mutações na proteína CARD15/NOD2, no caso de DC, mostram uma redução na sinalização da via NF- κ B, o que leva a uma urgência de compreender o mecanismo de sinalização da CARD15/NOD2 na resposta imune inata, isto é, descobrir por que a mutação em CARD15/NOD2 resulta em um aumento na inflamação. Pesquisadores acreditam que com o conhecimento adequado da sinalização de tal via, seja possível desenvolver melhores tratamentos para a DC (MOHANA e GRIMES, 2014).

Em relação aos sintomas, a doença é caracterizada pelo desconforto abdominal, dor e alterações no hábito intestinal, além de impactos psicológicos e sociais significativos na qualidade de vida do paciente. Habitualmente causa diarreia, cólica abdominal, frequentemente febre e, às vezes, sangramento retal. Também pode ocorrer perda de apetite e subsequente perda de peso. Os sintomas podem variar de leve a grave, mas em geral, as pessoas com DC podem ter vidas ativas e produtivas (GELLER E DE CAMPOS, 2015).

A avaliação do grau e atividade da doença nos indivíduos com DC é realizada através do Índice de Atividade da DC (*Crohns Disease Activity Index - CDAI*), desenvolvido na década de 1970 e que tem sido amplamente utilizado na avaliação

clínica da doença. O Índice de Harvey-Bradshaw é uma simplificação do CDAI, projetado para fazer a coleta de dados e computação mais fácil (BEST, 2006). Tal avaliação é desejável para que se possa correlacionar a doença com possíveis desfechos clínicos e com o prognóstico, selecionando a melhor estratégia terapêutica e o seguimento mais adequado para cada paciente (BECHARA et al., 2015a).

As manifestações clínicas são variadas devido ao comprometimento do sistema gastrointestinal, manifestações extraintestinais e gravidade. A maioria dos pacientes, cerca de 45%, apresenta o envolvimento do intestino delgado, predominantemente no íleo, enquanto que 20% a 25% têm a doença confinada ao cólon (PARIENTE E LAHARIE, 2014). Em cerca de 30% dos casos, está associada a granulomas não necrosante epitelióides. Alguns pacientes têm a doença perianal e raramente, podem ter clínica isolada na região oral, esofágica ou gastroduodenal. Muito frequentemente, os sintomas estão presentes em dois ou três anos antes do diagnóstico ser estabelecido (SIMMONS e JEWELL, 2001; GELLER E DE CAMPOS, 2015; PIZZI et al., 2015).

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

Em relação às manifestações extraintestinais, estas são comuns em até 30% dos doentes. A causa não é conhecida; há hipóteses de que possam estar relacionadas com os efeitos periféricos da ativação imunitária no intestino. Tem sido sugerido que podem ser causadas por complexos imunes circulantes ou por um auto-antígeno que é comum no intestino e em outros locais extraintestinais (SIMMONS e JEWELL, 2001; KARMIRIS, et al., 2016).

Dados epidemiológicos têm demonstrado que os sintomas da DC podem ocorrer em até 31% dos pacientes após episódios de gastroenterite infecciosa, observado pelo aumento do número de células imunocompetentes ativadas, em particular de mastócitos, nas mucosas do intestino dos pacientes com DC (GELLER E DE CAMPOS, 2015; BURISCH e MUNKHOLM, 2015).

A manifestação cutânea comum é o eritema nodoso, que apresenta nódulos vermelhos dolorosos na pele, coxa ou braço. Uma manifestação clínica mais grave é o pioderma gangrenoso, que começa como uma erupção pustulosa e, posteriormente, se torna ulcerosa (CARD, LANGAN e CHU, 2016).

Também pode ocorrer comprometimento da região ocular, onde cerca de 3% a 14% dos pacientes apresentam inflamações como uveíte anterior, episclerite e conjuntivite. No caso da presença de uveíte, esta pode estar presente na fase ativa da doença como muitas vezes pode permanecer após o procedimento cirúrgico da retirada das áreas afetadas do intestino (MARINEATA et al., 2014; CARD, LANGAN e CHU, 2016).

A doença hepática está presente em cerca de 5% dos pacientes e é causada principalmente por colangite esclerosante, caracterizada por um processo inflamatório e por fibrose do sistema biliar, ocasionando alterações dos ductos. Isso possibilita a ocorrência de cirrose e disfunção hepática crônica, associado a um risco aumentado de malignidade biliar (SIMMONS e JEWELL, 2001; KARMIRIS et al., 2016).

Surgiram também estudos sobre a possibilidade de a inflamação crônica ocasionar disfunções neuromusculares persistentes nos pacientes, assim como um possível aumento dos níveis de fadiga relacionada aos sintomas psicológicos e gastrointestinais, que afetam diretamente na qualidade de vida (PICHE et al., 2010).

2.2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

A terapia farmacológica possibilita desde o controle dos sintomas à promoção da remissão "profunda" da doença com a cicatrização da mucosa, podendo ser alcançada em maiores taxas quando os pacientes obtêm o diagnóstico precoce, ou quando não têm doença transmural irreversível (presença de estenose ou fístula) ou ainda quando não apresentam a necessidade de tratamento cirúrgico (PARIENTE E LAHARIE, 2014). Muitas vezes, a obtenção de remissão é demorada, afetando o curso natural da doença, a qual passa a necessitar de terapia com imunossuppressores (IS) ou terapias biológicas mais recentes, tais como anticorpos anti-TNF (Quadro 1). Ambas as classes de fármacos estão associados com efeitos colaterais e a última ainda apresenta um alto custo (PARIENTE E LAHARIE, 2014).

Dentre os imunomoduladores, destacam-se os análogos da purina, a 6-mercaptopurina (6-MP) e seu pró-fármaco precursor, a azatioprina (AZA). As principais indicações para o tratamento com estas drogas incluem a dependência ou refratariedade aos esteroides, o tratamento da doença fistulizante e, possivelmente, a prevenção de recorrência pós-operatória. Ambos podem ser utilizados nestes casos com a escolha

geralmente baseada na experiência prévia do clínico (COLLI et al., 2008; SOUSA et al., 2014).

No tratamento a longo prazo da doença, estes imunomoduladores são os fármacos mais utilizados. Foram descobertos e introduzidos no mercado em 1950, originalmente destinados para tratamentos quimioterapêuticos, em 1960 começaram a ser utilizados em tratamentos de doenças autoimunes e em 1980 em pacientes com DC para a prevenção de recorrências clínicas (ITAGAKI et al., 2012). Em razão do seu efeito anti-inflamatório, também têm sido utilizados em pacientes com doenças autoimunes, como lúpus, vasculites, alterações dermatológicas e artrite reumatóide. Outra utilização muito frequente da AZA tem ocorrido em numerosas doenças imunomediadas para a prevenção da rejeição de órgãos pós-transplante (COLLI et al., 2008; SOUSA et al., 2014; BROEKMAN et al, 2017).

Quadro 1 – Tratamento convencional da DC e respectivas ações dos medicamentos.

Classe de fármacos	Ações dos medicamentos na doença
Aminossalicilatos	Ação anti-inflamatória
Corticosteroides	Ação anti-inflamatória e imunossupressora
Agentes Imunomoduladores / imunossupressores	Supressão da resposta imune na DC
Anticorpos monoclonais TNF- α	Neutralização do TNF- α e apoptose
Antibióticos	Provocam dano celular na parede de patógenos e redução da carga bacteriana

Fonte: Adaptado de HEAD e JURENKA, 2004.

Apesar da eficácia comprovada da AZA/6-MP no tratamento da CD e CU, infelizmente, o uso das tiopurinas é, frequentemente, acompanhado de efeitos adversos como hepatotoxicidade, queixas gastrointestinais, sintomas gripais ou até mesmo leucopenia, muitas vezes levando o paciente a descontinuar o tratamento (BROEKMAN et al, 2017).

Normalmente, são administradas doses orais de 2 ou 2,5 mg/kg/dia na forma de comprimidos de 50 mg, com doses iniciais de AZA entre 50 e 200 mg diárias (PACHECO NETO et. al.; 2008).

O pró-fármaco AZA administrada por via oral apresenta boa absorção gastrointestinal, porém não é detectável na forma intacta no plasma devido ao extenso metabolismo de primeira passagem (meia-vida plasmática de 10 minutos). Já o fármaco

ativo, 6-MP, possui uma biodisponibilidade oral entre 47,4 a 60%, com concentrações sanguíneas máximas atingidas dentro de 1 a 2 horas após administração. Tanto a AZA quanto a 6-MP ligam-se moderadamente às proteínas plasmáticas (30%) e são rapidamente removidos do sangue no fígado ou pelos eritrócitos, com meia-vida dos nucleotídeos intraeritrocitários entre 3 e 13 dias (BRUNTON, GOODMAN e GILMAN, 2012; UNIVERSITY OF MINNESOTA, [2016]).

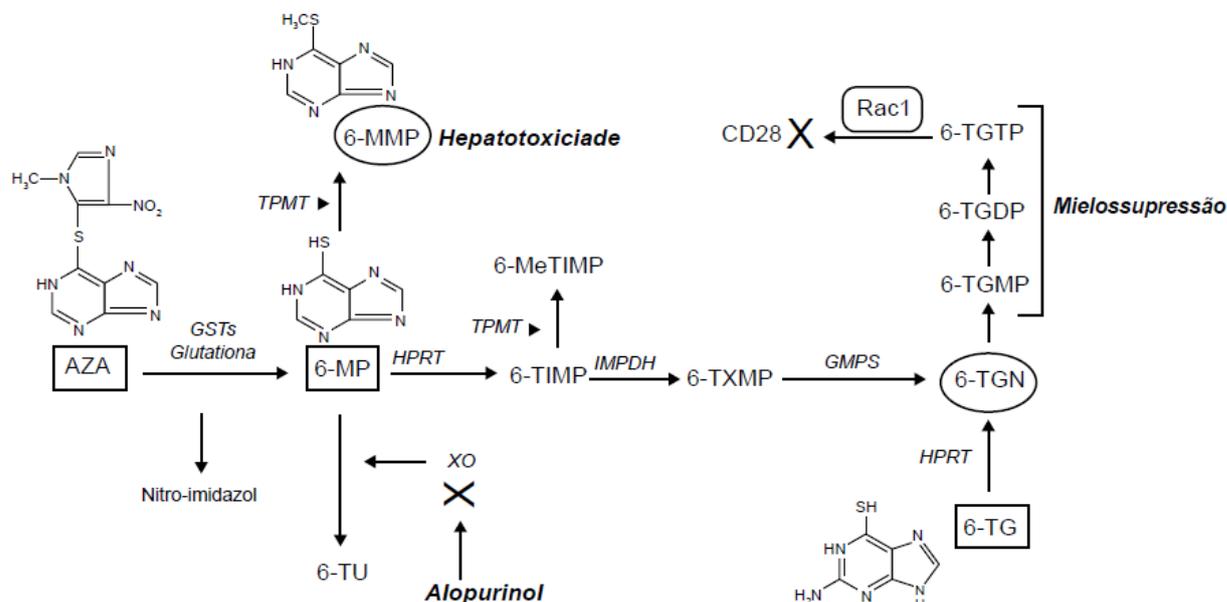
Com ampla distribuição por todos os líquidos corporais, cerca de 88% da AZA são convertidos rapidamente em 6-MP e metil-nitroimidazol pela ação da glutathione redutase (GSH), um sistema hepático enzimático catalisado pelas enzimas glutathione S transferases (GST) (CUFFARI, 2014; ZOCHOWSKA et al., 2016).

A captação celular da 6-MP é um processo rápido e o seu metabolismo intracelular ocorre ao longo das três vias enzimáticas concorrentes catalisadas pela hipoxantina e tiopurina S-metil-transferase, formando os metabólitos intraeritrocitários tioanálogos da purina (Figura 2). A taxa de conversão varia de um indivíduo para outro e o processo de eliminação das tiopurinas ocorre principalmente na forma de ácido tiúrico, um metabólito inativo oxidado (GEARRY e BARCLAY, 2005).

A 6-MP sofre ação da enzima xantina oxidase (XO) que a oxida, no fígado e na mucosa intestinal, dando origem ao metabólito inativo ácido 6-tiúrico (6-TU). Outra enzima intraeritrocitária que atua sobre o fármaco é a tiopurina metil-transferase (TPMT) que promove a metilação produzindo o metabólito intracelular 6-MMP e uma terceira via enzimática onde ocorre a produção dos nucleotídeos ativos da 6-TGN: 6-tioguanina monofosfato (6-TGMP), 6-tioguanina difosfato (6-TGDP) e 6-tioguanina trifosfato (6-TGTP) (GEARRY e BARCLAY, 2005).

Nessa última etapa, a 6-MP é transformada pela hipoxantina-fosforibosil transferase (HPRT) em 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP), que pode seguir dois caminhos: ou é metilada pela TPMT para 6-metilmonofosfato (6-MeTIMP); ou é convertida pela inosina-5-monofosfato desidrogenase (IMPDH) em 6-tioxantossina monofosfato (6-TXMP), que, finalmente, pela ação da guanidina 5-monofosfato sintetase (GMPS), gera a 6-TGN e seus nucleotídeos farmacologicamente ativos promovendo o efeito mielossupressor, atuando como um antagonista de purina (Figura 2) (SOUSA et al., 2014; CUFFARI, 2014; ZOCHOWSKA et al., 2016).

Figura 2 – Vias metabólicas da AZA



Nota: Após absorção, a azatioprina (AZA) é convertida em 6-mercaptopurina (6-MP) pela glutatona reduzida (GSH). Após entrar na célula, a 6-MP é convertida pela enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT) em 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP), que pode seguir duas rotas distintas, a metilação pela tiopurina metil-transferase (TPMT) transformando-se em 6-metil-tioinosina monofosfato (6-MeTIMP) ou a conversão pela inosina-5-monofosfato desidrogenase (IMPDH) em 6-tioxantossina monofosfato (6-TXMP) que, finalmente, pela ação da guanidina 5-monofosfato sintetase (GMPS) forma os nucleotídeos de 6-Tioguanina (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). A AZA pode ainda ser inativada por duas enzimas, a TPMT e xantina oxidase (XO). Pela ação enzimática da TPMT a 6-MP é inativada e convertida em 6-MMP. Pela ação da XO, há formação de 6-ácido tiourico (6-TU).

Esta segunda via de inativação da 6-MP pode ser parcialmente bloqueada pelo alopurinol.

Fonte: PACHECO NETO et. al., 2008

A enzima TPMT catalisa a S-metilação de compostos aromáticos e age sobre as tiopurinas. No entanto, não há conhecimento de que a enzima tenha um substrato endógeno e nem sua real função biológica. A atividade da TPMT exibe uma distribuição trimodal em eritrócitos e os polimorfismos do gene da enzima levam a uma variação na atividade enzimática entre os indivíduos (MISDAQ et al., 2015).

O gene TPMT está localizado no braço curto do cromossomo 6 no locus 22.3 (6p22.3) e o polimorfismo dessa enzima foi investigado por diversos pesquisadores e tem-se conhecimento de três alelos polimórficos sendo os genótipos TPMT * 2, * 3A, e * 3C, os quais estão associados as atividades enzimáticas intermediária ou baixa da TPMT (CARVALHO et al., 2014; ZEGLAM et al., 2015; BROEKMAN et al., 2015).

Os caucasianos apresentam uma frequência trimodal de distribuição dos fenótipos da TPMT. Cerca de 0,3% dos caucasianos são homozigotos para o alelo não-funcional, sendo a atividade de S-metilação da 6-MP ausente, insignificante ou baixa. De 6% a 11% são heterozigotos e têm atividade enzimática intermediária, enquanto 89% a 94% são homozigotos para o alelo selvagem e, conseqüentemente, apresentam níveis de atividade enzimática entre normal e alta (ZEGLAM et al., 2015; CARVALHO et al., 2014; MISDAQ et al., 2015).

A distribuição fenotípica da TPMT também foi pesquisada entre brasileiros. Nessa pesquisa observou-se que a atividade enzimática apresentou distribuição bimodal nas populações de brancos, negros e mulatos (PACHECO NETO et al., 2008).

Os pacientes com baixa atividade enzimática TPMT, apresentam elevadas concentrações de 6-TGN, portanto, quando tratados com doses padrão de AZA, estão sujeitos a um maior risco de mielossupressão. Entretanto, os pacientes com alta atividade de TPMT são normalmente resistentes às tiopurinas ou requerem uma dose mais elevada para alcançar eficácia terapêutica, o que aumenta o risco de ocorrência da hepatotoxicidade (CARVALHO et al., 2014; LIU et al., 2015; BROEKMAN et al., 2015).

O mecanismo de citotoxicidade e a atividade imunossupressora da AZA se dão mediante o rompimento dos ácidos nucléicos. Os nucleotídeos de 6-TGN produzidos agem como substratos antagonistas competitivos pela enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT), e são incorporados ao DNA como falsos metabólitos, interferindo na síntese proteica e impedindo o crescimento e a proliferação das células, como os linfócitos T e B (PREFONTAINE et al., 2009; PETIT et al., 2008).

Karmiris e colaboradores (2016) relataram outra possível explicação para os efeitos imunossupressores em linfócitos T. O metabólito ativo da 6-MP e a 6-tioguanina trifosfato (6-TGTP) inibem a ação da proteína guanossina trifosfato, a Rac1, envolvida nos sinais de ativação da via da CD28 (Figura 2). As patologias autoimunes e rejeições de transplantes são mediadas por essa proteína transmembrana. A inibição da Rac1 impossibilita a ativação de genes importantes, alvos de cascatas, como a do gene antiapoptótico Bcl-x1 e do fator nuclear kB (NF-κB) (PETIT et al., 2008; SHIN et al., 2016).

A supressão da medula óssea ocorre em 2-5% das DII tratadas com tiopurina, gerando uma grande preocupação, visto que o risco da mielossupressão é aumentado em pacientes com deficiência da enzima citoplasmática TPMT (SHIN et al., 2016).

Outros metabólitos metilados das tiopurinas como o 6-MMP, gerados pela ação da enzima tiopurina-metil-transferase são considerados inativos e apresentam efeito hepatotóxico. Na maioria dos casos, é uma hepatotoxicidade imprevisível, cujos mecanismos patogênicos permanecem desconhecidos (GEARRY e BARCLAY, 2005; KIRCHHERR et al., 2013).

O aparecimento de hepatite foi registrado em 3,5% a 10% dos pacientes adultos com DII. Outros achados histopatológicos foram observados na hepatotoxicidade induzida por AZA, como hiperplasia nodular regenerativa, doença venooclusiva, peliosis hepática, fibrose perisinusoidal, reação idiossincrática colestática e danos nas células endoteliais hepáticas. A colestase, associada ou não à necrose dos hepatócitos, também foi relatada em outros estudos clínicos (GISBERT, GONZALEZ-LAMA, MATE, 2007; COLLI et al., 2008; MISDAQ et al., 2015).

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

Um estudo recente em culturas de linfoblastos humanos mostrou a ocorrência de processo oxidativo no DNA, causando danos e disfunções mitocondriais (MISDAQ et al., 2015). Estudos anteriores realizados com culturas de hepatócitos primários de rato mostraram que a AZA levou a um profundo esgotamento da GSH intracelular durante o seu metabolismo hepático, ocasionando o estresse oxidativo mediado pela enzima XO, com consequente lesão mitocondrial, redução de atividade metabólica, diminuição da 5-trifosfato-adenosina (ATP) e morte celular por necrose e não por apoptose. Efeitos estes agudos e dependentes da dose (AL MARUF, WAN e O'BRIEN, 2014; RAZA et al, 2003; LEE e FARRELL, 2001; PETIT et al., 2008; TAPNER et al., 2004).

Apesar dos estudos ainda serem preliminares, têm-se sugerido que a hepatotoxicidade em ratos tratados com AZA, esteja relacionada à depleção de GSH, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), precipitando a peroxidação de lípidos e proteínas e a indução transitória da permeabilidade mitocondrial. Tal hipótese é considerada, uma vez que o efeito hepatotóxico não é observado quando há

administração do fármaco 6-MP (o metabólito ativo da AZA), o que evitaria a formação do radical liberado pela AZA no fígado, durante sua conversão enzimática (RAZA et al., 2003; PETIT et al., 2008; MISDAQ et al., 2015; BROEKMAN et al., 2015).

Os eventos adversos foram significativamente mais graves em pacientes com uso de doses mais elevadas de AZA. Estudos da Ásia têm mostrado que a mielotoxicidade ocorreu em aproximadamente 20 - 40% dos doentes que receberam AZA para o tratamento da doença inflamatória do intestino (SHI et al., 2016). Por conseguinte, a maioria dos médicos na Ásia tendem a iniciar a AZA numa dose mais baixa e aumentam gradualmente a fim de evitar efeitos secundários (ROMAN et al., 2012; SHI et al., 2016).

Em termos de via metabólica das tiopurinas, o fármaco alopurinol, inibidor da enzima XO, promove um desvio do metabolismo gerando um aumento da produção dos nucleotídeos ativos 6-TGN e diminuição da 6-MMP, aumentando o risco de mielotoxicidade, porém reduzindo o risco de hepatotoxicidade. No entanto, o mecanismo pelo qual o fármaco conduz a uma redução nas concentrações do metabólito inativo 6-MMP ainda não está bem determinado. Em estudos anteriores e relatos de casos, as doses de tiopurinas foram reduzidas em 25-50% da dose inicial quando combinada com doses diárias de alopurinol (100mg a 200mg ou até 300mg) (CURKOVIC et al., 2013; PACHECO NETO et al., 2012; PACHECO NETO, 2010).

De modo geral, a intervenção terapêutica, associando-se AZA com alopurinol tem mostrado resultados importantes no tratamento da doença, aumentando a adesão ao tratamento e reduzindo os efeitos adversos, impactando diretamente sobre a saúde pública, com redução dos gastos com medicamentos de alto custo, hospitalizações e procedimentos cirúrgicos (PACHECO NETO et al., 2012).

Os efeitos dessa combinação levaram a um aumento da produção de 6-TGN, normalização da função hepática, a resolução de diversos efeitos adversos à AZA, a um melhor controle da doença e menor uso de corticosteroides, melhorando de forma geral, a qualidade de vida destes pacientes (CURKOVIC et al., 2013).

Atualmente, já é usual a associação AZA/alopurinol como escolha terapêutica em casos particulares, conforme recomendado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – DC - Portaria SAS/MS nº 966, de 2 de outubro de 2014, com o objetivo de melhorar a adesão e reduzir, ou até mesmo eliminar, os efeitos adversos da AZA. Entretanto, há uma preocupação com relação à dose da AZA que, quando associada ao

alopurinol, necessita de uma redução, o que atualmente, ocorre de forma empírica (BRASIL, 2014; MISDAQ et al., 2015).

Além disso, pacientes que falham à terapêutica ou que são intolerantes às tiopurinas, geralmente necessitam ser tratados com terapia anti-fator de necrose tumoral alfa (infiximabe, adalimumabe ou certolizumabe), drogas de custo muito elevado e de disponibilidade mais restrita que as tiopurinas.

Torna-se, portanto, evidente a importância do conhecimento do metabolismo da AZA, bem como a eficácia da associação do alopurinol à AZA em pacientes que apresentem perfil metabólico desfavorável, isto é, com produção preferencial de 6-MMP em detrimento da 6-TGN.

A monitorização dos níveis intraeritrocitários de 6-TGN é de grande aplicabilidade para o gerenciamento de DII, em pacientes submetidos à terapia com AZA, uma vez que podem identificar a dose ideal para maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade (ANDOH et al., 2008). Em países como os EUA, Europa, Reino Unido e Japão, a monitorização terapêutica é uma prática rotineira que envolve os mais variados medicamentos, inclusive a AZA.

