

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E SEU
METABOLITO GLICURONÍDEO POR CL/EM EM PLASMA E FLUÍDO ORAL DE
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Pâmela Cristina Lukasewicz Ferreira

Porto Alegre, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E SEU
METABOLITO GLICURONÍDEO POR CL/EM EM PLASMA E FLUÍDO ORAL DE
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Tese apresentada por **Pâmela Cristina
Lukasewicz Ferreira** para obtenção do
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Rigon Zimmer

Porto Alegre, agosto de 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.08.2018, pela Banca Examinadora constituída por: Dr.^a Cristiane Codevilla Universidade Federal de Santa Maria– UFSM, Prof. Dr. Diogo Mirron Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Prof. Dr. Domingos Otávio D’Ávila Centro de Pesquisa Clínica do Hospital São Lucas da PUC/RS.

Dr.^a Cristiane Codevilla
Universidade Federal de Santa Maria– UFSM

Prof. Dr. Diogo Mirron
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Dr. Domingos Otávio D’Ávila
Centro de Pesquisa Clínica do Hospital São Lucas da PUC/RS.

Lukasewicz Ferreira, Pâmela Cristina
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E
SEU METABOLITO GLICURONÍDEO POR CL/EM EM PLASMA E
FLUÍDO ORAL DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS /
Pâmela Cristina Lukasewicz Ferreira. -- 2018.
150 f.
Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Coorientador: Aline Rigon Zimmer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Fluido oral. 2. Plasma. 3. LC-MS. 4. Farmacocinética. 5. Ácido micofenólico. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient. II. Zimmer, Aline Rigon, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. O autor recebeu bolsa CAPES.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich pela orientação, confiança e objetividade nesses quase 10 anos de trabalho conjunto;

À Prof^a Dr^a Aline Zimmer pela coorientação, revisão crítica, dedicação e apoio em todas as horas;

À Prof^a Dr^a Flávia Valadão Thiesen pela coorientação, apoio e ajuda em toda parte das coletas das amostras, sempre me atendendo nos momentos de dificuldade e me acalmando dizendo que tudo daria certo;

À Prof^a Dr^a Ana Maria Bergold pela amizade e discussões científicas;

Ao meu pai Luiz Carlos Pereira de Azevedo pelo exemplo, incentivo, compreensão, carinho e amor. A minha mãe, Amélia, que sempre me incentivou a estudar e buscar meus objetivos, e tenho certeza que hoje estaria muito orgulhosa das minhas conquistas. A minha irmã Stephani pela amizade, apoio e carinho em todas as horas;

Às amigas Andrea Garcia e Fernanda Salazar pelo apoio, principalmente nas horas que parecia que nada daria certo, pela colaboração no trabalho e pelos momentos de descontração;

A funcionária e amiga Inélia que estava em todas as horas disposta a ajudar no trabalho;

Aos amigos e colegas Andréia Wildner, Marcella Oliveira, Graciela Carlos e Leonardo Secretti pelos momentos de alegria e discussões científicas;

As minhas amigas Joyce e Cristiane que muitas me incentivaram quando eu achava que nada iria dar certo e por fazerem eu acreditar mais em mim;

A todos que colaboraram de alguma maneira para a conclusão desta tese e que não foram citados.

“Dream big and dare to fail.”