No Brasil, ainda são poucos os laboratórios que realizam o monitoramento de fármacos, talvez devido à falta de equipamentos adequados ou de profissionais qualificados. No caso da monitorização das tiopurinas, ainda há a dificuldade de não existirem conjuntos diagnósticos disponíveis comercialmente para quantificação destes metabólitos. Até o presente momento, nossa pesquisa encontrou apenas três laboratórios que realizam essa rotina de monitorização no Brasil, sendo dois no estado de São Paulo e um em Minas Gerais.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método cromatográfico para determinação das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e 6-MMP em pacientes sob terapia com AZA, de forma a contribuir para que a terapêutica farmacológica seja realizada de forma otimizada e racional, visando o máximo de eficácia com o mínimo de efeitos adversos. Além disso, a quantificação dos metabólitos ativos da AZA nos pacientes possibilitará ao corpo clínico a individualização das doses e aplicação da farmácia clínica, aumentando o sucesso da terapia medicamentosa e reduzindo a substituição deste medicamento por outros de custos mais elevados, como os anticorpos monoclonais anti-TNF α , proporcionando um impacto positivo na farmacoterapia e na qualidade de vida destes e de outros pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) para a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da azatioprina em pacientes com Doença de Chron.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento, otimização e validação da metodologia analítica para a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA, 6-MMP e 6-TGN, por CLAE-UV;
- Aplicação da metodologia na avaliação das alterações desses metabólitos em uma população de pacientes em tratamento com AZA ou com terapia associada AZA + alopurinol.
- Avaliação dos efeitos terapêuticos e adversos da AZA ou da AZA associada com alopurinol e sua correlação com as concentrações intraeritrocitárias de 6-MMP e 6-TGN em pacientes com DC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS

- CLAE/HPLC Waters e2695 Alliance e detector UV-Vis 2489 duplo canal; Waters Corporation, Milford, MA, EUA
- Coluna de fase reversa Supelcosil[®] LC18 (dimensões 250 x 4,6 mm, 5 µm) Supelco Analytical CLAE/HPLC Waters com detector de índice de refração modelo 2414; Waters Corporation, Milford, MA, EUA
- Sistema de purificação de água Milli-Q[®]; Millipore do Brasil
- Banho-maria com circulação SL 154/10; Solab, Piracicaba, SP, Brasil
- Agitador tipo Vortex[®]
- Balança analítica AUY 220; Marte Científica/Shimadzu do Brasil
- Centrífuga refrigerada NT 835; Novatecnica, Piracicaba, SP, Brasil

4.2. SOLVENTES E PADRÕES DE REFERÊNCIA

- Materiais descartáveis – Injex e Becton-Dickinson
- Água ultrapura – obtida em sistema de purificação Mili-Q
- Acetonitrila grau HPLC (pureza 99,96%), Lote 9012-03, J. T. Baker/Avantor
- Metanol grau HPLC (pureza 99,96%), Lote 9093-03, J. T. Baker/Avantor
- Fosfato de potássio monobásico (pureza 99,95%), Lote DCBB6928, Sigma-Aldrich, Vetec
- Ácido clorídrico 37%, Lote 184355, LabSynth, SP
- Ácido perclórico 70 – 72%, Lote 13101140, Merck, SP
- Ácido orto-fosfórico 85%, Lote K43963373, Merck, Alemanha
- Solução fisiológica 0,9% (NaCl) – Sorimax, Lote 0154, Farmax, Divinópolis, MG
- Solução hidróxido de sódio 1N Fatorada (NaOH) (97%), Lote 22511, Neon, SP

- Ditiotreitól (DTT) (pureza > 98%), CAS n° 3483-12-3, Lote SLBM0460V, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Brasil
- 6-MMP (padrão certificado pureza > 98%), CAS n° 50-66-8, Lote A0150548, Acros Organics, Canadá
- 6-TGN (pureza > 98%), CAS n° 154-42-7, Lote SLBJ5295V, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Brasil
- Cafeína anidra - CAS n° 58-08-2, Lote 030431, Valdequímica Produtos Químicos, SP

4.3. PACIENTES

Realizou-se estudo descritivo do tipo transversal, com coletas de amostras sanguíneas e de dados clínicos entre os meses de agosto de 2016 a maio de 2017, no qual foram incluídos pacientes diagnosticados com DC, em tratamento com AZA há pelo menos 3 meses, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, atendidos pelo Centro de DII do Hospital Universitário HU/CAS-UFJF que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo A).

Foram excluídos do estudo, os pacientes com DC que não estavam em tratamento com AZA, pacientes que apresentaram reação de hipersensibilidade prévia a AZA (por exemplo, febre ou pancreatite), ou que faziam uso associado da AZA com medicamentos biológicos, pacientes gestantes ou nutrízes; pacientes internados; etilistas crônicos; pacientes que não tiveram um bom entendimento do questionário ou que não quiseram preencher o TCLE.

A pesquisa foi submetida e registrada em 28/04/2016 na Plataforma Brasil (CAAE 54335416.3.0000.5133) e o projeto aprovado em 12/07/2016 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário - UFJF / MG (CEP HU-UFJF) sob o número de parecer 1.633.090 (Anexo C). Os pacientes selecionados assinaram o TCLE, cientes da participação na pesquisa.

Durante as coletas de amostras de sangue, o pesquisador colaborador, aplicou o questionário clínico simples e estruturado (índice de Harvey-Bradshaw - Anexo B), contendo dados do diagnóstico da DC, como a duração da doença, localização e comportamento da doença, história de cirurgias prévias (enterectomia ou colectomia

parcial), atividade da doença (índice de Harvey-Bradshaw e dosagens da proteína C-reativa (PCR)).

Foram coletadas amostras sanguíneas (cerca de 10 mL) de todos os pacientes participantes, para as determinações do perfil hepático (AST (transaminases aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), quantificações da proteína C-reativa (PCR), avaliações hematológicas (hemograma e leucograma), além das quantificações dos metabólitos intraeritrocitários da AZA (6-MMP e 6-TGN).

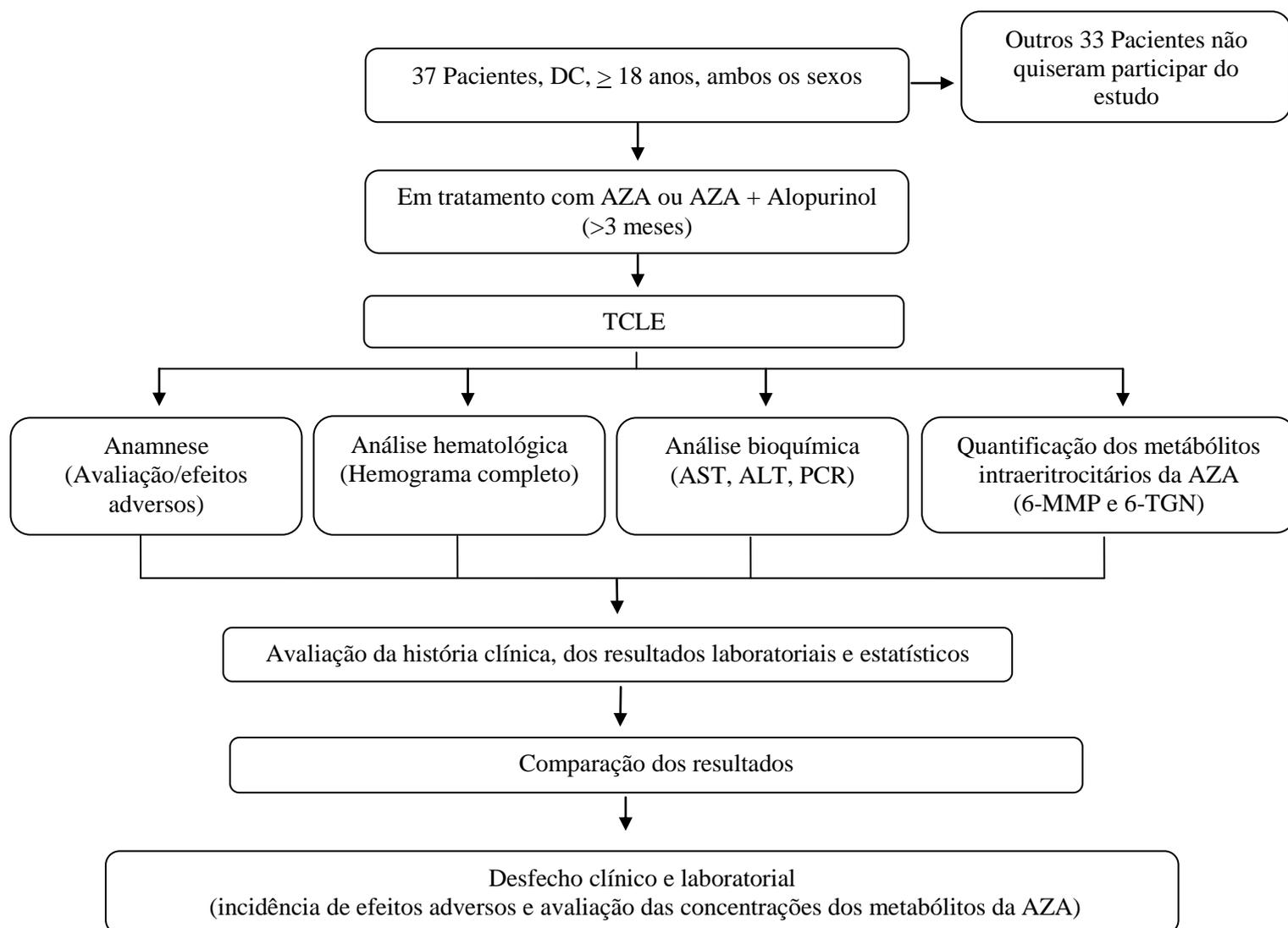
Os resultados dos pacientes foram avaliados e comparados entre si e com a literatura para observação do desfecho clínico e laboratorial da AZA, da sua associação com alopurinol, dos efeitos adversos e das possíveis alterações nas concentrações dos metabólitos intraeritrocitários da tiopurina (Fluxograma 1).

4.4. APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E ANAMNESE DO PACIENTE

O questionário aplicado refere-se ao Índice Harvei-Bradshaw (Anexo B) que trata-se de um índice clínico utilizado mundialmente para avaliação da atividade da DC. É um questionário simples, com questões sobre o bem estar do paciente, ocorrência de dor abdominal e informações sobre complicações. No mesmo momento, o paciente foi questionado sobre possíveis efeitos adversos para complementação das informações (BEST, 2006).

Os pacientes foram considerados como apresentando DC em atividade quando apresentaram o índice de Harvey-Bradshaw > 5 e/ou nível de proteína C-reativa ≥ 6 mg/L; do contrário, foram considerados como tendo DC em remissão. Além disso, foi feito o registro da presença ou não de sintomas sugestivos de reação adversa à AZA como dor abdominal, febre, náuseas, vômitos, mialgia, adinamia, fadiga e artralgia (VERMEIRE et al., 2010).

Fluxograma 1 – Casuística



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

Fonte: Elaborado pela autora

4.5. OBTENÇÃO DA AMOSTRA SANGUÍNEA

Para a realização das coletas sanguíneas, os pacientes foram previamente orientados quanto à tomada da medicação (AZA ou AZA + alopurinol), onde a mesma não foi suspensa nem modificada para realização do estudo, somente nos casos de orientação médica. Nos casos onde houve a suspensão da medicação ou o início do

tratamento com medicamentos biológicos, os pacientes comunicaram ao pesquisador colaborador, sendo o mesmo, excluído do estudo.

O procedimento padrão de coleta ocorreu no ambulatório do Hospital Universitário HU/CAS de Juiz de Fora. Foram coletados cerca de 10 mL de sangue venoso (acesso em veia mediana do braço e antebraço) e foram distribuídos em três tubos, dois tubos de coleta com anticoagulante EDTA para a realização das análises hematológicas e quantificação dos metabólitos do fármaco AZA e em um terceiro tubo, sem anticoagulante, para as análises bioquímicas (PACHECO NETO, 2010). As amostras de cada paciente foram encaminhadas para o laboratório do HU/CAS e para o laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE – ICB/UFJF) para serem analisadas por profissionais capacitados (Fluxograma 2).

Os resultados das análises dos pacientes foram avaliados e comparados de modo a observar o desfecho clínico e laboratorial da monoterapia e da associação quanto à possível resolução dos efeitos adversos e ao resgate terapêutico de eficácia da AZA, além da verificação de possíveis alterações nas concentrações dos metabólitos intraeritrocitários da tiopurina, baseando nas dosagens dos fármacos individualizadas para os pacientes.

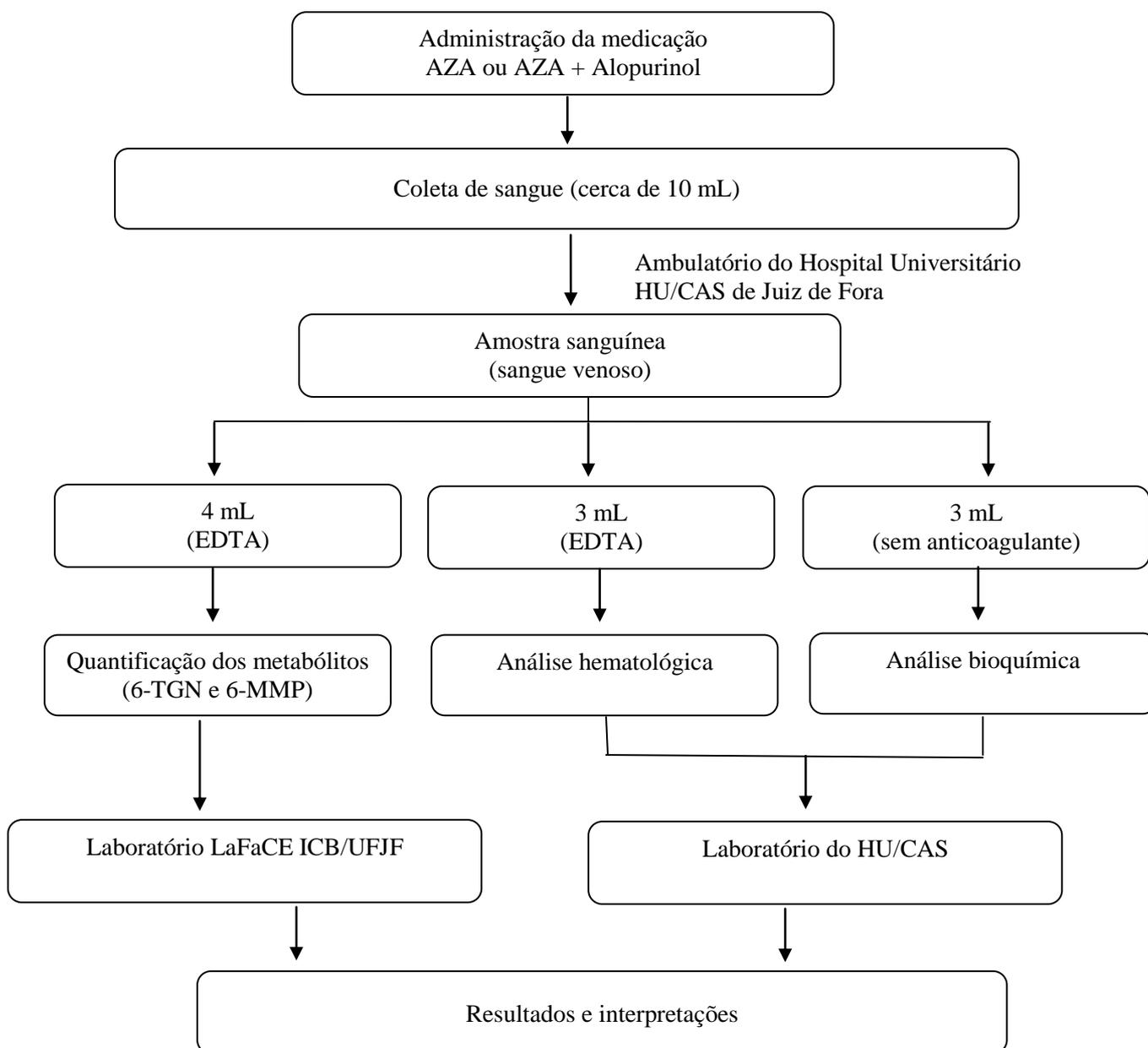
4.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS

As amostras de cada paciente foram encaminhadas para o laboratório do HU/CAS para a realização das análises hematológicas (amostras acondicionadas em um tubo com anticoagulante EDTA) e análises bioquímicas (acondicionadas em tubo sem anticoagulante).

As quantificações bioquímicas das transaminases aspartato aminotransferase (TGO ou AST) e a alanina aminotransferase (TGP ou ALT) foram realizadas utilizando as amostras sanguíneas armazenadas nos tubos de coletas sem anticoagulante e determinação do perfil hepático e a quantificação da proteína C-reativa (PCR) para avaliação do processo inflamatório (doença em remissão ou em atividade). As avaliações hematológicas (Hemogramas) foram realizadas com as amostras armazenadas em presença do anticoagulante EDTA.

As amostras foram processadas e analisadas no laboratório do HU/CAS UFJF por profissionais capacitados, conforme procedimentos internos.

Fluxograma 2 – Coleta de amostras sanguíneas



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

4.7. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA AZATIOPRINA

As amostras dos pacientes, coletadas e acondicionadas em tubos com anticoagulante EDTA, e foram encaminhadas para o laboratório LaFaCE – ICB/UFJF

(Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental), para a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA (6-MMP e 6-TGN). O processo de quantificação foi feito utilizando uma metodologia cromatográfica desenvolvida e validada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, acoplado ao detector ultravioleta (CLAE-UV).

Através da quantificação destes metabólitos foi possível correlacionarmos os mesmos com a ocorrência de efeitos adversos nos pacientes em tratamento com a AZA isolada ou associada com alopurinol.

4.7.1. Preparo e conservação das soluções

4.7.1.1. Solução padrão de 6-TGN 200 µg/mL

Em balança analítica, foi pesado cerca de 0,005 g de 6-TGN e dissolvido em 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e água quantidade suficiente para (q.s.p.) 25,0 mL em balão volumétrico. Alíquotas de 5,0 mL foram separadas em tubos de polipropileno com tampa (Tipo Falcon) e conservadas em congelador (-15 a -20 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.2. Solução padrão de 6-MMP 200 µg/mL

Foi pesado cerca de 0,005 g de 6-MMP em balança analítica, dissolvidos em 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e em água q.s.p. 25,0 mL em balão volumétrico. Foram separadas alíquotas de 5,0 mL em tubos de polipropileno com tampa (Tipo Falcon) e conservadas em congelador (-15 a -20 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.3. Solução de cafeína 100 µg/mL (padrão interno)

Foi pesado cerca de 0,005 g de cafeína em balança analítica, dissolvidos em água q.s.p. 50,0 mL em balão volumétrico. Foram separadas alíquotas de 5,0 mL em tubos de polipropileno com tampa (Tipo Falcon) e conservadas em congelador (-15 a -20 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.4. Solução intermediária de 4 µg/mL (padrão interno)

Foi realizada a diluição, em balão volumétrico, da solução estoque em água na proporção de 2,0 mL de solução estoque para 50,0 mL de volume final de solução intermediária. Foram separadas alíquotas de 1,0 mL em tubos de poliestireno com tampa (tipo eppendorf) e conservadas em congelador (-15 a -20 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.5. Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Foi utilizada a Solução de hidróxido de sódio 1 N fatorada da qual foram medidos 10,0 mL e solubilizados em água q.s.p. 100,0 mL, num balão volumétrico. A solução foi acondicionada em frasco plástico leitoso à temperatura ambiente (18 a 25 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.6. Solução de ácido clorídrico 0,1 M

Em balão volumétrico, foi realizada a diluição de 0,83 mL de ácido clorídrico (37%) em água q.s.p. 100,0 mL. A solução foi acondicionada em frasco âmbar, à temperatura ambiente (18 a 25 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.7. Solução de ditiotreitol (DTT 3,0 mg/mL)

Foi pesado cerca de 30,0 mg de DTT em balança analítica, dissolvidos em água q.s.p. 10,0 mL num balão volumétrico. A solução foi acondicionada em frasco âmbar em refrigerador (2 a 8 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.8. Solução de cloreto de sódio 0,9%

Foi utilizada uma solução comercial de Cloreto de Sódio 0,9% que foi adquirida do fabricante Farmax, Lote 0154 (validade 03/2018). A solução foi acondicionada em frasco plástico leitoso em refrigerador (2 a 8 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.9. Solução de fosfato de potássio monobásico 1,0 M (KH₂PO₄)

Em balança analítica, foi pesado aproximadamente 13,6 g de fosfato de potássio monobásico e dissolvidos em água q.s.p. 100,0 mL em balão volumétrico. Solução foi acondicionada em frasco plástico, à temperatura ambiente (18 a 25 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.10. Solução de ácido orto-fosfórico 0,1 M (H₃PO₄)

Em balão volumétrico, foi diluído 670 µL de ácido orto-fosfórico (85%) em água q.s.p. 100,0 mL. A solução foi acondicionada em frasco âmbar à temperatura ambiente (18 a 25 °C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.1.11. Tampão fosfato 0,02 M pH \cong 3

Em balão volumétrico, foi feita a diluição de 20,0 mL de solução de fosfato de potássio monobásico 1 M, 10,0 mL de ácido orto-fosfórico 0,1 M com aproximadamente 500,0 mL de água. Foi realizada a medição do pH e foi necessário realizar o ajuste do pH para aproximadamente 3,0 utilizando o ácido orto-fosfórico 0,1 M. O volume final da solução tampão foi completado com água q.s.p. 1000,0 mL.

A solução tampão foi filtrada em sistema de filtração a vácuo, utilizando membrana filtrante de (47mm, 0,45 μ m) e acondicionada em frasco vidro âmbar em refrigerador (2 a 8°C) (SBPC/ML, 2014).

4.7.2. Coleta e preparo das papas de hemácias (matriz/branco)

Para a preparação da matriz ou “branco”, utilizou-se amostras de sangue de voluntários que não estavam em terapia com AZA, coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e centrifugadas no laboratório do HU/CAS, à velocidade de 3000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente (18 a 25 °C), conforme procedimento interno (SBPC/ML, 2014).

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

4.7.3. Controle de qualidade

Durante as análises das amostras dos pacientes e a validação, foram utilizados controles de qualidade preparados em papa de hemácias para reprodução das condições da matriz onde foram analisados os metabólitos.

Foram preparados controles nas concentrações alta, média e baixa (4 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,25 μ g/mL) para os metabólitos intraeritrocitários 6-MMP e 6-TGN. Posteriormente, foram calculadas as médias e os desvios padrão (DP), considerando como resultados aceitáveis, os 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.

4.7.4. Coleta e preparo das amostras dos pacientes

Foram coletadas e utilizadas amostras de sangue dos pacientes com DC, atendidos pelo Centro de DII do Hospital Universitário HU/CAS-UFJF, que aceitaram participar da pesquisa, e que estavam em terapia com AZA ou AZA + alopurinol. O procedimento que compreende a obtenção das amostras até o processo de lavagem e obtenção da papa de hemácia de cada paciente, seguiu a mesma técnica descrita no item 4.6.2 e esquematizado no fluxograma 3.

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

4.7.5. Tratamento das amostras (matriz/branco e dos pacientes)

Após descongelamento e homogeneização das amostras, as papas de hemácias, de cada paciente e matriz, foram aquecidas em banho-maria à temperatura de 35°C. De cada amostra, 200,0 μL dos eritrócitos lavados foram transferidos para outro micro tubo de 1,0 mL, utilizando ponteiras aquecidas em banho-maria à temperatura de 35°C. Nestas alíquotas, foram adicionados 100,0 μL de solução de DTT 3 mg/mL, 50,0 μL de solução aquosa de Cafeína (PI) 4,0 $\mu\text{g/mL}$ e 50,0 μL de ácido perclórico 70% (v/v), para a realização da desproteíntização. Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação a 10000 rpm, por 15 minutos, em temperatura ambiente (18 a 25°C) (OLIVEIRA et al., 2004; HAWWA et al., 2009; SBPC/ML, 2014).

O sobrenadante foi retirado e transferido para um *vial* de borosilicato com tampa e em seguida aquecido em banho seco à 100°C \pm 5,0°C, por 45 minutos para realização completa da hidrólise ácida dos nucleotídeos em suas bases livres.

Depois de resfriada à temperatura ambiente (21 a 23°C), com o auxílio de uma pipeta, a amostra foi acondicionada em *vial* de borosilicato com *insert* de 200,0 μL para a quantificação em CLAE-UV (Fluxograma 3).

4.7.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e métodos aplicados à separação dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP

Nos últimos anos, a cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) passou a ser uma das técnicas mais utilizadas para fins de análises qualitativas e quantitativas, e as razões para esse crescimento estão na sensibilidade e na seletividade do método, com destaques em determinações médicas e nas indústrias farmacêuticas. Neste último caso, destacam-se as aplicações em ensaios de pureza, controle de qualidade, bem como nos estudos de farmacocinética e metabolismo de fármacos (SIMPSON et al., 2013; FEKETE et al., 2014).

Na cromatografia líquida de alta eficiência emprega-se uma fase móvel líquida e uma fase estacionária finamente dividida, a qual encontra-se empacotada em uma coluna. O princípio de separação é baseado nas características físico-químicas de cada composto e nas interações entre o soluto e a fase estacionária, o que resulta numa migração pela coluna de forma seletiva. (CASS e DEGANI, 2001; WEISS, 2016; SKOOG et al., 2006).

A cromatografia de fase reversa é a mais utilizada e consiste numa fase estacionária (FE) de baixa polaridade, como C8 ou C18, e uma fase móvel (FM) de maior polaridade, na maioria dos casos, composta por misturas de água, acetonitrila ou metanol (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 2012; TONHI et al., 2002; CASS e CASSIANO, 2015).

Para o desenvolvimento de um método analítico, vários parâmetros são de grande relevância na separação de analitos, como a composição da FE e FM, a vazão de fluxo e a temperatura do forno, pois afetam diretamente no perfil cromatográfico dos compostos analisados, favorecendo, entre outras melhorias, a redução do tempo de retenção e a resolução dos picos cromatográficos (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 2012; FEKETE et al., 2014; CASS e CASSIANO, 2015).

Os métodos já descritos na literatura para a determinação dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP, alguns deles reunidos na tabela 1, serviram como ponto de partida para o desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas em nosso laboratório. Como pode ser observado, a maioria desses trabalhos realiza a identificação e/ou quantificação dos metabólitos em sangue (Quadro 2).

Vale ressaltar que o desenvolvimento de métodos de cromatografia líquida envolve a busca de condições operacionais (composição da fase móvel, pH, tipo de

coluna, temperatura, etc), a fim de se otimizar os resultados para que proporcionem boa resolução e pureza do pico além de análises rápidas e confiáveis.

Quadro 2: Métodos de CLAE descritos na literatura para análise dos metabólitos da AZA

Técnica	Condições Cromatográficas	λ 6-TGN/ 6-MMP (ηm)	Extração e Hidrólise	Referências
CLAE/ DAD	Coluna C18 (5 μm) FM: A: Fosfato de potássio 0,02 mol/L (pH 3,5) e B: MeOH (40:60, v/v) Corrida por gradiente	341 ηm (6-TG) e 304 ηm (derivados de Me6-MP)	Solução de DTT, ácido perclórico. Hidrólise ácida a 100°C, 45 min.	Dervieux and Boulieu (1998)
CLAE/ UV	Coluna (4x4,6 mm, 5 μm) FM: A: ACN e B: tampão fosfato 0,01M (9H = 2,3) (12:88, v/v) UV detector UV (UVD 320)	330 ηm (6-MP)	Acetato de etila	Binscheck et al. (1996)
CLAE/ DAD	Coluna C18 (100 x 8 mm; 5 μm) FM: A: MeOH / Água (7,5:92,5, v/v), B: Trietilamina 100 mM (pH = 3,2)	322 ηm (6-MP) 342 ηm (6-TG)	Solução de DTT, ácido perclórico 70%, solução de Hanks, trietilamina, água pura. Hidrólise ácida a 100°C, 45 min.	Oliveira et al. (2004)
CLAE/ UV-Vis	Coluna CSC C18 (25 x 0,46 cm) FM: A: ACN e B: tampão fosfato 20 mmol/L (pH = 2,5) (5:95, v/v). Corrida isocrática	342 ηm (6-TG) 303 ηm (6-MMP)	Solução de DTT, ácido perclórico 70%, Sol cloreto de sódio 0,9%, Água pura, tolueno. Hidrólise ácida a 100°C.	Stefan et al. (2004)
CLAE/ UV-Vis	Coluna C18 (150mm x 3,9mm, 3 μm) FM: A: ACN, B: MeOH e C: Fosfato KH_2PO_4 0,02M (pH = 2,25) (3:1:96, v/v/v) Corrida isocrática Temperatura do forno 25°C	342 ηm (6-TU, 6-TG) 322 ηm (6-MP e 6-MMP)	Solução de DTT, ácido trifluoroacético, ácido perclórico, Solução de Hanks, Água pura, tolueno. Hidrólise ácida a 100°C, 45 min.	Hawwa et al. (2009)
CLAE/ UV-Vis	Coluna ODS-3 (150 x 4,6 mm, 5 μm) FM: A: Tampão fosfato de potássio 0,02 mol/L (pH = 3) e B: MeOH Corrida por gradiente	342 ηm (6-TGN e 6-MMP)	Solução de DTT, ácido perclórico 70% Hidrólise ácida a 100°C, 45 min.	Pacheco-Neto (2010)
CLAE/ UV-Vis	Coluna C18 (50 x 4,6 mm) FM: A: MeOH e B: sol. Tampão de ácido acético 5mmol/L (pH = 3,9) Corrida por gradiente		Solução de DTT, Água pura, ácido perclórico 60%. Hidrólise ácida a 95°C, 60 min.	Kirchherr et al (2013)
CLAE/ DAD	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) FM: A: tampão KH_2PO_4 (pH = 2,25) 0,02M, B: ACN e C: MeOH Corrida isocrática Temperatura do forno 25°C	342 ηm (TG) e 303 ηm (6-MMP)	Solução de Hanks, ácido perclórico	Vicha et al. (2015)
CLAE/ RP	Coluna CLC C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) FM: A: MeOH, B: Água (90:10, v/v) Temperatura do forno 25°C	325 ηm	Metanol, Água pura,	Naik e Nandibewoor (2013)

Nota: 6-MMP: 6-metilmercaptipurina; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; FM: fase móvel; DTT: ditiotreitól; ACN: acetônitrila; MeOH: metanol; λ : comprimento de onda, ηm : nanômetro.

Fonte: elaborada pela autora.

Para a eluição e identificação dos metabólitos, a fase móvel (FM) utilizada foi composta de três soluções: A, tampão fosfato de potássio (0,02 mol/L, pH \cong 3), B, acetonitrila e C, metanol. O fluxo da FM foi ajustado em 1,0 mL/minuto. Para a separação satisfatória dos compostos, foi aplicado um gradiente definido na tabela 1.

Tabela 1: Condição da eluição por gradiente

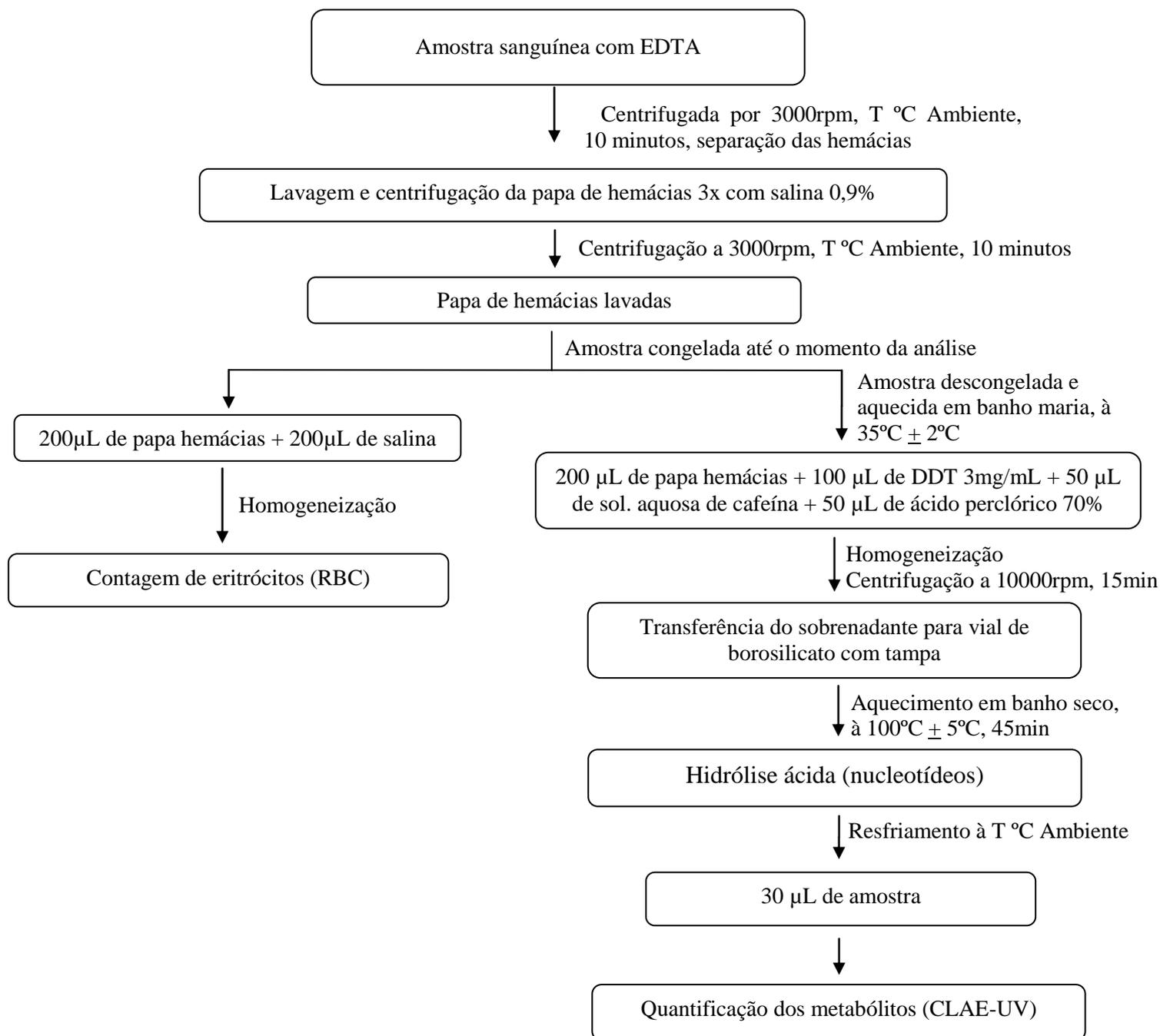
Tempo de corrida (minutos)	Fluxo (mL/minuto)	%A	%B	%C
1	1	96	3	1
9	1	96	3	1
10	1	90	9	1
27	1	90	9	1
28	1	96	3	1
31	1	96	3	1

Nota: A: tampão fosfato de potássio (0,02 mol/L, pH \cong 3), B: acetonitrila, C: metanol.
Fonte: elaborada pela autora.

O volume de injeção foi de 30,0 μ L e a quantificação dos metabólitos foi realizada em 342 nm para o 6-TGN e em 291 nm para o 6-MMP, num tempo total de corrida de 31 minutos.

Durante as análises, foram monitorados os seguintes parâmetros cromatográficos: fase móvel A (tampão fosfato de potássio 0,02 mol/L, pH \cong 3), B (acetonitrila) e C (metanol); eluição em gradiente; o fluxo de 1,0mL/min; a temperatura do forno da coluna mantida a 40°C; o tempo de corrida de 31 minutos; coluna de fase reversa Supelcosil[®] C18 (dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μ m) Supelco Analytical e as leituras dos analitos feitas em 342nm e 291nm pelo detector duplo canal UV-Vis WATERS 2489 (Fluxograma 3) (DERVIEUX-BOULIEU, 1998; OLIVEIRA et al., 2004; HAWWA et al., 2009; PACHECO NETO, 2010; VICHA et al., 2015).

Fluxograma 3 - Preparo das amostras e quantificação dos metabólitos intraeritrocitários

**Condições cromatográficas:**

- Solução tampão fosfato de potássio monobásico pH \cong 3, acetonitrila e metanol (A:B:C).
- Eluição por gradiente: 1° ao 9° min - A:B:C: 96:3:1 / 10° min - 90:9:1 / 11° ao 27° min - 90:9:1 / 28° min - 96:3:1 / 29° ao 31° min - 96:3:1.
- Fluxo 1,0mL/min; Tempo de corrida 31 min
- Coluna fase reversa Supelcosil[®] LC18, dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μ m
- Temperatura do forno da coluna 40°C
- Leituras em 291 nm e 342 nm

Nota: EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético, RPM: rotações por minuto, T °C: temperatura em Celsius.

Fonte: Elaborado pela autora

4.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE CLAE-UV

A validação do método de teste analítico é realizada para assegurar que uma metodologia analítica seja precisa, específica, reprodutível e robusta na faixa especificada de um determinado analito a ser pesquisado e quantificado. A validação do método fornece uma garantia de confiabilidade durante o uso normal, e é referido como "o processo de fornecer evidência documentada de que o método faz o que se pretende fazer" (GUIDELINE, 2005; BRASIL, 2012).

A validação deve estar em conformidade com os regulamentos da FDA (*Food and Drug Administration*), dos EUA e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), do Brasil. Infelizmente, não há uma única fonte ou diretriz final sobre a validação do método analítico. A validação é personalizada escolhendo os testes necessários e os critérios de aceitação para o método determinado. A abrangência desse tipo de validação é baseada no tipo de método e seus requisitos.

O processo de validação está em constante evolução e que começa antes de um instrumento ser colocado em funcionamento e continua depois do desenvolvimento do método. Um processo de validação bem definido e bem documentado fornece às agências reguladoras provas de que o sistema e o método são adequados para o seu uso proposto. Ao abordar o desenvolvimento de métodos, otimização e validação de forma lógica, os recursos de laboratório podem ser usados de forma mais eficiente e produtiva.

A validação do método analítico para identificação e quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA seguiu as determinações da RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012) e as determinações do *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, May 2001* (FDA, 2001).

A validação constou de ensaios para determinação da seletividade, sensibilidade (limite inferior de quantificação e de detecção), linearidade, efeito residual (*carryover*), precisão, exatidão, recuperação e estabilidade da amostra.

4.8.1. Parâmetros para validação de métodos analíticos

4.8.1.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico de diferenciar e quantificar os metabólitos na presença de outros componentes na matriz biológica

(amostra). A seletividade foi avaliada adicionando-se os analitos às amostras de papa de hemácias de pacientes não tratados com tiopurinas (branco). Foi obtida a partir de diferentes amostras e os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ). As respostas dos picos interferentes próxima ao tempo de retenção do analito e do PI foram inferiores a 20% e 5%, respectivamente (ZOCHOWSKA et al., 2016; BRASIL, 2012; FDA, 2001).

Devido à complexidade das matrizes, dois métodos distintos foram aplicados para a avaliação da seletividade: método da comparação das amostras com a matriz e o método da adição do padrão, ambas utilizando como detector a luz ultravioleta nos comprimentos de onda selecionados.

O método da comparação da matriz consistiu em um comparativo entre as matrizes de amostras sanguíneas de pacientes não tratados com tiopurinas (isentas dos metabólitos de interesse) e as matrizes adicionadas de padrões analíticos das tiopurinas.

4.8.1.2. Sensibilidade: limite inferior de quantificação (LIQ) e limite de detecção (LD)

O LIQ é estabelecido por meio da análise de amostra contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O pico de resposta do composto no LIQ deve ser identificável e reproduzível com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões (BRASIL, 2012; FDA, 2001).

Os LIQs foram calculados a partir de diluições seriadas de padrões de 6-TGN e 6-MMP adicionados às papas de hemácias e apresentaram 5 vezes a resposta em comparação à resposta do branco (BRASIL, 2012; FDA, 2001).

O LD foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes dos analitos, até o menor nível detectável deles, ou seja, as menores concentrações em que a CLAE é capaz de gerar algum sinal, sendo a determinação realizada em triplicata, onde 3 vezes o ruído da linha de base. O LD foi calculado a partir de diluições seriadas de padrões de 6-TGN e 6-MMP.

4.8.1.3. Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em um determinado intervalo (BRASIL, 2012).

A linearidade do método foi determinada através da adição dos padrões (a partir da solução estoque 200 µL) em papa de hemácias “brancas”. Diluições sucessivas foram feitas para se obter as seguintes concentrações 5; 2,5; 1,5; 1; 0,5; 0,25 e 0,15 µg/mL. A cada concentração (em 200µL de papa), adicionou-se 100 µL de DDT, 50 µL do PI (sol. Aquosa de cafeína 0,4 µg/mL), 50 µL de ácido perclórico 70%, para posterior extração e análise por CLAE.

4.8.1.4. Curva analítica

Os metabólitos 6-TGN e 6-MMP foram adicionados, separadamente, ao *pool* de papa de hemácias, para obtenção de concentrações, dentro da faixa limite de trabalho, incluindo o limite inferior de quantificação. As análises dos adicionados e do branco (matriz) foram realizadas conforme os procedimentos descritos, utilizando a equação da reta obtida através da regressão linear para cálculo das concentrações dos analitos nas amostras.

O gráfico e os resultados foram tratados estatisticamente para determinação do coeficiente de correlação (r) e da relação entre o sinal e a concentração (BRASIL, 2012; FDA, 2001). O limite de aceitação do desvio foi inferior a 15% para os padrões de calibração e 20% para o padrão LIQ em relação ao valor nominal.

4.8.1.5. Efeito residual (*carryover*)

O efeito residual representa o aparecimento ou o aumento do sinal do analito ou do PI causado pela contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Para avaliar a existência deste efeito foram realizadas 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada no limite superior de quantificação (maior ponto da curva de calibração – 5 µg/mL). As respostas de picos interferentes foram inferiores a 20% das respostas do analito processadas no LIQ e 5% da resposta do PI.

4.8.1.6. Precisão

A precisão descreve a proximidade de medidas individuais de um analito quando o processo é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma mesma amostra. Deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorridas) e em, no mínimo, três corridas diferentes (precisão intercorridas) (BRASIL, 2012; FDA, 2001).

Amostras do pool de papa adicionadas dos metabólitos, separados, em 3 concentrações diferentes (0,25; 1 e 4 µg/ml) foram preparadas e em seguida analisadas em uma mesma corrida para determinar a precisão intracorrída, e em três corridas diferentes para determinar a precisão intercorridas em dias distintos. Os resultados foram avaliados em função do Coeficiente de Variação (CV%), calculado pela seguinte equação:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100$$

Não foram admitidos valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20%.

4.8.1.7. Exatidão

Corresponde à concordância entre o resultado do ensaio e o valor de referência.

Amostras do pool de papa de hemácias, adicionadas com as três concentrações (0,25; 1 e 4 µg/ml) para 6-TGN e para a 6-MMP, foram preparadas e em seguida analisadas em uma mesma corrida para determinar a exatidão intracorrída, e em três corridas diferentes (em dias distintos) para determinar a exatidão intercorridas (BRASIL, 2012; FDA, 2001).

O resultado foi expresso pelo erro padrão relativo (EPR), calculado pela seguinte equação:

$$EPR\% = \frac{\text{Concentração Média Obtida} - \text{Valor Nominal}}{\text{Valor Nominal}} \times 100$$

Não foram admitidos valores superiores a 20% para a amostra LIQ ou 15% para as demais, em relação ao valor nominal.

4.8.1.8. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. São desejáveis porcentagens precisas e reprodutíveis de recuperação, do analito e do padrão interno, próximas a 100% (BRASIL, 2012; FDA, 2001).

A avaliação da recuperação dos metabólitos intraeritrocitários das amostras de papas de hemácias foi realizada através da comparação das amostras de papa extraídas com amostras não extraídas, ou seja, soluções preparadas nas mesmas concentrações (4; 1 e 0,25µg/mL) para a 6-TGN e para a 6-MMP. Para o cálculo da porcentagem de recuperação do analito utilizou-se a razão entre as áreas do metabólito e do padrão interno nas amostras extraídas e não extraídas, aplicando-se a fórmula:

$$\text{Recuperação\%} = \frac{\text{Amostra extraída}}{\text{Amostra não extraída}} \times 100$$

4.8.1.9. Estabilidade da amostra

Amostras do *pool* de papa de hemácias com metabólitos 6-TGN e 6-MMP adicionados, separados, nas concentrações referentes aos controles de baixa, média e alta concentração (0,25; 1 e 4µg/mL) foram preparadas e armazenadas em alíquotas até serem analisadas em triplicatas, nas seguintes condições (BRASIL, 2012; FDA, 2001):

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras foram congeladas por um período de 12h e descongeladas naturalmente. Este processo foi repetido três vezes. Após o terceiro ciclo, as amostras foram extraídas e injetadas no cromatógrafo.
- Estabilidade pós-processamento: após a corrida analítica de um lote de amostras, as mesmas foram mantidas na bandeja (rack) do injetor automático e reinjetadas.
- Estabilidade de curto prazo: as amostras foram descongeladas naturalmente à temperatura ambiente e deixadas na bancada para posterior análise em cromatógrafo.

Os resultados dos testes de estabilidade foram expressos na forma de perda percentual da concentração final em relação aos valores obtidos para as amostras recém-preparadas. Sendo consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15%.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados da validação e das amostras analisadas, foi utilizado software estatístico específico (SPSS - Statistical Package for the Social

Sciences™, versão 23.0). Os dados foram avaliados utilizando a correlação e o Teste *t* de Student. Todos os valores foram expressos em média \pm desvio padrão. A probabilidade de erro foi assumida como 5% em todos os testes ($p < 0,05$) (SOKAL & ROHLF, 1995).

5. RESULTADOS

5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO

A fim de otimizar a detecção dos metabólitos intraeritrocitários, 6-TGN e 6-MMP, foram realizadas diversas análises utilizando o Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Waters composto por bomba binária modelo 1525, forno, injetor automático modelo 2707 e detector ultravioleta/visível (UV/Vis) para a avaliação e escolha da melhor condição cromatográfica. Vários parâmetros como coluna, temperatura, fluxo da FM, composição da FM, condição de eluição (isocrática ou gradiente), seleção do comprimento de onda, escolha do PI, foram avaliados (Quadro 3).

Quadro 3: Condições cromatográficas avaliadas para a identificação e quantificação da 6-TGN e 6-MMP

	Parâmetros	Condição de eluição	Resultados	
Fase móvel	Eluição isocrática Sol. Tampão fosfato:MeOH	(50:50; 85:15; 87:13; 90:10; 93:7; 99:1)	Metabólitos eluindo separados	Picos ruins e/ou largos
	Eluição por gradiente Sol. Tampão fosfato:ACN:MeOH	(94:4:2; 96:1:3; 96:2:2; 97:1:2)	Metabólitos eluindo separados	Picos bons
	Eluição por gradiente Sol. Tampão fosfato:ACN:MeOH	(96:3:1)	Metabólitos eluindo separados	Picos melhores
Comprimento de onda	$\lambda = 211\text{nm}, 254\text{nm}, 303\text{nm}, 315\text{nm}, 322\text{nm}, 333\text{nm}, 355\text{nm}$	Metabólitos eluindo separados	Picos com caldas e/ou largos, baixa detecção	
	$\lambda = 291\text{nm}, 342\text{nm}$	Metabólitos eluindo separados	Picos melhores	
Coluna (Fase estacionária)	Symmetry® C18 (750 x 4,6 mm, 3,5 μm)	Metabólitos eluindo juntos com constituintes da matriz	Picos ruins e/ou largos	
	Supelcosil® LC18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	Metabólitos eluindo separados	Picos bons	
Forno	Desligado	Metabólitos eluindo separados	Picos ruins e/ou largos	
	Ligado	Metabólitos eluindo separados	Picos melhores	
	Aminofilina	Eluindo próximo aos metabólitos	Pico com calda e/ou largo	
Seleção do padrão interno	6-mercaptopurina	Metabólitos eluindo juntos com constituintes da matriz e metabólitos	Picos bons	
	Caféina	Eluindo separado dos metabólitos	Picos melhores	

Nota: ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; λ : comprimento de onda.

Fonte: elaborada pela autora.

Após avaliação das diversas condições testadas, a fase móvel (FM) selecionada foi composta de três soluções: A-tampão fosfato de potássio (0,02 M/L, $\text{pH} \cong 3$), B-acetonitrila e C-metanol. O fluxo foi ajustado em 1,0 mL/minuto. Para a separação satisfatória dos compostos foi aplicado o gradiente definido da seguinte forma: do primeiro ao nono minuto, foi mantida a proporção das fases A:B:C em 96:3:1, no décimo minuto foi alterada para 90:9:1 e mantida nessa proporção até o vigésimo sétimo minuto, voltando para 96:3:1 no minuto seguinte, até final da corrida.

O volume de injeção foi de 30,0 μL e a detecção dos metabólitos foi realizada em 342 nm (6-TGN) e em 291 nm (6-MMP), num tempo total de corrida de 31 minutos.