Norman Vaughan

RESUMO

Com o envelhecimento da população brasileira, o número de doenças crônicas vem aumentando, entre as quais se destaca a insuficiência renal. O tratamento recomendado é o transplante renal. Uma das principais preocupações do transplante é o alto risco de rejeição, por isso é necessário o uso de imunossupressores que diminuem a atividade do sistema imunológico. Um dos principais fármacos utilizado na terapia de imunossupressão é o micofenolato de mofetila (MMF), um potente inibidor seletivo, não competitivo e reversível da desidrogenase inosina-monofosfato (IMPDH) que atua inibindo a síntese de guanina, provocando uma diminuição da taxa de proliferação. Os imunossupressores estão relacionados a muitos efeitos secundários, sendo necessário um monitoramento terapêutico, a principal matriz utilizada é o plasma. Porém, o uso do fluido oral vem aumentando, por não necessitar de coleta invasiva e pessoal especializado para tal. Um método de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas (LC-MS) foi desenvolvido e validado para a determinação do ácido micofenólico (MPA) e seu metabólito glicuronideo (MPAG), em plasma e fluido oral, com precipitação de proteínas seguido de centrifugação e utilizando cetoprofeno (KET) como padrão interno (PI). Os picos foram separados em condição gradiente, com um tempo de corrida de 16 min, através de uma coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus (4.6 x 150 mm, 3.5 μ m tamanho de partícula) a 35 °C. Um íon foi utilizado para a quantificação e três íons para a confirmação de cada analito. O método foi linear para todos os analitos no intervalo de concentração de 10,0 – 500,0 ng/mL para o MPA e 30,0 – 500,0 ng/mL para MPAG, com coeficientes de correlação (r) entre 0,9925 – 0,9937 para as amostras de plasma e com r entre 0,9952 – 0,9973 para as amostras de fluido oral. O limite inferior de quantificação foi de 10,0 ng/mL para o MPA e 30,0 ng/mL para o MPAG, com parâmetros de validação dentro do preconizado. O efeito matriz foi avaliado e apresentou resultados adequados, demonstrando que ambos os procedimentos de limpeza das amostras são rápidos e confiáveis, exigindo pequenas quantidades. O método foi aplicado em amostras de pacientes transplantados renais de fluido oral e plasma usando menos pontos que usualmente. Após análise farmacocinética foi encontrado que o fluido oral pode ser uma possível matriz para ser usado no monitoramento terapêutico sendo necessário ainda mais estudos para ser aplicado na clínica. Estudos *in vitro* para medir e tentar estabelecer uma relação de permeação do MPA dentro do linfócito foram

realizados afim de correlacionar com achados nas amostras coletadas de pacientes. Após analisar as amostras dos pacientes foi encontrado que o estudo *in vitro* utilizando sangue total é que mais se aproxima dos resultados encontrados em amostras reais. Além de MPA dentro do linfócito foi também detectado MPAG, que ainda não havia sido descrito na literatura. A relação da quantidade dos dois metabólitos dentro do linfócito foi menor que 4%.

Palavras chave: fluido oral; plasma; LC-MS; ácido micofenólico; farmacocinética.

Abstract

With the aging of the population, the number of chronic diseases is increasing, standing out kidney disease. The recommended treatment for this disease is renal transplantation, which increases the patient's quality of life. The major concern with transplantation is the high risk of rejection and that is why it is necessary the use of immunosuppressive drugs to decrease the activity of the immune system. One of the main drugs used in immunosuppressive therapy is mycophenolate mofetil (MMF), a potent noncompetitive and reversible selective inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), which acts inhibiting the synthesis of guanine, producing a decrease in the proliferation rate. Immunosuppressors are related with many side effects, and therapeutic monitoring is required, the main matrix being used is plasma. However, the use of oral fluid is increasing because it does not require invasive collection or specialized personnel to perform it. A liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) method was developed and validated for the determination of mycophenolic acid (MPA) and its glucuronide metabolite (MPAG) in plasma and oral fluid. Samples were analysed after a simple protein precipitation procedure followed by centrifugation using ketoprofen (KET) as internal standard (PI). The peaks were separated under gradient condition, run time of 16 min, using an Agilent Zorbax Eclipse Plus column (4.6 x 150 mm, 3.5 μ m particle size) at 35 °C. One ion was used for quantification and three more for confirmation of each analyte. The method was linear for all analytes in the concentration range of 10.0 – 500.0 ng / mL for MPA and 30.0 – 500.0 ng/mL for MPAG, with correlation coefficients (*r*) between 0.9925 - 0.9937 for plasma samples and 0.9952 - 0.9973 for oral fluid samples. The lower limit of quantification was 10 ng / mL for MPA and 30 ng / mL for MPAG, with validation parameters within the recommended range. Matrix effect was evaluated and showed adequate results, demonstrating that sample cleaning procedure was fast and reliable, requiring small amounts of organic solvent. The method was applied to samples of oral fluid and plasma from renal transplant patients using limited sample collection. After pharmacokinetic analysis, it was found that the oral fluid might be a possible matrix to be used in therapeutic monitoring and further studies are needed to be applied in the clinic. *In vitro* studies to measure and try to establish a permeation rate of MPA lymphocyte concentration were performed in order to correlate with findings in the samples collected from patients. After analyzing patients samples, it was

found that the *in vitro* study using total blood is the one that more correlates with what was found on real samples. In addition to MPA it was also detected MPAG inside the lymphocytes, which had not yet been described yet. The quantity relation of the two metabolites inside the lymphocyte was less than 4%.