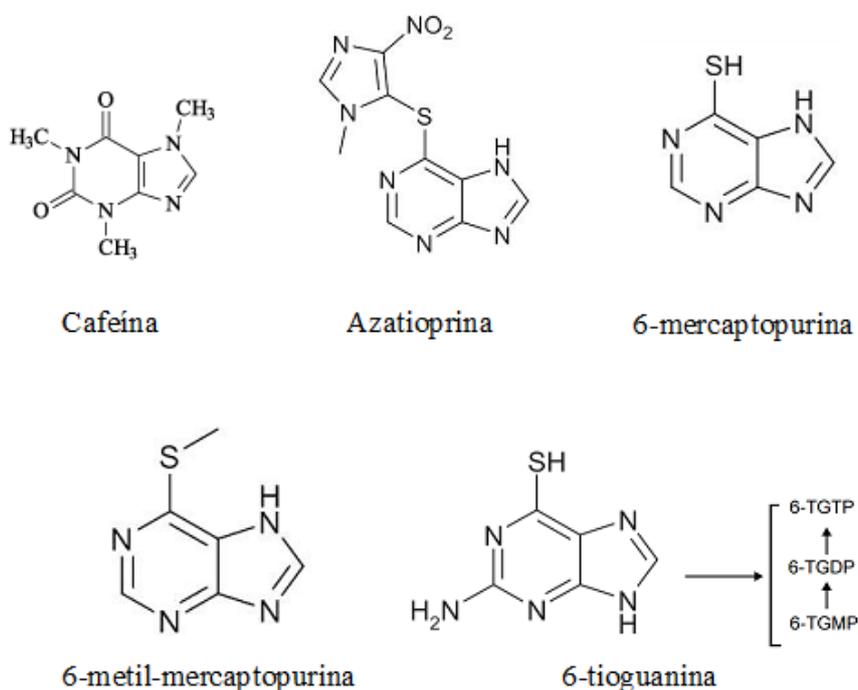
5.1.1. Seleção do padrão interno

Para a análise de quantificação dos metabólitos intraeritrocitários, algumas substâncias foram avaliadas para a escolha do melhor padrão interno. Devido às semelhanças estruturais, foram testadas a 6-mercaptopurina (6-MP) e aminofilina, porém como apresentaram eluição muito próxima aos metabólitos, interferentes da matriz biológica ou ainda baixa detecção nos comprimentos de onda de escolha (342 nm e 291 nm), foram desconsiderados.

Optamos por selecionar a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) como padrão interno. A escolha desta substância foi devido à semelhança estrutural da molécula e pelo comportamento durante as corridas, apresentando adequada e distinta eluição em relação aos metabólitos de interesse.

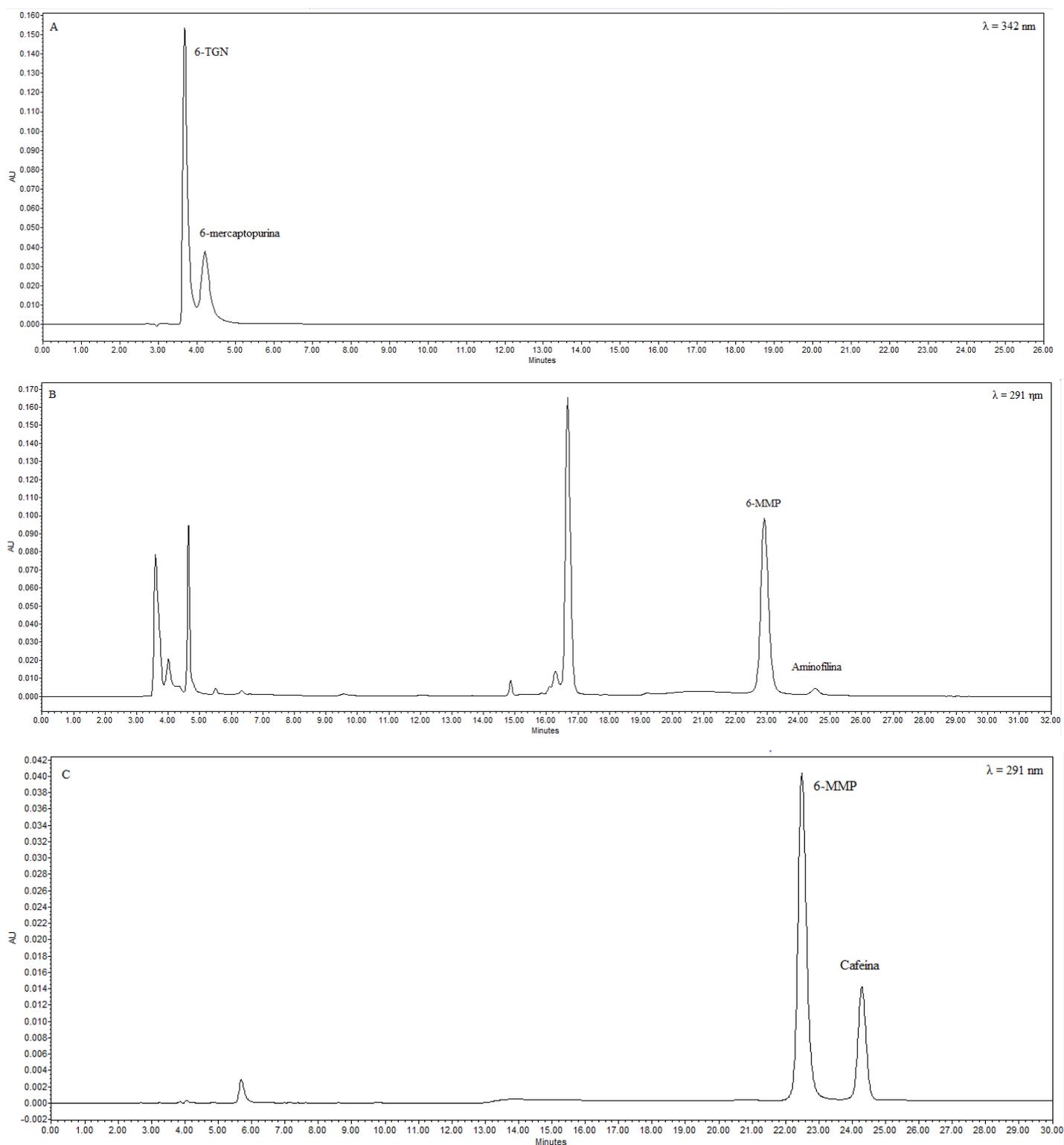
As estruturas moleculares do padrão interno, do fármaco e de seus metabólitos intraeritrocitários estão demonstradas na figura 3. Na figura 4, podem ser visualizados os cromatogramas obtidos dessas três substâncias.

Figura 3: Fórmula estrutural dos fármacos (cafeína, AZA, 6-MP) e dos metabólitos intraeritrocitários (6-MMP e 6-TG).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 4: Cromatogramas das substâncias avaliadas para a escolha do padrão interno



Nota: FM: tampão fosfato:ACN:MeOH; eluição por gradiente, fluxo de 1 mL/min; Temperatura: 40°C, Coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm); Injeção: 30 μL ; A: $\lambda = 342 \text{ nm}$ 6-TGN 50 $\mu\text{g/mL}$ e 6-MP 20 $\mu\text{g/mL}$; B: $\lambda = 291 \text{ nm}$ 6-MMP 100 $\mu\text{g/mL}$ e Aminofilina 24 $\mu\text{g/mL}$; C: $\lambda = 291 \text{ nm}$ 6-MMP 15 $\mu\text{g/mL}$ e Cafeína 10 $\mu\text{g/mL}$.

FM: fase móvel; ACN: acetonitrila; MeOH; metanol; λ : comprimento de onda; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MP: 6-mercaptopurina; 6-MMP:6-metilmercaptopurina.

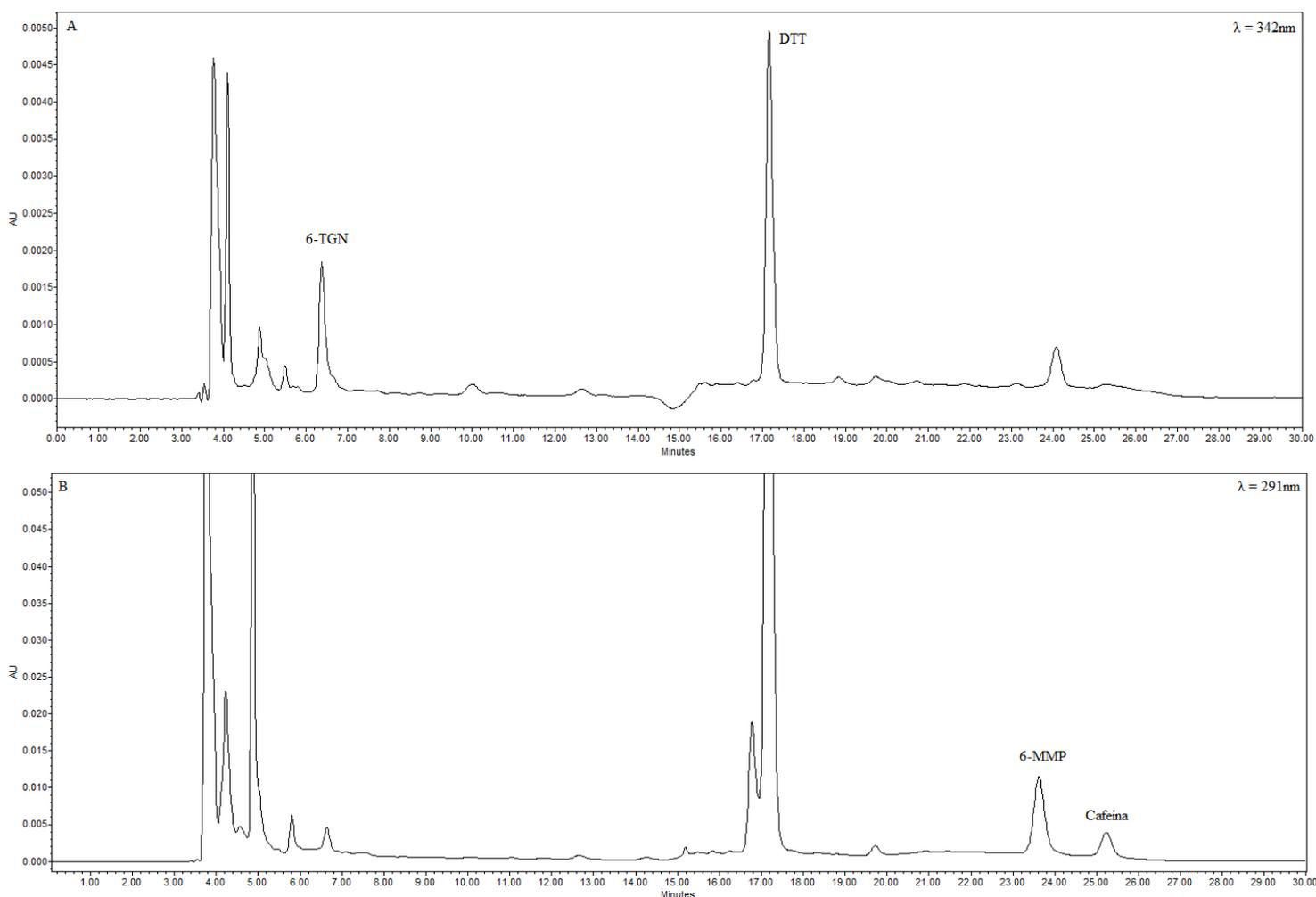
Fonte: dados da pesquisa.

5.1.2. Seleção da condição cromatográfica

Após realização das corridas, a melhor escolha (Figura 5) foi constituída de FM composta por A (tampão fosfato de potássio 0,02 mol/L, pH \cong 3), B (acetonitrila) e C (metanol) (proporção 96:3:1); eluição por gradiente, fluxo de 1 mL/minuto, tempo total da corrida 31 minutos, temperatura do forno da coluna mantida a 40°C.

A coluna selecionada foi a de fase reversa Supelcosil[®] LC18 (dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μ m) Supelco Analytical, e as leituras simultâneas dos analitos foram feitas em 342nm e 291nm, pelo detector duplo canal UV-Vis WATERS 2489.

Figura 5: Condição final determinada para a identificação e quantificação da 6-TGN e 6-MMP em papas de hemácias



Nota: FM: tampão fosfato:ACN:MeOH; eluição por gradiente, fluxo de 1 mL/min; Temperatura: 40°C, Coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); Injeção: 30 μ L; A: λ = 342 nm para 6-TGN 0,67 μ g/mL; B: λ = 291 nm para 6-MMP 15 μ g/mL e PI 3,5 μ g/mL.

FM: fase móvel; ACN: acetonitrila; MeOH; metanol; λ : comprimento de onda; DTT: d-tiotreitol; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptipurina; PI: padrão interno.

Fonte: dados da pesquisa.

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

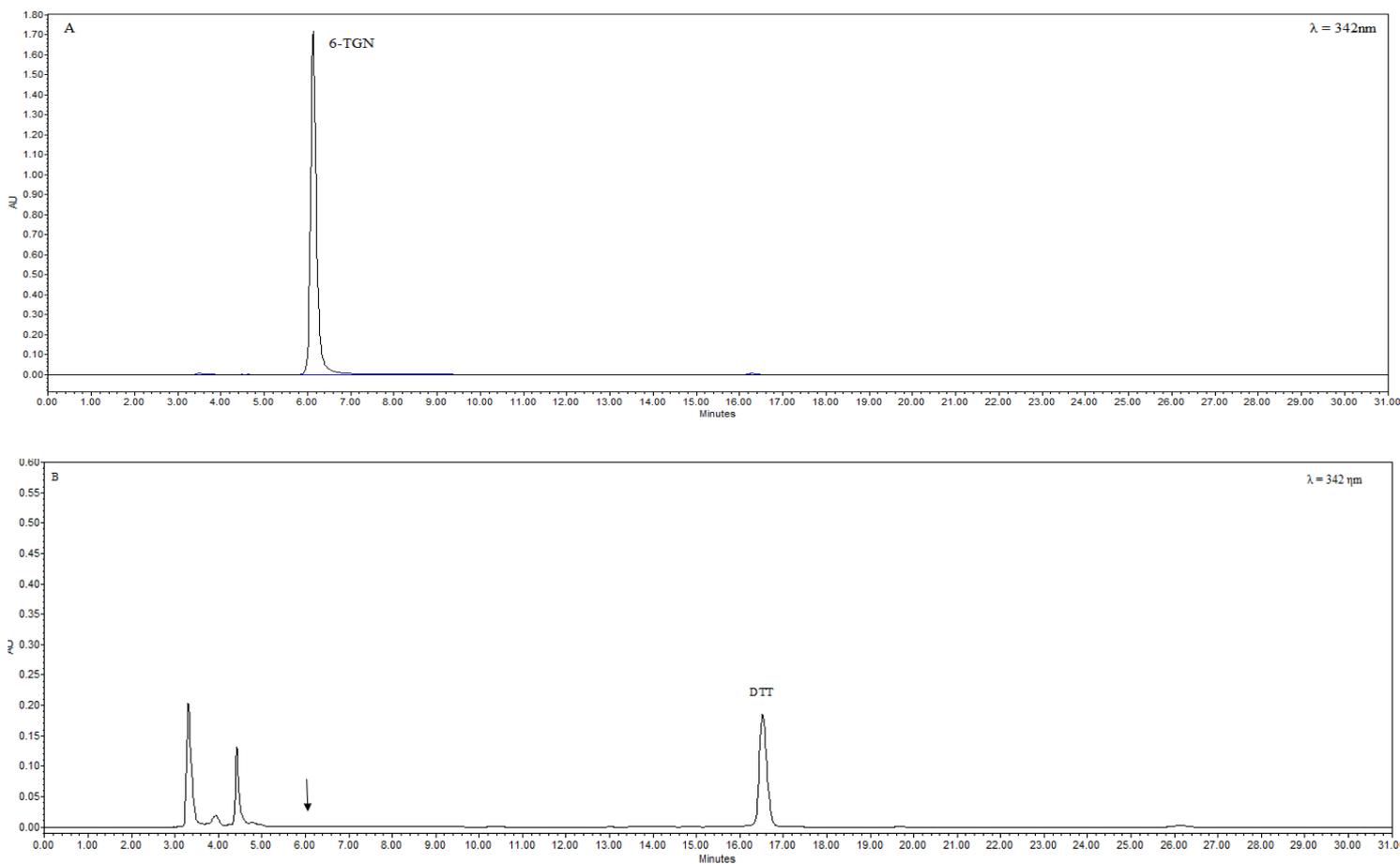
5.2.1. Seletividade

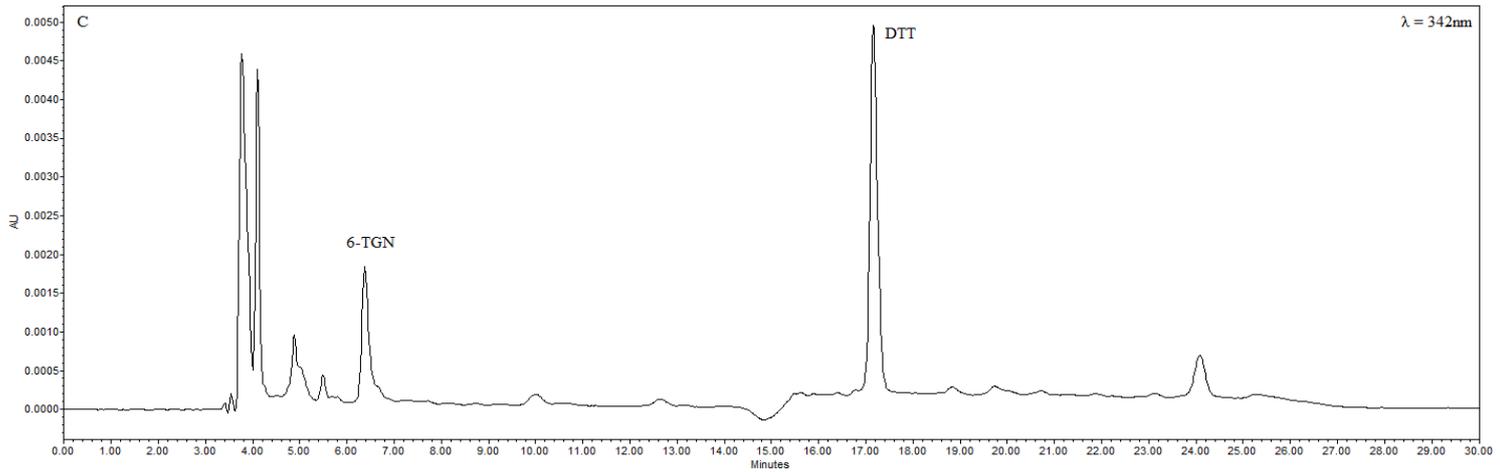
A seletividade do método foi verificada aplicando-se as mesmas condições metodológicas anteriormente descritas num *pool* de hemácias de pacientes não tratados com AZA (matriz ou “branco”) e num *pool* adicionado de 6-TGN e de 6-MMP.

Analisando as amostras de papa (matriz adicionada de padrões) em diferentes corridas, amostras ou condições cromatográficas, observou-se separação satisfatória dos metabólitos, com picos detectados em 6,2 e 23,1 minutos, respectivamente para 6-TGN e 6-MMP.

Outros picos foram encontrados em 24,7 minutos, referente à cafeína (padrão interno) e em 16,6 minutos referente ao pico da solução de DTT 3,0 mg/mL utilizada durante o tratamento da amostra (Figuras 6 e 7).

Figura 6: Cromatogramas do 6-TGN em solução, da matriz de papa de hemácias (branco) e da amostra de paciente tratado com AZA



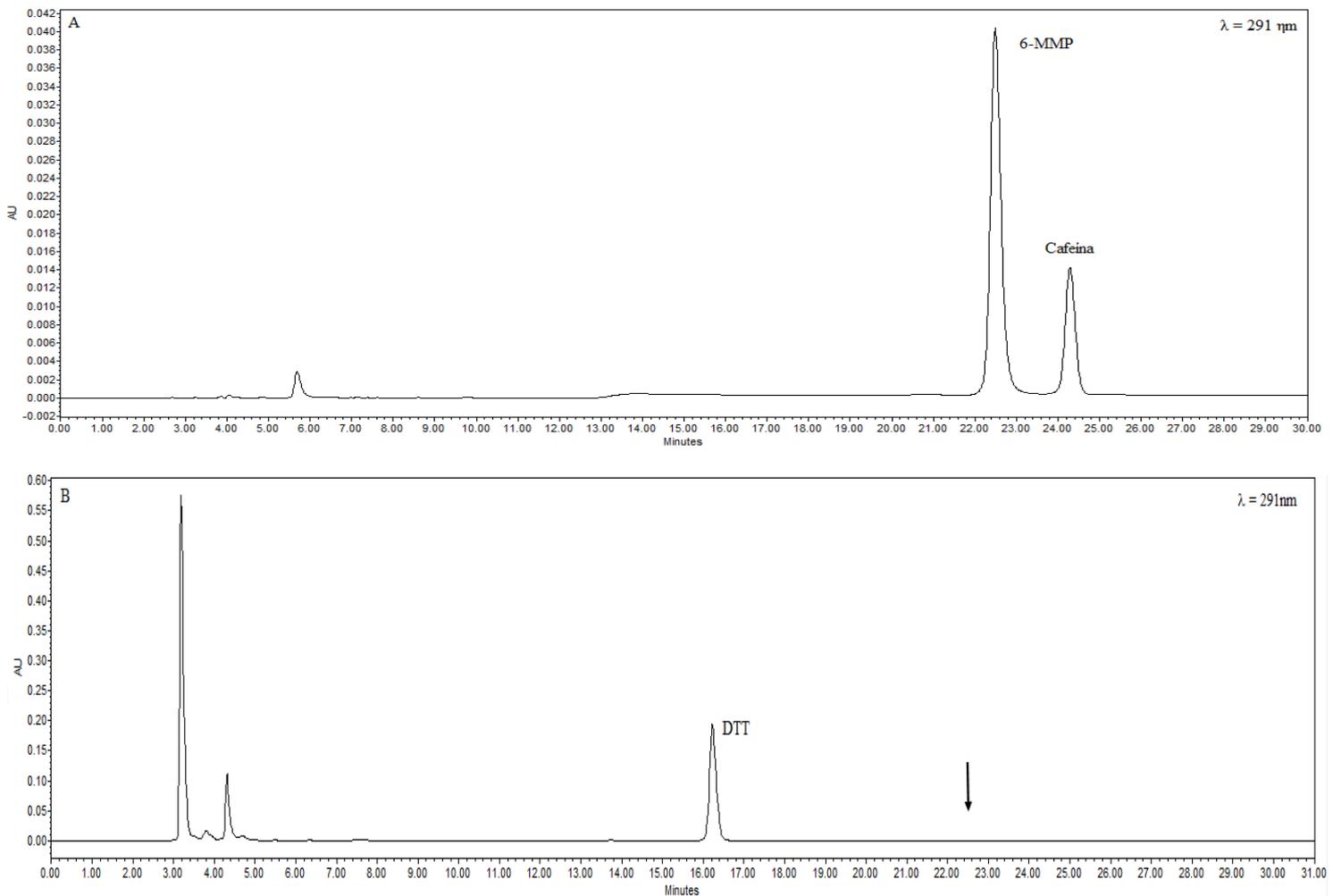


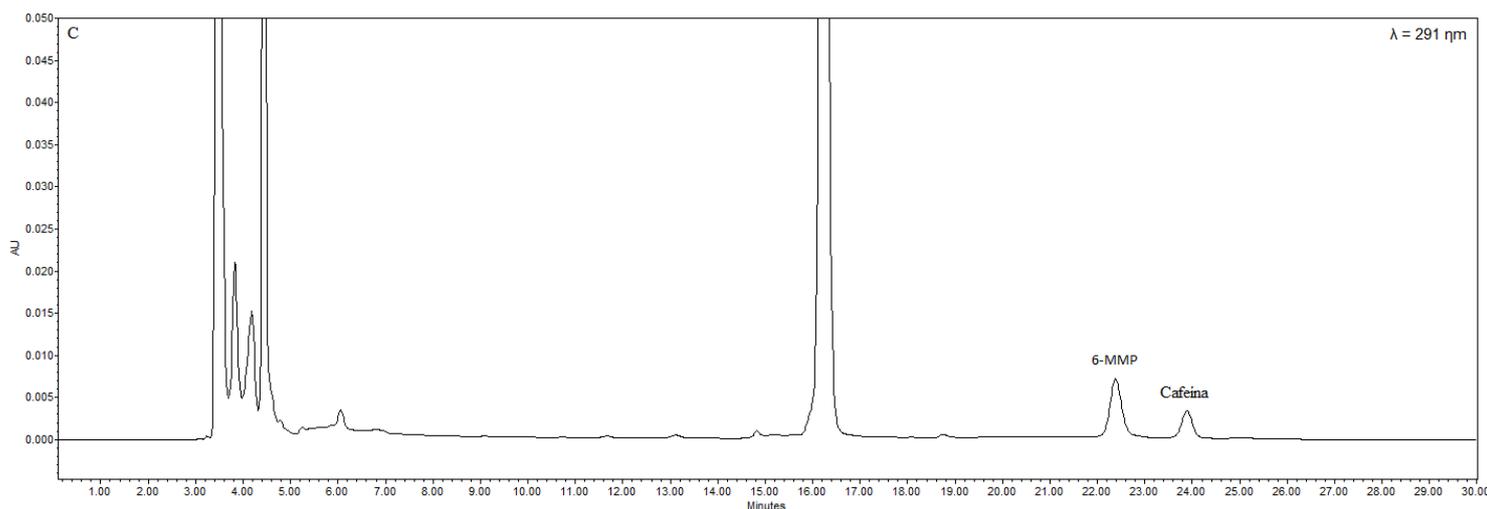
Nota: FM: tampão fosfato:ACN:MeOH, eluição por gradiente; Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40°C; A: Solução padrão aquosa 6-TGN 100µg/mL, B: matriz (“branco”) papa de hemácia, C: Amostra de paciente; Injeção: 30 µL; $\lambda = 342$ nm.

FM: fase móvel; ACN: acetonitrila; MeOH; metanol; λ : comprimento de onda; DTT: d-tiotreitól; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptopurina.

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 7: Cromatogramas da 6-MMP em solução, da matriz de papa de hemácias (branco) e da amostra de paciente tratado com AZA





Nota: FM: tampão fosfato:ACN:MeOH, eluição por gradiente; Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40°C; A: Solução padrão aquosa 6-MMP 15µg/mL e PI 10µg/mL, B: matriz (“branco”) papa de hemácia, C: Amostra de paciente; Injeção: 30 µL; λ = 291 nm.

FM: fase móvel; ACN: acetonitrila; MeOH; metanol; λ : comprimento de onda; DTT: d-tiotreitól; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptapurina; PI: padrão interno.

Fonte: dados da pesquisa.

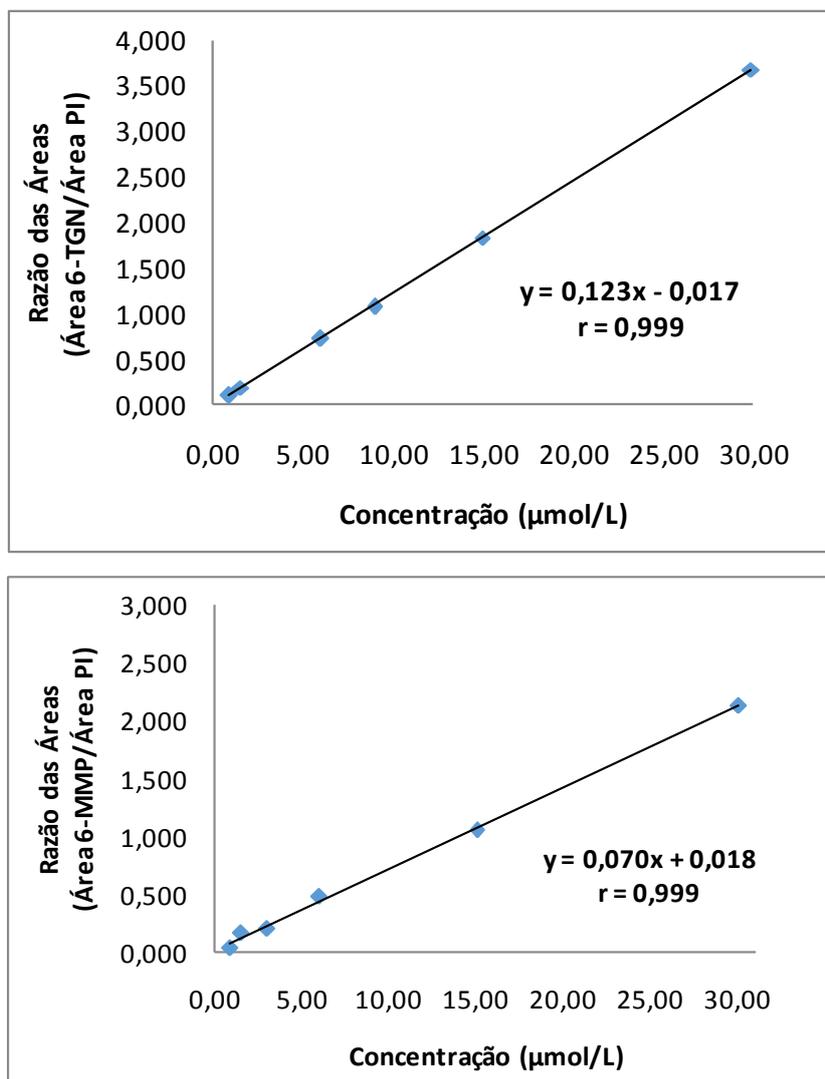
5.2.2. Sensibilidade: limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

Após diluições sucessivas determinou-se, como limite de quantificação do método, a concentração de 0,89 µmol/L (CV = 13,7%) para 6-TGN e concentração de 0,90 µmol/L (CV = 11,6%) para 6-MMP. O limite de detecção estabelecido foi 0,29 µmol/L e 0,30µmol/L para 6-TGN e 6-MMP, respectivamente.

5.2.3. Linearidade

A linearidade do método para o metabólito 6-TGN foi definida entre 0,89 – 29,91 µmol/L, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,999, e para o metabólito 6-MMP foi definida entre 0,90 – 30,08 µmol/L, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,999. Esses intervalos de trabalho mostraram-se adequados para a quantificação dos metabólitos nas amostras provenientes dos pacientes em tratamento com AZA. As equações da reta e os coeficientes de correlação podem ser visualizados na figura 8.

Figura 8: Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de correlação linear (r) obtidos para os metabólitos intraeritrocitários da AZA



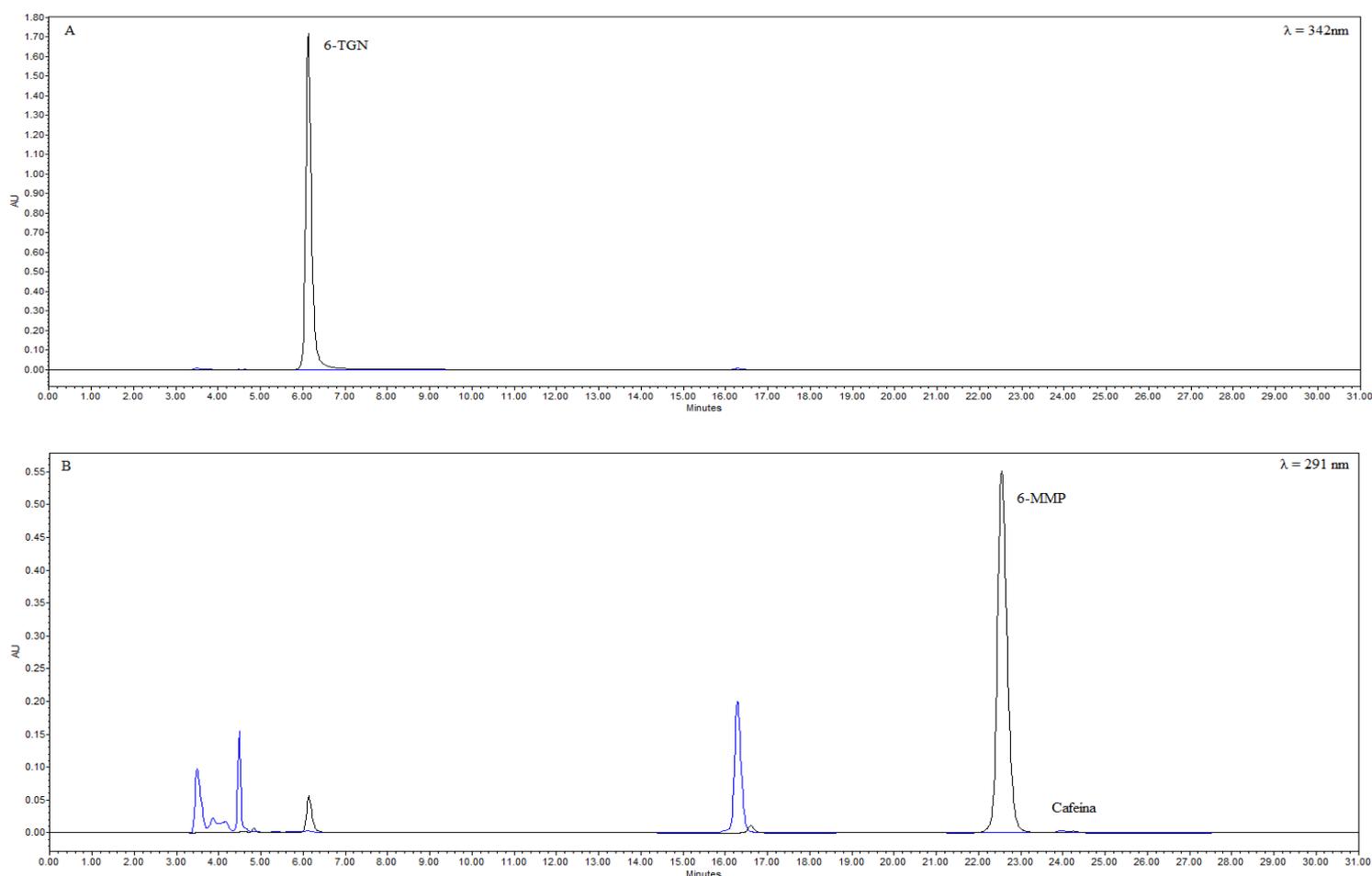
Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptipurina; PI: padrão interno, y: equação reduzida da reta; r: coeficiente de correlação.

Fonte: dados da pesquisa.

5.2.4. Efeito residual (*Carryover*)

A injeção de amostras de plasma branco após a injeção de uma amostra processada no limite superior de quantificação (5 µg/mL) demonstrou que não há riscos de contaminação provenientes do acúmulo de resíduos de eluições anteriores, visto que nenhum pico interferente foi visualizado na matriz "branco" (papa de hemácias) nos tempos de retenção dos analitos (figura 9).

Figura 9: Avaliação do Efeito Residual



Nota: FM: tampão fosfato:ACN:MeOH, eluição por gradiente, Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40°C; Injeção: 30 μL

A: amostra de papa de hemácias com solução padrão 6-TGN 100 $\mu\text{g/mL}$ com matriz, $\lambda = 342\text{ nm}$.

B: amostra de papa de hemácias com solução padrão 6-MMP 100 $\mu\text{g/mL}$ com matriz, $\lambda = 291\text{ nm}$.

FM: fase móvel; ACN: acetonitrila; MeOH; metanol; λ : comprimento de onda; 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptipurina.

Fonte: dados da pesquisa.

5.2.5. Precisão e exatidão

Os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3 comprovam que o método se mostrou preciso e exato. As análises de 5 replicatas em 3 níveis de concentração forneceu valores satisfatórios de coeficiente de variação e erro padrão relativo (abaixo de 15% e 20%).

Tabela 2: Precisão e Exatidão Intradia e Interdia para 6-TGN

Controles de Qualidade	Precisão	Exatidão
$\mu\text{mol/L}$	Média Intradia (n=10) (CV%)	Média Intradia (n=10) (EPR%)
23,92	4,36	12,37
5,98	5,45	5,78
1,50	6,63	15,92
	Média Interdia (n=10) (CV%)	Média Interdia (n=10) (EPR%)
23,92	6,83	9,20
5,98	7,09	11,31
1,50	13,77	10,93

Nota: CV: Coeficiente de variação, EPR: erro padrão relativo, n: número amostral
Fonte: dados da pesquisa

Tabela 3: Precisão e Exatidão Intradia e Interdia para 6-MMP

Controles de Qualidade	Precisão	Exatidão
$\mu\text{mol/L}$	Média Intradia (n=10) (CV%)	Média Intradia (n=10) (EPR%)
24,07	12,13	11,67
6,02	8,92	12,65
1,50	10,38	5,24
	Média Interdia (n=10) (CV%)	Média Interdia (n=10) (EPR%)
24,07	9,98	8,51
6,02	9,07	8,87
1,50	11,65	4,58

Nota: CV: Coeficiente de variação, EPR: erro padrão relativo, n: número amostral
Fonte: dados da pesquisa

5.2.6. Recuperação dos metabólitos da AZA nas papas de hemácias

O teste de recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos dos metabólitos extraídos a partir de três concentrações, em triplicata, contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos de soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. Inicialmente, foi injetada no CLAE uma amostra de pool de papas de pacientes sem adição de analito ou PI, a fim de verificar a ausência de picos interferentes na região de detecção dessas substâncias. Assim, 200 µL da papa de hemácias (matriz) foram preparadas conforme o método de extração definido, descrito anteriormente (Item 4.7.5.), através da hidrólise ácida.

Os valores de recuperação dos analitos estão reunidos na tabela 4.

Tabela 4: Recuperação dos metabólitos da AZA nas papas de hemácias

	Controles de Qualidade µmol/L	Recuperação %
6-TGN (n=6)	23,92	88,80
	5,98	94,10
	1,50	80,70
	Média	87,90
6-MMP (n=6)	24,07	97,10
	6,02	96,70
	1,50	82,00
	Média	91,90

Fonte: dados da pesquisa

5.2.7. Estabilidade

➤ Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Os metabólitos 6-TGN e 6-MMP mostraram-se estáveis na papa de hemácias após a realização de 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os desvios encontrados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento de metabólitos da AZA

	Níveis de Concentração	Concentração Experimental	Concentração após 72h	Desvio (%)
6-TGN (n=3)	23,92	24,27	21,96	9,52
	5,98	5,09	5,19	1,96
	1,50	1,67	1,79	7,19
6-MMP (n=3)	24,07	21,84	21,12	3,30
	6,02	5,90	5,94	0,68
	1,50	1,79	1,71	4,47

Fonte: dados da pesquisa

➤ Estabilidade pós-processamento (na bandeja do injetor)

As amostras mostraram-se estáveis por um período de pelo menos 13 horas quando deixadas na bandeja do injetor. Os resultados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6: Estabilidade pós-processamento (na bandeja do injetor) de metabólitos da AZA

	Níveis de Concentração	Concentração Experimental	Concentração após 13h	Desvio (%)
6-TGN (n=3)	23,92	24,27	21,73	10,46
	5,98	5,09	5,13	0,79
	1,50	1,67	1,44	13,77
6-MMP (n=3)	24,07	21,84	21,60	1,10
	6,02	5,90	5,56	5,76
	1,50	1,80	1,79	0,56

Fonte: dados da pesquisa

➤ Estabilidade de Curto Prazo

As amostras descongeladas e deixadas na bancada por um período de pelo menos 5 horas também se apresentaram estáveis, conforme os resultados da tabela 7.

Tabela 7: Estabilidade de Curto Prazo de metabólitos da AZA

	Níveis de Concentração	Concentração Experimental	Concentração após 5h	Desvio (%)
6-TGN (n=3)	23,92	21,67	20,84	3,83
	5,98	5,56	5,19	6,65
	1,50	1,22	1,18	3,28
6-MMP (n=3)	24,07	24,27	21,63	10,88
	6,02	5,09	5,11	0,39
	1,50	1,67	1,44	13,77

Fonte: dados da pesquisa

Os parâmetros avaliados e os dados obtidos na validação do método analítico para quantificação dos metabólitos 6-TGN e 6-MMP em papa de hemácias estão resumidos na tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos na validação para os metabólitos intraeritrocitários da AZA

Parâmetro	Valores Obtidos 6-TGN	Valores Obtidos 6-MMP
Linearidade Coeficiente de Correlação	0,89 – 29,91 µmol/L r = 0,999	0,90 – 30,08 µmol/L r = 0,999
Limite de Quantificação	0,89 µmol/L	0,90 µmol/L
Limite de Detecção	0,29µmol/L	0,30µmol/L
Estabilidade:		
- Curto Prazo	93,34 – 96,72%	86,23 – 100,39%
- Ciclos de Congelamento	90,48 – 107,19 %	95,53 – 100,68 %
- Na bandeja do injetor	86,23 – 100,79%	94,24 – 99,44%
Precisão (CV%)		
- Intradia	5,48	10,48
- Interdia	9,23	10,23
Exatidão (EPR%)		
- Intradia	11,36	9,85
- Interdia	10,48	7,32
Recuperação (%)	87,90	91,90

Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6 tioguanina, 6-MMP: 6 metil mercaptopurina, CV: Coeficiente de variação, EPR: erro padrão relativo

Fonte: dados da pesquisa

5.3. PACIENTES E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

5.3.1. Características clínicas dos pacientes

Foram recrutados 37 pacientes com DC em uso de AZA, durante o período do estudo, dos quais 73% eram mulheres, sendo 28 pacientes (75,7%) auto-declarados brancos. As localizações mais comuns da doença foram ileocolônica (54%) e íleo terminal (35%) e o fenótipo predominante foi o inflamatório (48,6%). Dos pacientes com DC, dez (27%) sofreram algum tipo de intervenção cirúrgica e 20 (54%) apresentam alguma complicação decorrente da DC. As características dos pacientes estão retratadas no quadro 4.

Quadro 4: Características dos pacientes com DC que participaram do estudo

Id. Paciente	Sexo	Idade (anos)	Cor	Ano de Diagnóstico	Tipo de DC	Fenotipo	Processos cirúrgicos	Índice de Harvey-Bradshaw	Dor abdominal	Bem estar	Complicações, Queixas e Reações Adversas
1	F	33	Br	2013	CO	I	não	1	N	B	fibromialgia, monoartrite de grandes articulações
2	M	26	P	2011	IL	E, F	não	0	N	B	fístula anal
3	F	18	Br	2009	CO	E, I	não	3	L	B	pancolite
4	F	37	P	2008	CO	I	não	4	S	B	náuseas e vômitos, fortes dores no abdome.
5	M	48	N	1994	CO	E, F	*	6	M	B	desconforto à palpitação profunda
6	F	52	Br	*	CO	I	*	7	M	B	pancolite, dores nas articulações, fezes líquidas, diarreia (8x /dia) com muco e sangramento
7	F	36	Br	2013	IL	I	não	2	L	B	náuseas e vômitos, perda de apetite, cólica na região mesogástrica
8	F	34	Br	2000	CO	I	não	1	N	B	empazinamento
9	F	50	Br	1996	IC	E, F	fistulotomia	3	N	R	síndrome do intestino irritável
10	F	53	Br	2008	IC	I	não	2	N	R	doença celíaca, glaucoma, psoríase
11	F	44	Br	2006	IL	E	*	2	N	B	artralgia
12	F	48	Br	2010	CO	E, F	não	1	N	B	fístula ileocolônica, artrite periférica
13	F	45	Br	2014	IC	*	não	1	N	B	náuseas e vômitos, diverticulite, artralgia no joelho
14	M	64	Br	2011	IL	E	não	2	N	B	massa palpável, piora da visão, aumento da PA
15	F	53	Br	1994	*	*	não	1	N	B	poliartrite de pequenas articulações
16	M	62	Br	2014	IC	I	não	3	M	B	epigastralgia, dor esporádica
17	F	28	Br	2007	IC	E, F	não	1	N	B	
18	M	41	P	2000	IL	F	anastomose ileocecal	2	N	B	fístula enterocutânea – anal

Continua

Continuação Quadro 4

Id. Paciente	Sexo	Idade (anos)	Cor	Ano de Diagnóstico	Tipo de DC	Fenótipo	Processos cirúrgicos	Índice de Harvey-Bradshaw	Dor abdominal	Bem estar	Complicações, Queixas e Reações Adversas
19	F	27	Br	2012	IC	F	não	4	N	B	manchas hipocrômicas, queda de cabelo, fezes pastosas
20	F	52	Br	2003	*	F	não	2	N	B	fístula reto-vaginal
21	F	46	Br	2006	IL	E, F	fistulotomia	0	N	B	fístula anal
22	F	61	Br	2012	IL	I	*	3	N	B	fezes diarreicas (3x /semana), amareladas.
23	F	63	Br	2012	CO	I	não	0	N	B	presença de varizes (extremidade)
24	F	57	P	2013	IC	I	não	1	M	B	massa palpável
25	F	56	Br	1996	*	F	não	8	N	B	fístula anal, 5 a 6 evacuações líquidas/dia
26	F	56	Br	2002	IL	E	não	7	L	R	leucopenia associada à AZA, muita dor abdominal
27	F	27	Br	2012	IC	*	não	2	N	B	atrofia vilositária
28	M	39	P	2006	IL	E, I	não	1	N	B	lesões na face
29	M	26	Br	2012	IC	I	não	1	N	B	artrite periférica, uveíte, pólipos inferiores, erosões na região do cólon
30	F	60	N	2012	IL	*	não	2	N	B	fezes ressecadas
31	F	50	Br	1995	IL	E, I	não	3	M	B	
32	F	44	Br	2006	IC	I	não	2	N	B	fístula reto-vaginal
33	F	38	N	2001	IC	F, I	ileocelectomia	2	N	B	estenosante, fezes líquidas
34	M	57	Br	1980	IC	F	fistulotomia	3	N	B	fístula anal, artralgia (artrite periférica)
35	M	62	Br	2011	IL	I	não	1	N	B	
36	F	54	Br	2004	IL	E	não	4	L	R	fístula perianal, febre, náuseas e vômitos
37	F	64	Br	2002	CO	F, I	não	1	N	B	fístula anal

Fonte: dados da pesquisa

Nota: *: dados não obtidos; F: feminino; M: masculino; Br: branca; N: negra; P: parda; IC: ileocolíte; IL: ileíte; CO: colite; I: inflamatória; E: estenosante; F: fistulizante; N: nenhuma dor; L: dor leve; M: dor moderada; S: dor severa; B: bom; R: ruim

5.3.2. Características dos pacientes quanto ao uso das tiopurinas

Os pacientes em terapia com tiopurina, avaliados no estudo, apresentavam uma média de idade de 46 anos (faixa de 18 a 64 anos). Dos 37 pacientes, 30 estavam com a doença em remissão. Considerando o protocolo farmacoterapêutico, cinco pacientes (13,5%) faziam a associação da AZA com alopurinol para tratamento da DC. A dosagem média encontrada de AZA, na monoterapia, foi de 150 mg/dia (intervalo 25 a 200 mg/dia), enquanto a dosagem média encontrada de AZA, na terapia combinada com alopurinol 100mg, foi de 80 mg/dia (intervalo 25 a 200 mg/dia).

No total, 22 pacientes (59,5%) apresentaram pelo menos um efeito adverso relacionado à terapia com AZA durante o tratamento, o que poderia levar à não adesão ao tratamento e, conseqüentemente, à não remissão da doença ou não eficácia terapêutica. Os efeitos adversos mais relatados pelos pacientes em tratamento foram dor abdominal leve a moderada (n=26, 70,3%) e náuseas/vômitos (n=4, 10,8%). Um paciente (2,7%), em uso de AZA, relatou o surgimento de febre, sem causa aparente e um outro mostrou-se com a contagem de leucócitos reduzida.

Além dos efeitos adversos citados, foram observadas alterações nas provas de função hepática; aumento da concentração da proteína C reativa (PCR), um indicador de atividade inflamatória aguda; dentre outras (quadros 4 e 5). Nenhum caso de pancreatite aguda ou hepatite foi observado nos pacientes estudados. Apesar da ocorrência das manifestações clínicas, nenhum paciente, durante o estudo, teve a dosagem de AZA modificada ou suspensa.

As características da terapia com tiopurina estão descritas no quadro 5.