Keywords: oral fluid; Plasma; LC/MS; mycophenolic acid; pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2 – Comparação entre número de transplantados renais e hepáticos nos últimos 10 anos no Brasil. (ABTO, 2017).....	28
Figura 1.3 – Números absolutos de pacientes transplantados renais por estado em 2017.....	29
Figura 4.1 – Via Biosintética das purinas e atividade do ácido micofenólico	44
Figura 4.2 – Biotransformação do ácido micofenólico	46
Figure 6.1 – A – AUC (mg*h/L) data separate by dose (g/day) and therapeutic regimen (Tacrolimus and/or Cyclosporine) combined with MPA. B - Data from C _{max} (µg/mL) separate by dose and therapeutic regimen (Tacrolimus and/or Cyclosporine) combined with MPA.	69
Figure 6.2 – (A) Average AUC (mg*h/L) from studies (n=32) used on this paper separate by dose (g/day). (B) AUC (mg*h/L) data separate by dose (g/day) and time (months) after transplant.	71
Figure 7.1 - Representative LC-MS chromatogram (SIM mode) of the analytes MPA, MPAG and IS. (A) Oral fluid, (B) Plasma, both spiked with MPA and MPAG standards, at 100 ng/mL, and interfering drugs. (C) Sample of oral fluid (D) Sample of plasma, both from kidney-transplanted patient.	88
Figure 7.2 - Average concentration–time profile for MPA and MPAG (A) MPA in plasma, (B) MPA in oral fluid, (C) Comparison of MPA in oral fluid and plasma → plasma ← oral fluid , (D) MPAG in plasma, (E) MPAG in oral fluid, (F) Comparison of MPAG in oral fluid and plasma → plasma ← oral fluid	91
Figure 7.3 - Correlation between the mean concentrations (A and C) and AUC (B and D) of MPA and MPAG in plasma and oral fluid, between the times of 0 and 12.0 h.....	100
Figure 8.1 - Representative LC/MS chromatogram (SIM mode) of the analytes MPA, MPAG and internal standard (IS) KET. (A) Blank Lymphocytes spiked with MPA and MPAG standard at 50 ng/mL, (B) Lymphocytes isolate from renal transplanted patients.	110
Figure 8.2 - Percentage of MPA in <i>in vitro</i> permeation studies with isolated lymphocytes from healthy volunteer: Concentration x Time of exposure.....	111
Figure 8.3 – Cell viability assay after treatment with MPA for 24h. (n=3).....	112

Figura 9.1 – Fragmentação proposta para (A) MPA e (B) MPAG 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Regime de manutenção de imunossupressão recomendado para transplante de rim.....	43
Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabolitos glicuronídeos.	48
Table 6.1 – Data separate by AUC (mg*h/L), C _{max} (µg/mL), Dose (g/day), Time after transplant (months) and Therapeutic concomitant regimen used (Tacrolimus and/or Cyclosporine).	72
Table 7.1 Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), correlation coefficient (r), accuracy and precision (between-run) of MPA and MPAG in oral fluid and plasma.	89
Table 7.2 The main pharmacokinetics parameters of MPA and MPAG after an oral administration of 750 mg of MMF or EC-MPS to thirteen renal transplant patients. .	92
Table 7.3 - Demographic data and clinical parameters.....	98
Table 7.4 - Stability study of MPA and MPAG.....	99
Table 7.5 - Data of MPA and MPAG of AUC (mg*h/L) and C _{max} (µg/mL) presented on literature	100
Table 8.1 – Average rate of MPA and MPAG comparing plasma with lymphocyte levels in renal transplanted patient.	113
Tabela 9.1 - Estabilidade de MPA e MPAG em sangue total.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