5.3.3. Análises de amostras de pacientes

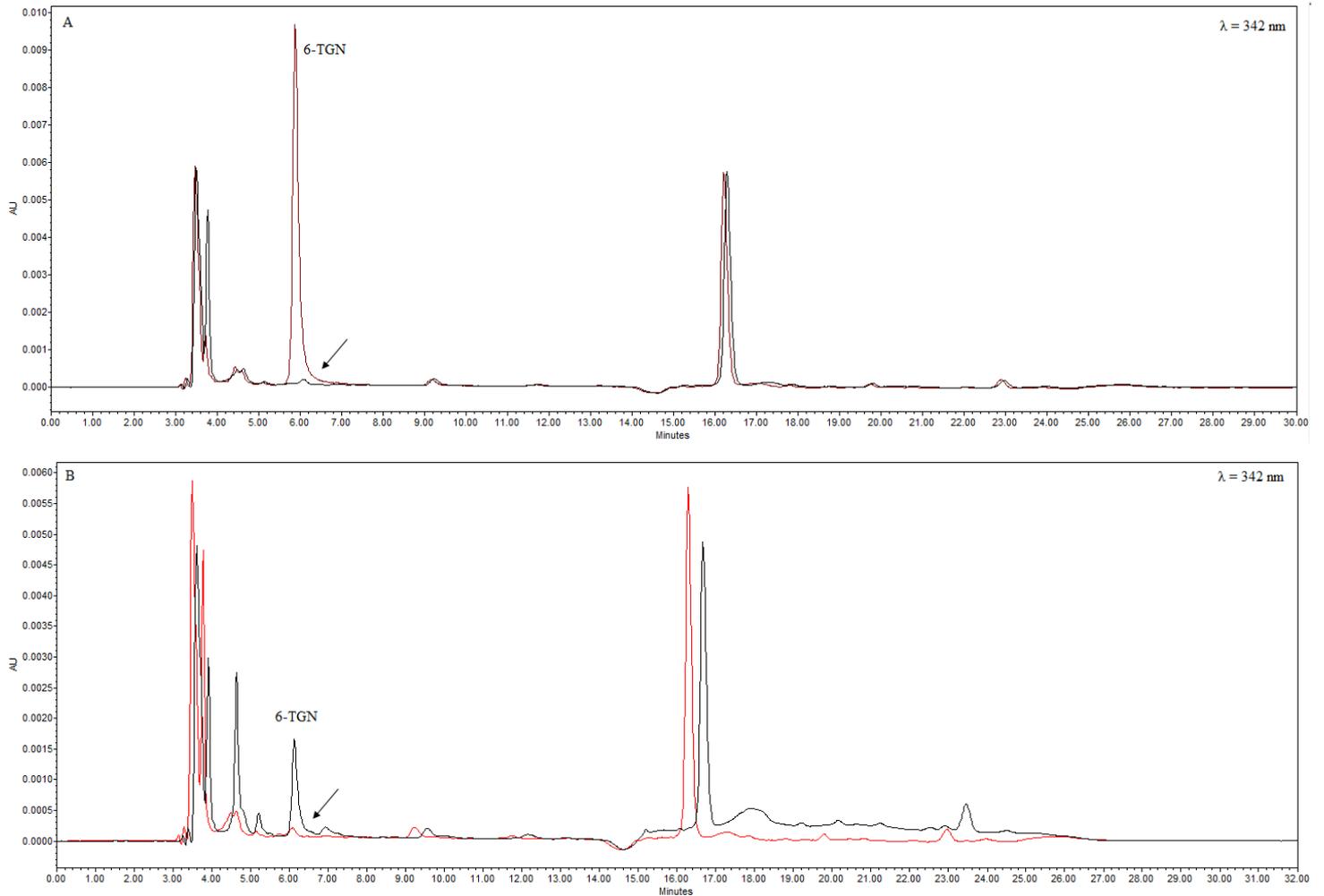
O método cromatográfico desenvolvido e validado foi utilizado para as determinações dos metabólitos intraeritrocitários da AZA, 6-TGN e 6-MMP, de pacientes com DC, em terapia com AZA ou AZA associada a alopurinol. O método se mostrou seletivo e sensível o suficiente para analisar 6-TGN e 6-MMP na mesma corrida, porém em comprimentos de onda diferentes (6-TGN analisado em 342 nm, 6-MMP e o padrão interno (PI) analisados em 291 nm).

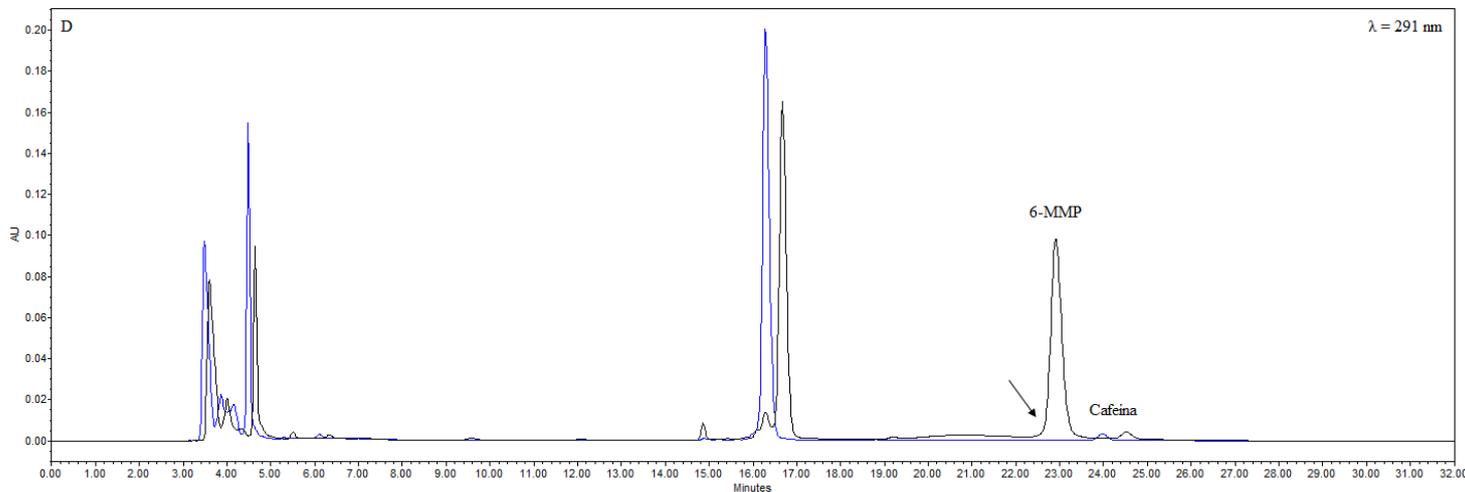
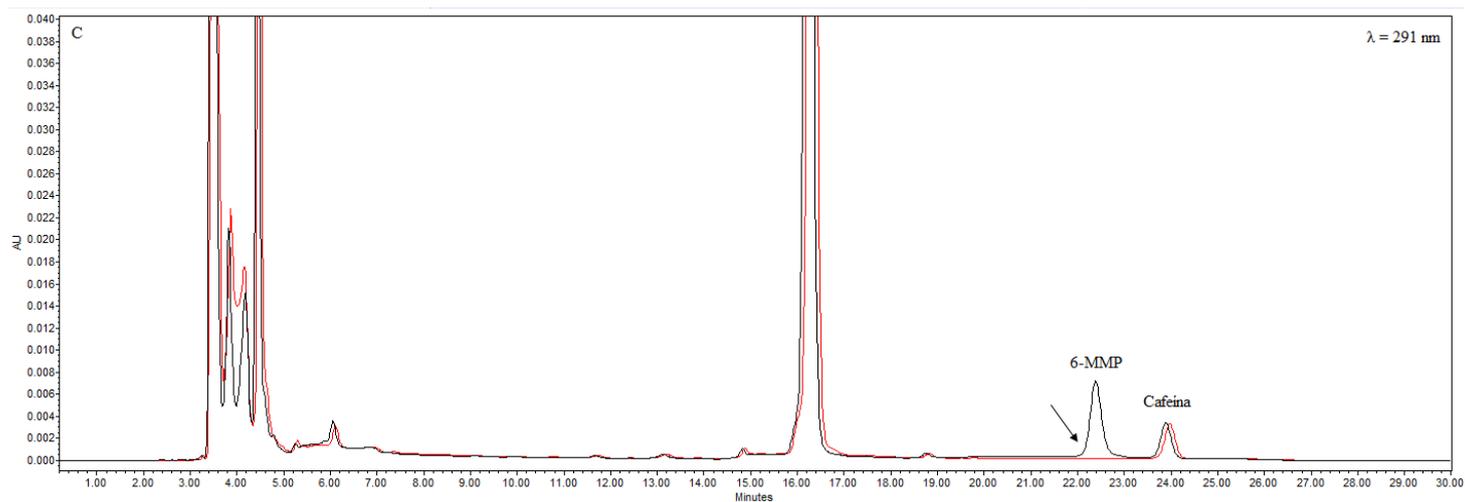
As concentrações de 6-TGN e 6-MMP foram determinadas para todos os pacientes do estudo. Os resultados encontrados nas análises das amostras variaram de 4,51 a 1515,27 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos para a 6-TGN e de 169,98 a 53951,53 pmol/8 x

10^8 eritrócitos para a 6-MMP. A concentração média de 6-TGN foi de 540,51 pmol / 8×10^8 eritrócitos e de 7952,32 pmol / 8×10^8 eritrócitos para o 6-MMP.

Cromatogramas de amostra matriz (brancos), amostras de alguns pacientes em uso de azatioprina e amostras adicionadas com padrões são apresentados na figura 10.

Figura 10: Cromatogramas de papas de hemácias com metabólitos e PI





Nota: FM: tampão fosfato:ACN:MeOH, eluição por gradiente; Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40°C; Injeção: 30 μ L

A: amostra de papa de hemácias com solução padrão 6-TGN 5 μ g/mL e matriz, $\lambda = 342$ nm.

B: amostra de papa de hemácias do paciente e matriz, $\lambda = 342$ nm.

C: amostra de papa de hemácias com solução padrão 6-MMP 3 μ g/mL e matriz, $\lambda = 291$ nm.

D: amostra de papa de hemácias do paciente e matriz, $\lambda = 291$ nm.

Fonte: dados da pesquisa.

Quadro 5: Dosagens bioquímicas, hematológicas e dos metabolitos da AZA dos pacientes

Id. Paciente	Sexo	Medicamentos	6-TGN (pmol/8x10⁸RBC)	6-MMP (pmol/8x10⁸RBC)	TGO / AST	TGP / ALT	PCR (mg/dL)	Leucometria Global (mm³ ou µL)	Linfócitos (%)	Plaquetas (mm³ ou µL)	Hemácias (milhões/mm³)	Hemoglobina (g/dL)
1	F	AZA 75mg ALO 100mg	2455,75	476,74	20	14	6,0	2.940	32	120.000	2,93	10,60
2	M	AZA 175mg	503,43	753,59	14	15	2,0	5.597	35	255.800	4,96	13,92
3	F	AZA 75mg ALO 100mg	340,66	362,34	106	67	5,0	5.708	25	181.000	3,94	12,40
4	F	AZA 25mg	154,25	211,97	25	33	2,4	4.811	45	156.000	4,04	12,40
5	M	AZA 200mg	43,69	226,13	23	14	*	6.890	35	285.000	5,09	11,20
6	F	AZA 200mg	161,79	2985,53	18	15	8,0	*	30	306.000	*	13,70
7	F	AZA 25mg ALO 100mg	49,03	213,29	13	13	5,0	6.666	28	252.400	6,67	12,70
8	F	AZA 200mg	470,62	2232,61	16	17	16,8	7.390	31	239.000	4,09	13,20
9	F	AZA 150mg	562,69	23992,88	27	24	6,0	5.860	25	292.000	4,53	13,40
10	F	AZA 150mg	564,97	623,45	14	14	2,7	5.228	27	197.000	4,40	14,30
11	F	AZA 150mg	484,20	1546,27	*	*	*	5.300	27	228.000	4,49	13,20
12	F	AZA 150mg	342,61	799,55	19	16	2,0	4.477	22	194.000	4,44	13,93
13	F	AZA 150mg	759,03	6526,30	11	5	0,3	4.159	22	261.000	4,04	12,34
14	M	AZA 100mg	935,39	835,51	28	23	0,4	6.855	44	156.800	5,32	16,10
15	F	AZA 100mg	89,58	169,98	24	14	3,4	5.230	33	188.000	4,51	13,90
16	M	AZA 200mg	653,19	53951,53	17	13	11,0	5.890	22	205.000	4,30	14,80
17	F	AZA 150mg	242,07	19700,56	15	16	5,0	4.754	30	249.300	3,91	12,42
18	M	AZA 100mg	356,55	3682,34	25	21	1,0	4.620	18	180.000	4,68	14,10
19	F	AZA 150mg	529,86	40298,64	16	10	7,0	7.390	21	241.000	3,99	13,50
20	F	AZA 150mg	447,30	923,77	*	*	*	*	*	*	*	*

Continua

Continuação Quadro 5

Id. Paciente	Sexo	Medicamentos	6-TGN (pmol/8x10⁸RBC)	6-MMP (pmol/8x10⁸RBC)	TGO / AST	TGP / ALT	PCR (mg/dL)	Leucometria Global (mm³ ou µL)	Linfócitos (%)	Plaquetas (mm³ ou µL)	Hemácias (milhões/mm³)	Hemoglobina (g/dL)
21	F	AZA 150mg	369,91	1421,70	18	21	4,0	8.030	21	251.000	4,12	13,10
22	F	AZA 25mg ALO 100mg	4,51	184,37	31	29	31,3	4.356	17	254.600	4,49	12,48
23	F	AZA 200mg	329,16	7287,45	26	50	11,2	5.720	21	213.000	3,19	10,10
24	F	AZA 200mg	901,93	28511,86	40	15	0,7	4.603	22	195.100	3,72	12,40
25	F	AZA 150mg	369,23	11751,30	21	24	5,0	6.230	27	215.000	3,76	12,20
26	F	AZA 125mg	563,67	620,31	14	12	52,0	6.983	21	175.800	3,91	12,78
27	F	AZA 100mg	407,18	1219,60	*	*	*	4.450	15	161.000	4,45	12,60
28	M	AZA 150mg	1515,27	1156,17	27	14	0,7	6.520	15	203.000	3,93	13,50
29	M	AZA 200mg ALO 100mg	234,80	9898,99	21	12	4,0	4.517	16	310.000	4,63	15,30
30	F	AZA 200mg	453,05	229,16	13	11	15,8	10.000	20	270.000	4,66	13,80
31	F	AZA 150mg	870,61	5885,77	21	39	1,0	5.570	20	223.000	3,92	12,00
32	F	AZA 100mg ALO 100mg	213,66	1048,51	15	15	21,0	5.718	25	220.400	4,00	12,43
33	F	AZA 200mg	1205,55	18405,26	79	119	32,0	8.650	22	274.000	4,53	14,30
34	M	AZA 150mg	1094,96	573,03	35	24	1,2	5.926	8	92.440	4,00	14,20
35	M	AZA 200mg	244,91	39808,38	22	18	0,5	4.460	38	277.000	4,84	14,59
36	F	AZA 200mg	475,49	1655,91	18	16	5,0	11.200	24	333.000	5,13	14,80
37	F	AZA 100mg	598,49	4064,98	19	26	0,2	4.960	31	269.000	4,47	14,70

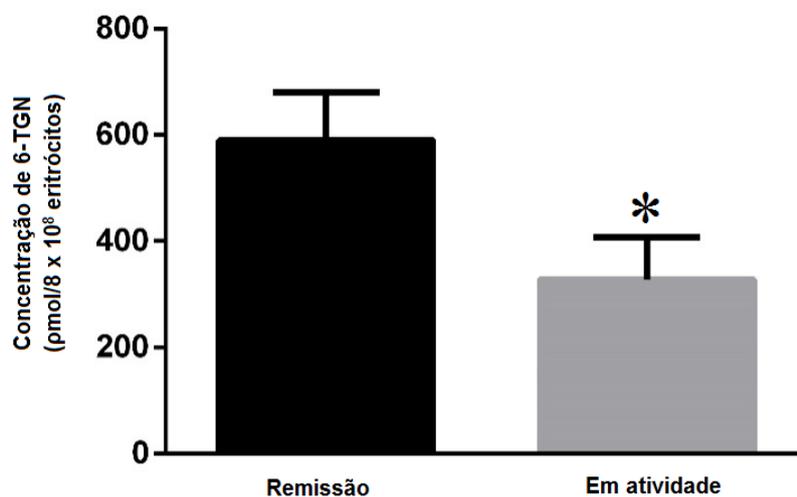
Fonte: dados da pesquisa

Nota: *: dados não obtidos; F: feminino; M: masculino; AZA: azatioprina; ALO: alopurinol.

A avaliação dos pacientes quanto à atividade ou remissão da doença, mostrou um aumento da média (teste-t, $p = 0,039$) do metabólito 6-TGN no grupo de pacientes com a doença em remissão ($n=30$, 81,1%, $590,03 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) em relação ao grupo com a doença em atividade ($n=7$, 18,9%, $328,28 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) (Figura 11).

Em relação ao metabólito 6-MMP, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com a doença em remissão ($n=30$, 81,1%, $7882,86 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) e em atividade ($n=7$, 18,9%, $8249,97 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) (Tabela 11).

Figura 11: Avaliação dos pacientes quanto à atividade ou remissão da doença, relacionada à concentração do metabólito 6-TGN ($p=0,039$)



Fonte: dados da pesquisa

Quadro 6: Valores dos metabólitos relacionados à atividade ou remissão da DC

Metabólito	Doença em Atividade	N	Média	Erro Padrão da Média
6-TGN	Não	30	590,03	90,29
	Sim	7	328,28	78,44
6-MMP	Não	30	7882,86	2402,69
	Sim	7	8249,97	5558,72

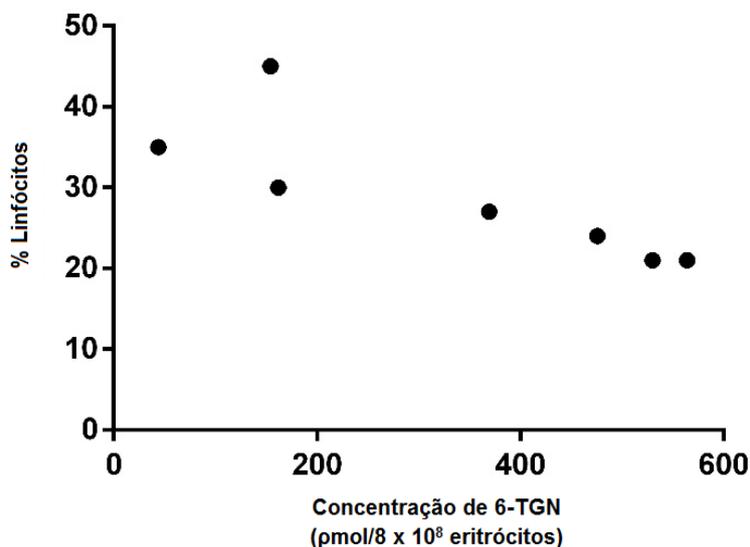
Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptipurina.

Fonte: dados da pesquisa

No grupo de pacientes foi observada a doença em atividade ($n=7$), foi encontrada uma correlação negativa (teste de Pearson, $r = -83,7\%$, $p<0,05$) entre

contagem de linfócitos e concentração de 6-TGN (Figura 12). Já no grupo de pacientes com a doença em remissão (n=30), não foi encontrada tal correlação.

Figura 12: Avaliação da contagem de linfócitos e da concentração de 6-TGN nos pacientes com doença em atividade

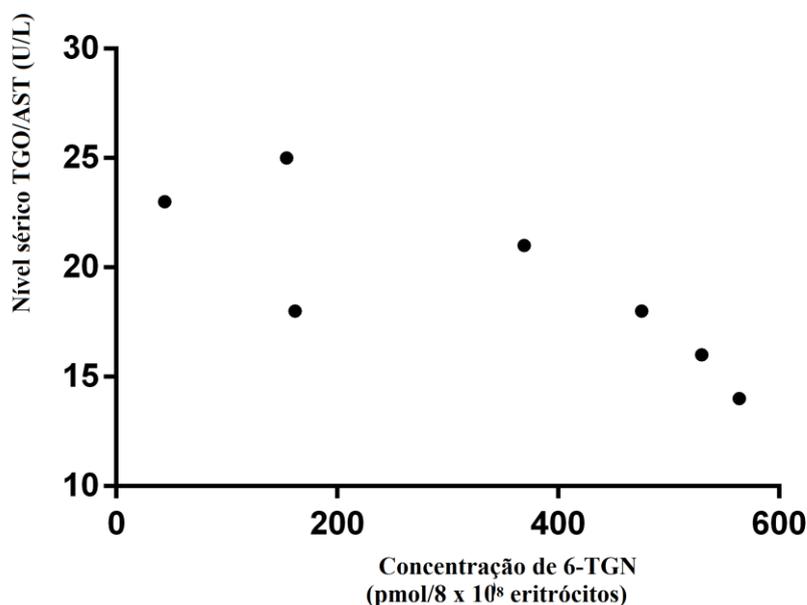


Fonte: dados da pesquisa

Avaliando o grupo de pacientes com a doença em atividade (n=7), observa-se uma correlação negativa da 6-TGN com TGO/AST, apesar desta enzima hepática estar dentro dos valores clínicos de referencia. Sendo a concentração média de 6-TGN para estes pacientes de 328,28 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos (intervalo 4,51 – 1515,27 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) (Figura 13 e Tabela 9).

Para a 6-MMP, a média nestes pacientes foi de 7952,32 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos (intervalo 169,98 – 53951,53 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), não sendo observada correlação com os valores da transaminase TGO/AST.

Figura 13: Avaliação dos níveis séricos de transaminases (TGO/AST) e da concentração de 6-TGN nos pacientes com doença em atividade



Fonte: dados da pesquisa

Tabela 9: Valores bioquímicos e dos metabólitos da AZA em pacientes com a DC em atividade

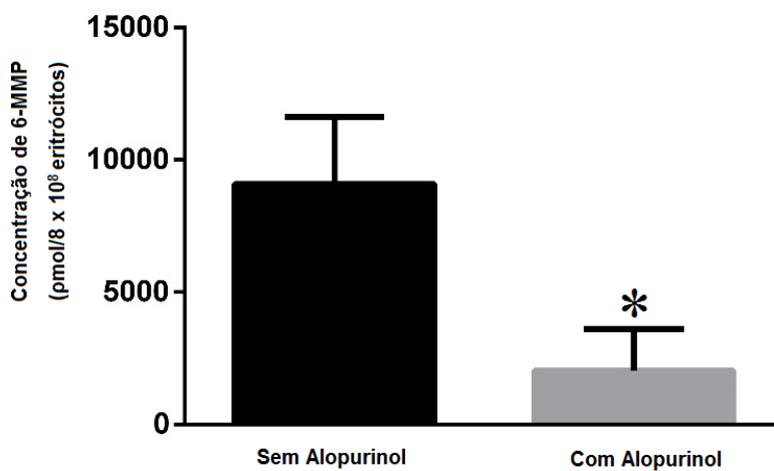
Parâmetros	N	Média	Desvio Padrão
6-TGN	7	540,51	463,72
6-MMP	7	7952,32	13250,79
TGO	7	25,03	18,61
TGP	7	23,21	20,77
PCR	6	8,170	11,32

Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptipurina; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; PCR: proteína C-reativa.

Fonte: dados da pesquisa

A avaliação dos pacientes quanto à monoterapia ou terapia combinada com alopurinol 100mg, mostrou um aumento do metabólito 6-MMP no grupo de pacientes com monoterapia (n=31; 83,7%; 9098,43 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos) em relação ao grupo com a associação terapêutica (n=6; 16,3%, 2030,71 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos), apresentando p < 0,05 (Figura 14 e Quadro 7).

Figura 14: Avaliação da concentração de 6-MMP dos pacientes tratados com AZA ou em combinação AZA + alopurinol ($p < 0,05$, Teste t)



Fonte: dados da pesquisa

Quadro 7: Valores dos metabólitos relacionados à atividade da DC

Metabólito	Associação com Alopurinol	N	Média	Erro Padrão da Média
6-TGN	Não	31	538,73	59,60
	Sim	6	549,73	384,56
6-MMP	Não	31	9098,44	2538,97
	Sim	6	2030,71	1578,87

Nota: 6-TGN: nucleotídeos 6-tioguanina; 6-MMP:6-metilmercaptipurina.

Fonte: dados da pesquisa

6. DISCUSSÃO

A AZA tem sido utilizada para o tratamento das DII por mais de 30 anos e vários ensaios randomizados-controlados quanto ao uso na DC, têm sido publicados desde a década de 70, demonstram sua eficácia na terapêutica de manutenção da doença (COLLI et al., 2008). Souza e colaboradores (2014) mostraram que 23,6% dos doentes iniciaram a imunossupressão com AZA, onde 66,7% apresentaram eficácia terapêutica. Em outros estudos, a eficácia foi avaliada entre 40-81% dos casos (CHEBLI et al., 2007; LEITE et al., 2009).

De fato, uma das desvantagens do uso das tiopurinas é a dificuldade em avaliar a resposta clínica. No nosso estudo, a avaliação foi realizada utilizando critérios clínicos, e endoscópicos com a subjetividade inerente. A avaliação da resposta à AZA foi realizada utilizando como indicadores de resposta clínica, o índice de Harvey-Bradshaw inferior a 5 pontos, sendo uma forma mais objetiva de avaliação da resposta, a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários e quantificação e avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Apesar da amostragem pequena (n=37) e heterogênea (73% mulheres; 75,7% brancos; 54% DC ileocolônica; 35% DC íleo terminal; 48,6% fenótipo inflamatório; 27% submeteram a cirurgia e 54% apresentaram complicações), estes aspetos não nos parecem ser limitadores no nosso estudo, pois a eficácia das tiopurinas foi semelhante àquela observada em outros estudos (DUBINSKY, 2003; ANDOH, et al., 2008; BRADFORD, SHIH, 2011; SOUSA et al., 2014).

As reações adversas relacionadas ao uso da AZA são bem conhecidas e documentadas. Dezenas de trabalhos descrevem reações relacionadas principalmente aos níveis intraeritrocitários elevados de 6-TGN e 6-MMP. A mielotoxicidade é o principal efeito adverso dose-dependente relacionado à 6-TGN. No entanto, já foram observadas reações inesperadas menos frequentes, como as leucemias. Em relação à 6-MMP, o principal efeito tóxico conhecido é a hepatotoxicidade, contudo, sua relação com os níveis de 6-MMP não está completamente esclarecida. (CARVALHO et al., 2014; LIU et al., 2015; BROEKMAN et al., 2015; SHIN et al., 2016).

Estudos observacionais de pacientes com DII têm demonstrado consistentemente que pacientes com maior concentração de 6-TGN apresentam maior remissão da DC; no entanto, níveis elevados destes metabólitos estão associados ao aumento do risco de complicações da farmacoterapia, como infecção e mielossupressão.

Portanto, torna-se importante prescrever a melhor dose de AZA para maximizar a eficácia, e minimizar o risco de toxicidade (MORALES et al., 2007).

A monitorização terapêutica de fármacos (MTF/TDM) permite a individualização da dose, ao contrário da dose padronizada em mg/kg de massa corporal. Possibilita, ainda, 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 não aconteçam ou sejam reduzidas, além de identificar casos de não aderência ao tratamento.

A MTF não é indicada para todos os fármacos. Segundo Johnston e Holt (1999), para que seja necessária a monitorização terapêutica de um fármaco, esse deve preencher critérios como: a) correlação entre concentração do fármaco e efeito terapêutico; b) estreita faixa terapêutica; c) grandes diferenças metabólicas entre indivíduos; d) sucesso terapêutico difícil de ser distinguido das reações adversas.

A importância da monitorização dos níveis intraeritrocitários de 6-TGNs, com objetivo de reduzir a toxicidade dose-dependente, foi avaliada por diversos pesquisadores, demonstrando que a quantificação dos metabólitos da AZA exerce um papel importante no acompanhamento clínico de pacientes submetidos à terapia com AZA (ANDOH et al., 2008; KIM, CHOE, 2013; KIRCHHERR, SHIPKOVA, VON AHSEN, 2013).

Pacientes com deficiência da tiopurina metiltransferase (TPMT) - uma das enzimas mais importantes no metabolismo da AZA - tratados com doses usuais de AZA apresentaram níveis altos de 6-TGN. As variações enzimáticas individuais da TPMT determinam a concentração dos metabólitos, e esses determinam a eficácia e os efeitos adversos (COLLI et al., 2008; LEITE et al., 2009; KIM, CHOE, 2013). Estudos têm demonstrado uma relação de reciprocidade entre a atividade eritrocitária da TPMT e os níveis de 6-TGN eritrocitários, reforçando que a monitorização dos níveis de 6-MMP e 6-TGN pode ser usada para individualizar a terapia.

Em países como os EUA, Europa, Reino Unido e Japão, a MTF é uma prática rotineira que envolve os mais variados medicamentos, inclusive a AZA. No Brasil, ainda são poucos os laboratórios que realizam o monitoramento de fármacos, talvez devido à falta de equipados adequados, de profissionais qualificados ou ainda desconhecimento desta ferramenta. Até o presente momento, nossa pesquisa encontrou apenas três laboratórios que realizam essa rotina de monitorização no Brasil, sendo dois no estado de São Paulo e um em Minas Gerais.

A primeira metodologia descrita para a monitorização terapêutica dos níveis intraeritrocitários de 6-TGN foi desenvolvida por Lennard e Maddocks, em 1983 e serviu como base para o desenvolvimento de outros métodos e determinação dos intervalos terapêuticos no tratamento com a AZA (DERVIEUX e LENNARD, 1998).

Alguns métodos já foram descritos para dosagem da 6-TGN e 6-MMP, porém essas metodologias apresentam algumas variações entre si, como na composição dos reagentes e nas concentrações preconizadas, mas, em geral, envolvem uma hidrólise ácida, com aquecimento em banho-maria seco, para conversão dos nucleotídeos de 6-TGN e 6-MMP em suas respectivas bases livres. Em seguida, a amostra segue para uma fase de extração e separação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As concentrações obtidas são, geralmente, expressas em $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos (BINSHECK et al., 1996; DERVIEUX AND BOULIEU, 1998; OLIVEIRA et al., 2004; STEFAN et al., 2004; HAWWA et al., 2009; PACHECO-NETO, 2010; KIRCHHERR et al., 2013; NAIK E NANDIBEWOOR, 2013; VICHA et al., 2015).

Nesse contexto, nosso trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para a quantificação dos metabólitos intraeritrocitários, 6-MMP e 6-TGN, da azatioprina, permitindo a avaliação das concentrações desses metabólitos, as correlações das concentrações intraeritrocitárias em pacientes tratados com AZA ou AZA associada com alopurinol, e a avaliação dos efeitos terapêuticos e adversos.

Os métodos já descritos na literatura para a determinação dos metabólitos intraeritrocitários 6-TGN e 6-MMP, serviram como ponto de partida para o desenvolvimento e otimização das condições analíticas do nosso estudo. Como pode ser observado no quadro 2, a maioria desses trabalhos realiza a identificação e/ou quantificação destes metabólitos no sangue por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Durante o desenvolvimento do nosso método, a eluição isocrática foi escolhida ao invés de eluição gradiente de modo a minimizar consumo de reagentes, melhorar o processo de extração e reduzir tempo de execução das análises, sem comprometer a resolução e eficiência de método cromatográfico.

Das várias fases móveis que testamos, os tempos de retenção de 6-TGN e 6-MMP não alteraram significativamente, levando à escolha da eluição com solução tampão fosfato de potássio (0,02 mol/L, $\text{pH} \cong 3$), acetonitrila e metanol; demonstrando ser ideal para análises das tiopurinas, apresentando picos com excelentes resoluções e o mínimo de interferentes. Além disso, uma pequena porcentagem de solvente na fase

móvel foi utilizada para prevenir sobrecarga da coluna e do sistema, prolongar a vida útil das colunas e preservação do crescimento microbiano.

Para a análise de quantificação dos metabólitos intraeritrocitários, algumas substâncias foram avaliadas para a escolha do melhor padrão interno. Selecionamos a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) devido à semelhança estrutural e pelo comportamento durante as corridas, apresentando adequada e distinta eluição em relação aos metabólitos de interesse. Alguns autores trabalharam com 6-MP, 2-bromouracil ou DTT como padrões internos (KROË PLIN et al., 1998; DERVIEUX e LENNARD, 1998; STEFAN et al., 2004).

Durante o processo de hidrólise ácida dos nucleotídeos utilizando o ácido perclórico 70%, em condições severas de temperatura (100°C), os metabólitos podem sofrer oxidação em solução, por este motivo, normalmente é adicionado solução de DTT. Optamos por utilizar esse agente antioxidante, seguindo várias literaturas (KROË PLIN et al., 1998; DERVIEUX e LENNARD, 1998; STEFAN et al., 2004).

O procedimento apresentou várias dificuldades ao ser realizado, sendo o principal e mais importante a pipetagem das amostras de papa de hemácias devido à sua viscosidade. De modo a obter resultados mais precisos e exatos, alguns artifícios foram utilizados para diminuir essa dificuldade, como aquecimento das amostras e das ponteiros descartáveis em banho-maria até 35°C.

A seletividade do método foi testada inicialmente com soluções aquosas dos metabólitos e posteriormente em matriz (*pool*) com adição de padrões e sendo submetidas ao processo de extração descrito na metodologia. A eluição isocrática, por se tratar de fase móvel constante 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, com tampão fosfato (0,02 mol/L, pH \cong 3), acetonitrila e metanol foi essencial.

Os métodos desenvolvidos na década de 80 não avaliaram os níveis de 6-MMP e apresentaram intervalo linear para os níveis de 6-TGN entre 30 e 30000 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Lennard & Singleton (1992) realizaram um estudo com menor intervalo linear para 6-TGN – 30 a 900 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos – e pela primeira vez quantificaram a 6-MMP, com intervalo linear entre 300 e 3000 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Analisando outras literaturas, notamos que os resultados de linearidade para os níveis de 6-TGN, são bastante variáveis, desde valores com intervalo de 2,5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de 0,01-5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (NAIDU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2004)

Na determinação da linearidade do método, observou-se que a resposta do equipamento foi linear no intervalo da concentração de 0,89 a 29,91 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-TGN (coeficiente de correlação igual a 0,999), e de 0,90 a 30,08 $\mu\text{mol/L}$ para a 6-MMP (coeficiente de correlação igual a 0,999). Ao converter esses valores para a unidade usual ($\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), têm-se os intervalos de linearidade aproximados de 144,42 a 4853,55 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para a 6-TGN e de 146,04 a 4881,14 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para 6-MMP.

Os trabalhos realizados por Dervieux e Boulieu (1998) apresentaram intervalos lineares entre 0,25 e 50 $\mu\text{mol/L}$ para 6-TGN e entre 1,5 e 200 $\mu\text{mol/L}$ para 6-MMP, valores próximos aos avaliados no nosso estudo e, portanto, mais adequados à nossa população. Nossos resultados também foram semelhantes ao encontrado por Pacheco Neto (2010).

A sensibilidade do método está adequada às nossas análises. Os valores encontrados de LQ e LD para 6-TGN foram de 0,89 $\mu\text{mol/L}$ e 0,29 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente, enquanto que os valores encontrados para o 6-MMP foram de 0,90 $\mu\text{mol/L}$ e 0,30 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Para a 6-TGN, 82% dos pacientes apresentaram resultados acima do limite superior de linearidade (4853,55 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) testado, e foram observados também valores inferiores ao LQ que normalmente é relatado na literatura (30 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) (LENNARD & SINGLETON, 1992; NAIDU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2004).

A maioria dos trabalhos da literatura apresenta apenas os valores encontrados para o LQ ou para o LD. Dois estudos relataram ambos os parâmetros tanto para a 6-TGN quanto para a 6-MMP. No primeiro, Oliveira et al (2004) obtiveram LQ de 8 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para a 6-TGN e de 70 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para a 6-MMP, enquanto os valores para o LD foram de 3 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e de 25 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos, respectivamente. Já Dervieux & Boulieu (1998) encontraram LQ de 18 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para a 6-TGN e de 110 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos para a 6-MMP, e os valores de LD de 7 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e de 37 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrócitos, respectivamente.

Observamos que o nosso método cromatográfico é específico e sensível para determinação simultânea de concentrações dos metabólitos. No entanto, ao avaliarmos os limites de detecção e quantificação indicados em nosso estudo, observamos que são ligeiramente superiores aos apontados por outros autores, principalmente para a 6-TGN.

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 como relatado em outros trabalhos encontrados na literatura (NAIDU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2004).

No comprimento de onda de interesse (342 nm) a análise do *pool* de hemácias (matriz) não indicou nenhum composto interferente nos tempos de retenção dos metabólitos pesquisados, mesmo em amostras 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, afirmando a especificidade e sensibilidade do método cromatográfico desenvolvido (figuras 6 e 7), além de demonstrar que não há riscos de contaminação provenientes do acúmulo de resíduos de eluições anteriores, visto que nenhum pico interferente foi visualizado na matriz "branco" (papa de hemácias) nos tempos de retenção dos analitos e do PI (figura 9).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas realizadas sob as mesmas condições (FDA, 2001; BRASIL, 2012). Os resultados do nosso estudo apresentaram CV entre 5,48 e 9,23% para a 6-TGN e entre 10,48 e 10,23% para a 6-MMP. O método desenvolvido satisfaz os critérios de repetibilidade dos guias consultados, em que são aceitos CV de até 15% ou 20%, podendo ser considerado adequado às exigências das legislações nacionais e internacionais (FDA, 2001; BRASIL, 2012).

A reprodutibilidade expressa variações intralaboratoriais, como diferentes dias de análise, diferentes analistas e diferentes equipamentos e materiais (FDA, 2001; BRASIL, 2012). Os resultados das análises realizadas em diferentes dias apresentaram EPR entre 11,36 e 10,48% para a 6-TGN e entre 9,85 e 7,32% para a 6-MMP. Lennard et al. apresentaram trabalhos em que os CV da reprodutibilidade foram 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 (LENNARD, SINGLETON, 1992; DERVIEUX E BOULIEU, 1998; DERVIEUX e LENNARD, 1998; DERVIEUX et al., 2005).

A recuperação do analito variou entre 80,7 e 94,1% para a 6-TGN e entre 82,0 e 97,1% para a 6-MMP, resultados próximos a 100%. Esses são considerados adequados, já que valores de recuperações entre 70 e 120% são aceitos na maioria dos procedimentos de validação bioanalítica, desde que sejam precisos e exatos (FDA, 2001; BRASIL, 2012). É possível notar que a eficiência do processo de recuperação do método desenvolvido pelo nosso grupo é semelhante à de outros métodos encontrados na literatura (KROË PLIN et al., 1998; DERVIEUX e LENNARD, 1998; STEFAN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; DERVIEUX et al., 2005).

No método descrito por Dervieux e Bouliou (1998), 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. (2004) a recuperação média foi de 73,2% e de 97,4%, respectivamente, este tendo resultados semelhantes aos nossos. 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, semelhante ao nosso estudo e o realizado por Pacheco Neto (2010).

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica, do material e das condições de acondicionamento utilizados (BRASIL, 2012). 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 apresentaram estabilidade após ensaios de ciclos de congelamento e descongelamento ocorridos em 72 h. Em temperatura ambiente (21 a 23 °C), antes e após serem preparados de acordo com a metodologia de extração e purificação, ambos os metabólitos se mostraram estáveis por até 13 horas.

Diversos trabalhos descritos na literatura apresentam estudos de estabilidade, contudo, a comparação entre eles é prejudicada pelas diferentes condições em que foram realizados. 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 (LENNARD, SINGLETON, 1992; DERVIEUX, BOULIEU, 1998; DERVIEUX et al., 2005)

O método cromatográfico de quantificação de 6-TGN e 6-MMP em sangue total, utilizando o equipamento CLAE, apresentou uma alta especificidade em 291 nm e 342 nm, conferindo confiabilidade na quantificação dos metabólitos. A linearidade

confirma que o método é linear e possui alta sensibilidade de quantificação. É um método robusto para os critérios exigidos pelas legislações e encontra-se dentro dos valores definidos para a recuperação. Os resultados de precisão e exatidão obtidos atestam confiabilidade necessária para o uso desta metodologia em laboratórios de análises clínicas. Portanto, o método de quantificação por CLAE-UV mostrou-se preciso, exato e reprodutível, podendo ser utilizado como uma importante ferramenta na rotina de monitorização terapêutica de pacientes com DC.

Na etapa clínica de nosso estudo, investigamos a aplicação do método na quantificação de 6-TGN e 6-MMP em 37 pacientes com DC, atendidos pelo Centro de DII do Hospital Universitário HU/CAS-UFJF, que estavam em uso de AZA ou AZA associada com alopurinol, há pelo menos 3 meses. De modo geral, os resultados obtidos mostraram que os pacientes avaliados apresentam concentrações dos metabólitos dentro das faixas terapêuticas sugeridas na literatura, evidenciando a aplicabilidade do método desenvolvido nesse trabalho na realização da monitorização terapêutica em pacientes sob terapia com AZA.

A partir dos dados clínicos, endoscópicos, da aplicação do questionário realizado nas consultas (índice de Harvey-Bradshaw), da quantificação dos metabólitos intraeritrocitários e, quantificação e avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, pode se observar que ocorrência das reações adversas devido à AZA, no presente estudo, foi semelhante a relatada em estudos prévios (LEITE et al., 2009; KIM, CHOE, 2013; BROEKMAN et al., 2017). Nenhum dos pacientes apresentou neutropenia e, em geral, a terapia foi bem tolerada.

Eventos adversos significativos observados em nosso estudo (10,8% náuseas/vômitos; 70,3% dor abdominal) que poderiam levar à retirada definitiva da AZA não impediram o tratamento com este fármaco, ao contrário do que foi observado em vários estudos (variação 10% a 28%), náuseas/vômitos incoercíveis foram as causas mais frequentes de interrupção da terapia, seguidas por dor abdominal e pancreatite (COLLI et al., 2008).

Dentre os pacientes medicados com AZA, não foi observada mortalidade relacionada com o fármaco, nem efeitos secundários severos. Não ocorreu nenhum caso de malignidade, tal como tem sido constatado em alguns estudos que sugerem uma relação (controversa) entre as tiopurinas e linfoma ou outros tipos de câncer (LEITE et al., 2009). Não se verificou, igualmente, a ocorrência de nenhum caso de pancreatite

aguda, que tem sido observada em estudos numa proporção aproximada de 2% dos doentes submetidos a esta terapêutica (LEITE et al., 2009).

Apesar do metabolismo da AZA ser bastante estudado e compreendido, há uma variabilidade presente nos níveis de 6-TGN entre pacientes tratados com doses semelhantes de AZA. Isso pôde ser observado no nosso estudo, onde houve uma baixa correlação entre as doses diárias AZA (100 mg/dia a 200mg/dia) e as concentrações eritrocitárias de 6-TGN dos pacientes (4,51 a 1515,27 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos).

Morales e colaboradores (2007) documentaram uma correlação significativa, porém fraca, apesar de semelhante a outras investigações, entre a dose de AZA e os níveis de 6-TGN. Observaram também que vários pacientes tiveram um aumento mínimo de 6-TGN nos casos de aumento da dose, no entanto, seus níveis de 6-MMP também aumentaram. Sabe-se que uma pequena proporção de pacientes tem baixa ou intermediária atividade da enzima TPMT, uma das principais enzimas do metabolismo de 6MP.

Dubinsky et al. (2003) demonstraram que alguns pacientes metabolizam preferencialmente 6MP para 6-MMP, ao invés de 6-TGN, resultando no aumento de ocorrências de hepatotoxicidade. Ficando claro que fatores genéticos, como polimorfismos na TPMT, influenciam no metabolismo da AZA. Outro fator importante que pode influenciar nos níveis de 6-TGN é a adesão do paciente à prescrição médica, porém é pouco conhecido a influência da dose ocasionalmente perdida nos níveis de 6-TGN.

Os pacientes com alta atividade enzimática de TPMT, favorecem a produção de 6-MMP com concentrações reduzidas de 6-TGN. Bradford et al. (2011) demonstraram que a adição de um inibidor da enzima XO, como por exemplo, o alopurinol, pode favorecer a produção de 6-TGN sobre 6-MMP. Tal adição à terapia com AZA resultou em atividade melhorada de doença, conforme medido pelo índice parcial de Harvey Bradshaw, com a diminuição da dose de manutenção de de corticoide) e valores reduzidos de nível de enzimas.

Dubinsky (2003) realizou uma pesquisa com pacientes que tinham os metabólitos da AZA monitorados e avaliou a utilidade clínica da monitorização da 6-TGN e da genotipagem da TPMT de pacientes pediátricos com DII em tratamento com AZA. Os autores demonstraram que os níveis de 6-TGN estavam associados à resposta terapêutica, e sugeriram que a resposta a AZA poderia ser otimizada, com níveis de 6-

TGN em torno de 235 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos. (DUBINSKY, 2003; AL HADITHY et al., 2005).

O mecanismo exato da mudança dos metabólitos de tiopurina 6-MMP para 6-TGN pelo inibidor XO é desconhecido, mas pode envolver uma produção reduzida do metabólito do ácido fólico (TU) em favor dos metabólitos 6-MMP e 6-TGN. No entanto, se a inibição de XO favorece a produção de MMP e TGN, então os ribonucleotídeos de metil-mercaptopurina (6-MMPR), tóxicos, também deveriam aumentar (SPARROW et al., 2007; WITTE, GINSBERG, 2008).

O alopurinol não aumenta o nível de 6-MMP, 6-MMPR ou de sua hepatotoxicidade associada, mas principalmente desloca o metabólito para 6-TGN. Estudos relataram outras explicações não comprovadas para a alteração dos metabólitos de 6-MMP e 6-MMPR para 6-TGN pelo inibidor XO, que pode ser pela indução de outras enzimas, como a hipoxantina guanina fosforibosiltransferase e / ou de enzimas que biotransformam MMPNs, ou a inibição de co-enzimas TPMT pelo alopurinol ou seus metabólitos (SPARROW et al., 2007; WITTE, GINSBERG, 2008; CURKOVIC et al., 2013).

No nosso estudo, seis pacientes (16,3%) estavam em terapia combinada AZA e alopurinol, e foi possível observar a remissão clínica, a diminuição da dosagem de AZA e a diminuição significativa dos níveis de 6-MMP (2030,71 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos) em comparação com o grupo de pacientes sob monoterapia (9098,43 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos), confirmando os achados de vários autores sobre a inibição da enzima XO, e consequentemente a diminuição dos níveis do metabólito 6-MMP e possíveis reduções nas ocorrências de hepatotoxicidade, permitindo aos pacientes a continuidade da terapia com tiopurinas.

Nossas análises também mostraram que os pacientes com DII em remissão apresentaram níveis significativamente mais altos de 6-TGN (590,03 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos) do que aqueles com doença em atividade (328,28 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos). Osterman e colaboradores (2006), também mostraram através dos dados na meta-análise, que 62% dos pacientes estavam em remissão com níveis de 6-TGN mais altos do que aqueles com doença ativa, uma diferença de 66 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos.

Um estudo semelhante mostrou que as concentrações médias de 6-TGN foram significativamente maiores em pacientes em remissão clínica (342,8 ± 184,6 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos) do que em pacientes em atividade (232,9 ± 159,7 pmol/8 x 10⁸ eritrócitos) (ANDOH et al., 2008).

Em contraste com esses relatos, outros estudos não detectaram tal correlação entre estar em remissão e apresentar concentrações elevadas de 6-TGN (AL HADITHY et al., 2005). Goldenberg et al. analisaram 74 pacientes com DII, mas não conseguiram encontrar uma correlação entre remissão e um valor de 6-TGN $> 235 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Gupta et al. avaliaram 101 crianças e mostraram uma insignificante tendência para maiores concentrações de 6-TGN em pacientes em remissão (OSTERMAN, M. T. et al, 2006). Uma metanálise recente demonstrou que pacientes com níveis de 6-TGN acima de 230 e 260 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos apresentavam remissão clínica, enquanto que a hepatotoxicidade foi correlacionada com os níveis de 6-MMP acima de 5700 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. (KOPYLOV, BEN-HORIN, SEIDMAN 2014)

Dos paciente analisados, 32,4% tinham níveis de 6-MMP acima de 5700 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e não apresentaram hepatotoxicidade. Foi evidenciando também uma correlação fraca entre os níveis de 6-MMP e a contagem de glóbulos brancos, assim como outros achados na literatura (AL HADITHY et al., 2005)

Conforme a literatura, a faixa terapêutica recomendável de 6-TGN é de 235 a 500 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos; no entanto, o limite superior de 500 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos não está bem corroborado por dados experimentais (CURKOVIC et al., 2013; FREI et al., 2013; KOPYLOV, BEN-HORIN, SEIDMAN, 2014). Nossos achados mostraram 40,5% dos pacientes com concentrações acima desse limite. Em concordância com relatos anteriores, houve uma leve linfopenia relacionada ao aumento da concentração de 6-TGN, porém incapaz de levar a mielossupressão dos pacientes e a necessidade de suspensão da medicação. Estudos anteriores mostraram ocorrências de linfopenia em 1,5% dos pacientes (KOPYLOV, BEN-HORIN, SEIDMAN 2014).

Andoh e colaboradores (2008), em seus estudos, mostraram uma correlação significativa entre as contagens de glóbulos brancos e as concentrações de 6-TGN, as contagens foram significativamente menores em pacientes em remissão clínica ou aqueles com concentrações de 6-TGN $> 235 \mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Essas observações são consistentes com outros autores (AL HADITHY et al., 2005; KOPYLOV, BEN-HORIN, SEIDMAN 2014). Desse modo, os estudos sugerem que a contagem de glóbulos brancos pode ser útil para prever concentrações de 6-TGN, mas não pode ser um fator preditivo para estar em remissão.

Outro dado observado foi a diminuição significativa da transaminase TGO/AST ($25,03 \pm 18,62 \text{ U/L}$) no grupo de pacientes que apresentavam a doença em

atividade, com os níveis de 6-TGN a 540,51 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos e de 6-MMP a 7952,32 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos. Entretanto, apesar de significância estatística, os valores de TGO/AST da maioria dos pacientes se mantiveram dentro dos valores de referência (homem até 50 U/L, mulher até 35 U/L), não sendo necessária alteração na dose da AZA (PARDINI, 2012).

Assim como outros estudos, foi possível observar uma ampla variação interindividual nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em todos os intervalos de 6-TGN (4,51 a 1515,27 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos) e de 6-MMP (169,98 a 53951,53 $\mu\text{mol}/8 \times 10^8$ eritrócitos), permanecendo, a grande maioria dos indivíduos, com os parâmetros normais (SMITH et al., 2012).

Não houve diferença estatisticamente significativa dos índices hematológicos e bioquímicos (exceto contagem de linfócitos e de TGO) com concentração de TGN ou com qualquer outro grupo.

Apesar do pequeno número de pacientes avaliados, nosso estudo mostrou que o método cromatográfico proposto é preciso, sensível e confiável para a determinação das concentrações intraeritrocitárias de 6-TGN e 6-MMP, uma vez que os valores obtidos são corroborados pela literatura científica previamente relatada. A utilização destas dosagens em estudos futuros poderá ter grande importância científica e clínica nesta área, além de ser uma ferramenta valiosa para a farmacoterapia de pacientes que utilizam a azatioprina ou a associação azatioprina + alopurinol, permitindo a individualização das doses destes fármacos.

7. CONCLUSÃO

O método analítico proposto para detecção e quantificação dos metabólitos intraeritrocitários da AZA por CLAE-UV mostrou-se específico, sensível, preciso e linear na faixa de concentração entre 0,89 – 29,91 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0,999$) para 6-TGN e entre 0,90 – 30,08 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0,999$) para 6-MMP, apresentando resultados de validação de acordo com as recomendações internacionais e vigentes no país, sendo adequado para a realização da monitorização terapêutica de rotina em pacientes com DC.

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

A potencial implantação destas análises na rotina clínica poderá se tornar uma importante ferramenta para a farmacoterapia, a qual permitirá a avaliação da eficácia da azatioprina ou da associação azatioprina com alopurinol na resolução dos efeitos adversos e/ou no resgate terapêutico nos pacientes. Além disso, o conhecimento das concentrações dos metabólitos nestes pacientes, possibilitará a personalização das doses destes fármacos, o acompanhamento dos efeitos adversos relacionados com a terapia farmacológica, o monitoramento da adesão ao tratamento e a avaliação da evolução clínica do paciente.

8. REFERÊNCIAS

- AL HADITHY, A. F. Y. et al. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. **Digestive and liver disease**, v. 37, n. 4, p. 282-297, 2005.
- AL MARUF, A.; WAN, L.; O'BRIEN, J. Evaluation of Azathioprine - Induced Cytotoxicity in an In Vitro Rat Hepatocyte System, Hindawi Publishing Corporation, **BioMed Research International**, Article ID 379748, 7 pages, 2014
- ANDOH, A. et al. Immunomodulator and inflammation Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, p. 1373–1377, 2008.
- ANVISA, Bulário Eletrônico do Medicamento IMURAN[®] comprimidos (texto de bula profissional de saúde, publicado em 26/06/2014), Laboratório Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp. Acesso em: 27 de jul de 2017
- BECHARA, C. S.; FILHO, A. L.; FERRARI, M. L. F.; ANDRADE, D. A. R.; LUZ, M. M. P.; SILVA, R. G. Caracterização de pacientes operados por DC pela classificação de Montreal e identificação de fatores preditores de sua recorrência cirúrgica. **Rev. Col. Bras. Cir.**; 42 (2): p.097-105, 2015a.
- BECHARA, C. D. S. et al. Montreal classification of patient operated for Crohn's disease and identification of surgical recurrence predictors. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 42, p. 97-104, 2015b. ISSN 0100-6991.
- BEST, W. R. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 4, p. 304-10, Apr 2006. ISSN 1078-0998.
- BINSHECK, T.; MEYER, H.; WELLHÖNER, H. H. High-performance liquid chromatographic assay for the measurement of azathioprine in human serum samples. **Journal of chromatography B: Biomedical sciences and Applications**, v. 675, n. 2, p. 287-294, 1996.
- BLAKER, P. A. et al. OC-005 novel pathway-centric analysis reveals variants associated with toxicity and response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 63, n. Suppl 1, p. A3-A3, 2014.
- BRADFORD, K.; SHIH, D. Q. Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 37, p. 4166-73, 2011. ISSN 2219-2840.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC N° 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, 22 maio 2012. ANVISA, Brasília-DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: Volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Brasília, 604 p., 2014.

BROEKMAN, M. M.; ROELOFS, H. M.; WONG, D. R.; KERSTHOLT, M.; LEIJTEN, A.; HOENTJEN, F.; PETERS, W. H.; WANTEN, G. J.; DE JONG, D. J. Allopurinol and 5-aminosalicylic acid influence thiopurine-induced hepatotoxicity in vitro. **Cell Biol Toxicol**, v. 31, n. 3, p. 161-71, 2015. ISSN 1573-6822.

BROEKMAN, M. M T. J., et al. More Dose-dependent Side Effects with mercaptopurine over Azathioprine in IBD Treatment Due to Relatively Higher Dosing. **Inflamm Bowel Dis**, v. 0, n. 0, 2017.

BRUNTON, L.L.; GOODMAN & GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BURISCH, J.; MUNKHOLM, P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 50, n. 8, p. 942-51, 2015. ISSN 1502-7708.

CARD, T. R.; LANGAN, S. M.; CHU, T. P. Extra-Gastrointestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease May Be Less Common Than Previously Reported. **Dig Dis Sci**, 2016. ISSN 1573-2568.

CARVALHO, A. T. et al. Thiopurine-methyltransferase variants in inflammatory bowel disease: prevalence and toxicity in Brazilian patients. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 12, p. 3327-34, 2014. ISSN 2219-2840

CASS, Q.; CASSIANO, N. **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações**. Elsevier Brasil, 2015.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. EdUFSCar, 2001.

CHEBLI, J. M. et al. Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 2, p. 268-74, 2007. ISSN 0815-9319.

CHEBLI, J. M. et al. Hypertransaminasemia following withdrawal of thiopurine therapy in an ulcerative colitis patient: mind looking the small bowel! **Int J Colorectal Dis**, v. 30, n. 12, p. 1737-8, 2015. ISSN 1432-1262.

CHOUNG, R. S. et al. Serologic microbial associated markers can predict Crohn's disease behaviour years before disease diagnosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 12, p. 1300-1310, 2016. ISSN 1365-2036.

COLLI, M. V.; AMARO, T. A.; PINTO, A. L.; GABURRI, P. D.; CHEBLI, J. M.. Azathioprine toxicity in Crohn's disease: incidence, approach and course. **Rev Assoc Med Bras**. n. 54(5): p. 415-421, 2008.

CROHN, B. B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G. D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. **Mt Sinai J Med**, v. 67, n. 3, p. 263-8, 2000. ISSN 0027-2507.

CUFFARI, C. Azathioprine/6-Mercaptopurine Metabolism in Ulcerative Colitis: A Guide to Metabolite Assessment - An Evidence-Based Approach. In: **Medical Therapy of Ulcerative Colitis**. Springer New York, 2014. p. 145-151.

CURKOVIC, I. et al. Low allopurinol doses are sufficient to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease patients with inadequate thiopurine metabolite concentrations. **European journal of clinical pharmacology**, v. 69, n. 8, p. 1521-1531, 2013.

DE SOUZA, G. S. et al. Effect of azathioprine or mesalazine therapy on incidence of re-hospitalization in sub-occlusive ileocecal Crohn's disease patients. **Medical Science Monitor**, v. 19, p. 716-722, 2013.

DERVIEUX, T.; BOULIEU, R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 551-555, 1998.

DERVIEUX, T, et al. 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**. v. 51, n. 11, p: 2074-84, 2005.

DHARMASIRI, S.; DEWHURST, H.; JOHNSON, H.; WEAVER, S.; MCLAUGHLIN, S. Low dose thiopurine and allopurinol co-therapy results in significant cost savings at a district general hospital. **Frontline Gastroenterology**; v. 0, p. 1-5, 2014.

DUBINSKY, M. C. Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease. **Current gastroenterology reports**, v. 5, n. 6, p. 506-511, 2003.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. United States Department of Health and Human Service. Rockville: Food and Drug Administration, 2001.

FEKETE, S. et al. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 87, p. 105-19, 2014. ISSN 1873-264X.

FREI, P. et al. Use of Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 7, p: 1040-1048, 2013. ISSN 1007-9327.

GABURRI, P.D.; CASTRO, L. E. V. V.; FERREIRA, J. O. D.; LOPES, M. H. M.; RIBEIRO, A. M. R.; ALVES, R. A., et al. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da Doença de Crohn: um estudo de 60 casos. **Arq Gastroenterol**. 1998;4:240-6

- GEARRY, R. B.; BARCLAY, M. L. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n. 8, p. 1149-57, 2005. ISSN 0815-9319.
- GELLER, S. A.; DE CAMPOS, F. P. Crohn disease. **Autops Case Rep**, v. 5, n. 2, p. 5-8, 2015. ISSN 2236-1960.
- GISBERT, J. P.; GONZALEZ-LAMA, Y.; MATE, J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 7, p. 1518-27, 2007. ISSN 0002-9270.
- GUIDELINE, I. C. H. Harmonized Tripartite et al. Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1)**, v. 1, 2005.
- HAWWA, A. F. et al. Development and validation of an HPLC method for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma and red blood cells. **J Pharm Biomed Anal**, v. 49, n. 2, p. 401-9, 2009. ISSN 0731-7085.
- HEAD, K.; JURENKA, J. S. Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease-- pathophysiology and conventional and alternative treatment options. **Altern Med Rev**, v. 9, n. 4, p. 360-401, 2004. ISSN 1089-5159.
- ITAGAKI, M. et al. Infliximab and immunosuppressant-resistant Crohn's disease successfully treated with adsorptive granulocyte apheresis combined with prednisolone. **Case Rep Gastroenterol**, v. 6, n. 1, p. 118-23, Jan 2012. ISSN 1662-0631.
- JOHNSTON, A.; HOLT, D. W. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. **Br J Clin Pharmacol**. v. 47, p. 339:50. 1999.
- KARMIRIS, K. et al. Prevalence and Characteristics of Extra-intestinal Manifestations in a Large Cohort of Greek Patients with Inflammatory Bowel Disease. **J Crohns Colitis**, v. 10, n. 4, p. 429-36, 2016. ISSN 1876-4479.
- KIM, Mi Jin; CHOE, Yon Ho. Monitoring and safety of azathioprine therapy in inflammatory bowel disease. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 16, n. 2, p. 65-70, 2013.
- KIRCHHERR, H.; SHIPKOVA, M.; VON AHSEN, N. Improved method for therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine in whole-blood by LC/MSMS using isotope-labeled internal standards. **Therapeutic drug monitoring**, v. 35, n. 3, p. 313-321, 2013.
- KOPYLOV, U.; BEN-HORIN, S.; SEIDMAN, E. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. **Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology**, v. 27, n. 4, p. 304, 2014.

- LEE, A. U.; FARRELL, G. C. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. **Journal of hepatology**, v. 35, n. 6, p. 756-764, 2001.
- LEE, J. M.; LEE, K. M. Endoscopic Diagnosis and Differentiation of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Endosc*, v. 49, n. 4, p. 370-5, 2016. ISSN 2234-2400.
- LEITE, S. et al, Azatioprina na doença inflamatória intestinal, **Acta Med Port.**; v. 22, n. 1, pg. 33-40. 2009.
- LENNARD, L., SINGLETON, H. J. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 583, n. 1, p. 83-90, 1992.
- LIU, Y. P.; XU, H. Q.; LI, M.; YANG, X.; YU, S.; FU, W. L.; HUANG, Q. Association between Thiopurine S-Methyltransferase Polymorphisms and Azathioprine-Induced Adverse Drug Reactions in Patients with Autoimmune Diseases: A Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144234, 2015. ISSN 1932.
- MARINEATA, A. et al. Extra intestinal manifestations and complications in inflammatory bowel disease. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 118, n. 2, p. 279-88, 2014. ISSN 0048-7848.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 184, de 3 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre o Programa Farmácia Popular do Brasil. **Diário Oficial da União**, 2011.
- MISDAQ, M. et al. Thiopurines induce oxidative stress in T-lymphocytes: a proteomic approach. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 434825, 2015. ISSN 1466-1861.
- MORALES, A.; SALGUTI, S.; CHUAN L. MIAO; LEWIS, J. D. Relationship Between 6-Mercaptopurine Dose and 6-Thioguanine Nucleotide Levels in Patients With Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 4, p: 380 –385, 2007.
- MULDER, D. J. et al. A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. **J Crohns Colitis**, v. 8, n. 5, p. 341-8, 2014. ISSN 1873-9946.
- NAIDU et al. Validated stability-indicating rp-hplc assay method for azathioprine in pharmaceutical dosage form according to ich guidelines. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 10, p: 301-307, 2014. ISSN- 0975-1491.
- NAIK, K. M.; NANDIBEWOOR, S. T. RP-HPLC Method for the Estimation of 6-Mercaptopurine in spiked human plasma and pharmaceutical formulations. **Journal of analytical chemistry**, v. 68, n. 12, p. 1085-1088, 2013.
- NO SUS–CONITEC, Incorporação de Tecnologias. Abatacepte para o tratamento da Artrite Reumatoide Moderada a Grave–1ª linha de tratamento com biológicos após falha a MMCDs sintéticos. 136, 2014.

OLIVEIRA, B. M. et al. An improved HPLC method for the quantitation of 6-mercaptopurine and its metabolites in red blood cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 5, p. 649-58, 2004. ISSN 0100-879X.

OSTERMAN, M. T. et al. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1047-1053, 2006.

PACHECO NETO, M. et al. Monitorização terapêutica da azatioprina: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 3, p. 161-167, 2008.

PACHECO NETO, M. P. **Desenvolvimento de metodologia para monitorização terapêutica da azatioprina por cromatografia líquida de alta eficiência-UV (HPLC-UV) em transplantados renais**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

PACHECO NETO, M. P. et al. Pharmacokinetics of 6-thioguanine nucleotide and 6-methyl-mercaptopurine in a case of inadvertent combination therapy of azathioprine with allopurinol. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. suppl. 1, p. 14-17, 2012.

PAPACOSTA, N. G.; NUNES, G. M.; PACHECO, R. J.; CARDOSO, M. V.; GUEDES, V. R.. Doença de Crohn: um artigo de revisão. **Revista de Patologia do Tocantins**, 4(2): 25-35, 2017.

PARDINI, H. Manual de Exames—Laboratório Hermes Pardini. v. 15, 2012. Disponível em: <http://www.hermespardini.com.br>, acesso em 04 agosto 2017.

PARIENTE, B.; LAHARIE, D. Review article: why, when and how to de-escalate therapy in inflammatory bowel diseases. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 338-353, 2014. ISSN 1365-2036.

PEREIRA, C. et al. DNA Damage and Oxidative DNA Damage in Inflammatory Bowel Disease. **J Crohns Colitis**, 2016. ISSN 1876-4479

PETIT, E; LANGOUET, S; AKHDAR, H; NICOLAS-NICOLAZ, C; GUILLOUZO, A; MOREL, F. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, n.22, p.632–642, 2008. ISSN 0887-2333.

PICHE, T. et al. Impact of functional bowel symptoms on quality of life and fatigue in quiescent Crohn disease and irritable bowel syndrome. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 6, p. 626-e174, 2010. ISSN 1365-2982.

PIZZI, M. et al. Gastrointestinal Crohn-like disease following BCG therapy. **Int J Colorectal Dis**, v. 30, n. 12, p. 1745-6, 2015. ISSN 1432-1262

PREFONTAINE, E. et al. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2009. ISSN 1465-1858.

RAZA, M. et al. A comparison of hepatoprotective activities of aminoguanidine and N-acetylcysteine in rat against the toxic damage induced by azathioprine. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 134, n. 4, p. 451-6, 2003. ISSN 1532-0456.

ROMAN, M. et al. Validation of a genotyping method for analysis of TPMT polymorphisms. **Clin Ther**, v. 34, n. 4, p. 878-84, 2012. ISSN 1879-114X.

SHEPHERD, S. **The low-FODMAP diet cookbook : 150 simple, flavorful, gut-friendly recipes to ease the symptoms of IBS, celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, and other digestive disorders**. 2012. viii, 238 pages ISBN 9781615191918.

SHI, H. Y. et al. Low-dose azathioprine is effective in maintaining remission in steroid-dependent ulcerative colitis: results from a territory-wide Chinese population-based IBD registry. **Therap Adv Gastroenterol**, v. 9, n. 4, p. 449-56, 2016. ISSN 1756-283X.

SHIN, J. Y. et al. Thiopurine Prodrugs Mediate Immunosuppressive Effects by Interfering with Rac1 Protein Function. **J Biol Chem**, v. 291, n. 26, p. 13699-714, 2016. ISSN 1083-351X.

SHIVANANDA, S.; LENNARD-JONES, J.; LOGAN, R.; FEAR, N.; PRICE, A.; CARPENTER, L.; et al. The EC-IBD Study Group. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (ECIBD). *Gut*. 1996; 39:690-7.

SIMMONS, J.; JEWELL, D. Crohn Disease and Ulcerative Colitis. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 9780470015902.

SIMPSON, D. C. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por clae em fase reversa para a determinação do perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de *aspidosperma nitidum benth* (apocynaceae). 2013.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SMITH, M. A. et al. Optimising outcome on thiopurines in inflammatory bowel disease by co-prescription of allopurinol. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 9, p. 905-912, 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. John Wiley & Sons, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (47: 2013: São Paulo) **Recomendações da Sociedade Brasileira de**

Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica. – Barueri, SP. Manole, 2014. ISBN 978-85-786-8139-5.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles of statistics in biological research.** New York: W. H. Freeman and Company, 887p. 1995.

SOUSA, A. L. et al. Azatioprina na doença inflamatória intestinal: fatores preditivos da resposta sustentada a longo prazo. **GE Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 21, n. 4, p. 147-154, 2014. ISSN 0872-8178.

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

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

TAPNER, M. J. et al. Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury. **J Hepatol**, v. 40, n. 3, p. 454-63, 2004. ISSN 0168-8278.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, 2002.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Health Sciences Libraries - Bio-Medical Library University of Minnesota. Disponível em: <http://www-micromedexsolutions-com.ez25.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/CS/B599F9/ND_PR/Evidencexpert/ND_P/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/681954/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_AppProduct/evidencexpert/ND_T/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.DoIntegratedSearch?SearchTerm=Azathioprine&fromInterSaltBase=true&false=null&false=null&=null#>. Acesso em 31 Julho 2017.

URANGA, J. A. et al. Food, nutrients and nutraceuticals affecting the course of inflammatory bowel disease. **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 4, p. 816-26, 2016. ISSN 1734-1140.

UTHOFF, S. M. et al. Association of ulcerative colitis with the inflammatory bowel disease susceptibility locus IBD2 in non-Jewish Caucasians and evidence of genetic heterogeneity among racial and ethnic populations with Crohn disease. **Am J Med Genet**, v. 113, n. 3, p. 242-9, 2002. ISSN 0148-7299.

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

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

VIDIGAL, F. M. et al. Azathioprine is More Effective than Mesalazine at Preventing Recurrent Bowel Obstruction in Patients with Ileocecal Crohn's Disease. **Medical**

science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, v. 20, p. 2165, 2014.

WEISS, J. **Handbook of Ion Chromatography**, 3^o Volume Set, 4^a ed. Editora John Wiley & Sons, 2016. ISBN 3527651640, 9783527651641.

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

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

ZOCHOWSKA, D. et al. Determination of Concentrations of Azathioprine Metabolites 6-Thioguanine and 6-Methylmercaptopurine in Whole Blood With the Use of Liquid Chromatography Combined With Mass Spectrometry. **Transplant Proc**, v. 48, n. 5, p. 1836-9, 2016. ISSN 1873-2623.

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

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

NOME DO SERVIÇO DO PESQUISADOR

Pesquisador Responsável: Professor Jorge Willian L. Nascimento

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n – Bairro Martelos, Juiz de Fora - MG,
Departamento de Farmacologia - Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental
Universidade Federal de Juiz de Fora

CEP: 36036-330

Fone: (32) 2102-3369
99161-9120

E-mail: jorge.willian@ufjf.edu.br
alinecorrearibeiro@yahoo.com.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em CLAE-UV para monitoramento terapêutico de metabólitos da azatioprina em pacientes com doença de Crohn”**. Neste estudo, vamos avaliar os efeitos benéficos (terapêuticos) e as reações adversas do uso do medicamento AZA ou da AZA junto com o alopurinol nos pacientes com Doença de Crohn (DC).

O motivo para a realização desse estudo é o fato de que a AZA é o tratamento que seu médico escolheu para tratar sua doença, porém, como outros medicamentos, ela pode levar ao aparecimento de algumas reações adversas ou não ter o efeito esperado no tratamento de alguns pacientes. Assim, o objetivo deste estudo será avaliar se será necessária uma possível redução da dose terapêutica da AZA, quando estiver sendo usada junto com o medicamento alopurinol, o que poderá diminuir as reações adversas e

melhorar o efeito da AZA para você ou outros pacientes que também tenham Doença de Cronh.

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

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

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

A pesquisa irá contribuir para melhorar o tratamento dos pacientes com Doença de Cronh que usam AZA e possibilitará o estudo das quantidades deste medicamento e de seus derivados (metabólitos) no sangue, com o objetivo de diminuir as reações adversas.

Se você participar deste estudo, não haverá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes exclusivamente desta pesquisa, o Sr.(a) terá assegurado o direito a indenização. O Sr.(a) será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e está livre para participar ou retirar seu consentimento ou interromper a participação em qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar NÃO acarreta qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador ou pelo seu médico, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

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

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo **“Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em CLAE-UV para monitoramento terapêutico de metabólitos da azatioprina em pacientes com doença de Crohn”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

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

Juiz de Fora, _____ de _____ de 201_.

Nome e assinatura do (a) participante	Data
Prof. Dr. Jorge Willian L. Nascimento	Data
Farmacêutica Aline Corrêa Ribeiro	Data

Em caso de dúvidas sobre aos aspectos éticos deste estudo, você pode consultar o:
CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF
Hospital universitário Unidade Dom Bosco - Sala 297
CEP 36.038-330
E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

ANEXO A

Questionário clínico estruturado do índice Harvey-Bradshaw e parâmetros hematológicos, bioquímicos e metabólicos do paciente

Nome do paciente: _____

Identificação (iniciais dos nomes e sequência numérica): _____

Dados da coleta:	Uso de alopurinol () Sim dosagem: _____ () Não
Anamnese: (reações adversas)	_____ _____
Bem estar geral:	() muito bom (0 pts) () muito ruim (3 pts) () bom (1 pt) () péssimo (4 pts) () ruim (2 pts)
Dor abdominal:	() nenhum (0 pts) () leve (1 pt) () moderado (2 pts) () severo (3 pts)
Número de evacuações líquidas/dia:	() por nº de evacuação (1 pt)
Massa abdominal:	() nenhuma (0 pts) () duvidosa (1 pt) () bem definida (2 pts) () bem definida, dolorosa (3 pts)
Complicações: 1 pt por item	() artralgia () fissura anal () fístula anal () uveíte () eritema nodoso () abscesso () úlcera aftoides () pioderma gangrenoso
Pontuação total:	_____ pontos
Resultados obtidos do perfil hepático:	TGO ou AST: _____ TGP ou ALT: _____
Outros resultados obtidos:	Proteína C-reativa: _____
Resultados obtidos da avaliação hematológica:	Leucometria global: _____ Linfócitos: _____ Plaquetas: _____ Hematócrito: _____
Resultados obtidos da determinação* dos fármacos e metabólitos:	6-MMP: _____ 6-TGN: _____

Legenda: AST (Aspartato transaminase), ALT (Alanina transaminase), 6-MMP (6-metilmercaptipurina), 6-TGN (nucleotídeos 6-tioguanina)

* unidades de quantificação dos metabólitos: pmol/8 x 10⁸ hemácias

Remissão da doença: ≤ 4 pontos

Resposta terapêutica: ≤ 3 pontos

ANEXO B

Projeto de pesquisa registrado na plataforma brasil e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do hospital universitário - UFJF / MG (CEP HU-UFJF).

24/08/2016

Plataforma Brasil

Saúde



JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO Coordenador | V3.0

Sua sessão expira em: 35min 03

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: Terapia combinada de Azatioprina e Alopurinol em pacientes com Doença de Crohn: Eficácia Terapêutica e Efeitos nos Metabólitos da Tiopurina
 Pesquisador Responsável: JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO
 Contato Público: JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO
 Condições de saúde ou problemas estudados: caracteriza-se por períodos de exacerbação alternados com períodos de remissão. Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica incurável de etiologia desconhecida pode afetar qualquer segmento do tubo digestivo, associada a manifestações extraintestinais associação terapêutica AZA/ALO possibilitando contornar ou eliminar reações adversas

Descritores CID - Gerais: Doença de Crohn do intestino delgado
 Descritores CID - Específicos: Doença de Crohn do intestino delgado
 Descritores CID - da Intervenção: Doença de Crohn do intestino delgado
 Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 12/07/2016



DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF
 Cidade: JUIZ DE FORA

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5133 - Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG
 Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n
 Telefone: (32)4009-5338
 E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

Voltar