ABOT Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AcMPAG Ácido micofenólico acilglicuronideo
ACN Acetonitrila
ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNI Inibidor de calcineurina
CsA Cyclosporine
EC-MPS Enteric-coated mycophenolate sodium salt
EMA European Medicines Agency
ESI Ionização por “electrospray”
FDA Food and Drug Administration
H₂O Água
LC-MS/CL-MS Cromatografia a líquido acoplada a espectrômetro de massas
LC-UV/CL-UV Cromatografia a líquido com detector de ultravioleta
LIQ Limite inferior de quantificação
IMPDH Desidrogenase inosina-monofosfato
KET Cetoprofeno
MeOH Metanol
MPA Ácido micofenólico
MPAG Glicuronídeo do ácido micofenolico
MMF micofenolato mofetil
NHS National Health Service
PI Padrão interno
Tac Tacrolimus
SUS sistema único de saúde
SPE Solid phase extraction
UPLC-MS Cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas
WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	35
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
4.1 Histórico transplantes e uso de imunossupresores	41
4.2 Ácido micofenólico	42
4.3 Métodos Analíticos	47
4.4 Validação	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
6. CAPÍTULO 1 - Parameters that can interfere on the pharmacokinetics of mycophenolic acid.....	61
6.1 Abstract	64
6.2 Introduction	65
6.3 Method	66
6.3.1 Search strategy	66
6.3.2 Data extraction and analyses	66
6.4 Results and Discussion.....	67
6.4.1 Therapeutic regimens	67
6.4.2 Pharmacokinetics.....	70
6.5 Conclusion	74
6.6 Conflicts of interest.....	74
6.7 References.....	75
7. CAPÍTULO 2 - Comparison of plasma and oral fluid concentrations of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite by LC/MS in renal transplant patients.....	79
7.1 Abstract	82
7.2 Introduction	83
7.2 Material and methods.....	83
7.2.1 Chemicals and reagents	83
7.2.2 Apparatus.....	84
7.2.3 Patient population and Ethics.....	84
7.2.4 Study design	84
7.2.5 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).....	84
7.2.6 Sample preparation and cleaning procedure	85

7.2.7 Standards solutions, analytical curves and quality controls	85
7.2.8 Bioanalytical Method Validation	86
7.2.9 Pharmacokinetic analysis	86
7.3 Results and Discussion	87
7.3.1 Bioanalytical Method Validation	87
7.3.2 Matrix effect	90
7.3.3 Pharmacokinetics analysis	90
7.4 Conclusions.....	93
7.5 Conflicts of interest.....	93
7.6 Acknowledgments	94
7.7 References.....	94
7.8 Supplementary Material	98
8. CAPÍTULO 3 - Investigation of in vitro MPA levels and compared	101
with samples from renal transplanted patients	101
8.1 Abstract.....	104
8.2 Introduction	105
8.2 Material and methods.....	106
8.2.1 Chemicals and reagents	106
8.2.2 Apparatus.....	106
8.2.3 Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)	106
8.2.4 Patient population	106
8.2.5 Preparation of reference solutions	107
8.2.6 Lymphocytes isolation, permeation protocol and cytotoxicity study.	107
8.2.7 Measurement of MPA concentrations in lymphocytes.....	108
8.2.8 Measurement of MPA concentrations in plasma	108
8.2.9 Sample preparation and cleaning procedure	108
8.2.10 Method Validation	109
8.2.11 Ethics	109
8.3 Results and discussion.....	109
8.3.1 Method validation.....	109
8.3.2 In vitro permeation study.....	110
8.3.3 Cytotoxicity test.....	112
8.3.4 Patients samples.....	112
8.4 Conclusions.....	114
8.7 References.....	115
9. DISCUSSÃO GERAL	119

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
12. ANEXOS	141

Devido ao envelhecimento da população o número de doenças crônicas vem aumentando no Brasil, destacando-se a insuficiência renal (FERREIRA; ECHER; LUCENA, 2014; PINSKY et al., 2009). Pacientes com doença renal crônica terminal necessitam de uma terapia substitutiva para sobreviver, sendo as disponíveis atualmente as diálises (hemodiálise e diálise peritoneal) e o transplante renal (FERREIRA; ECHER; LUCENA, 2014; PINSKY et al., 2009). O transplante de rim é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal em estágio terminal por aumentar a qualidade e sobrevida além de apresentar menores custos financeiros para o sistema de saúde em relação às demais terapias substitutivas (ELBARBRY; SHOKER, 2007; FERREIRA; ECHER; LUCENA, 2014; PINSKY et al., 2009; WHO, 2015).

O programa de transplante do Brasil é considerado bem desenvolvido sendo mais de 95% realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (DAVID-NETO, 2015; FERREIRA; ECHER; LUCENA, 2014). Segundo registro de 2017 da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), no ano de 2016 o Brasil estava em segundo lugar em números absolutos de transplantes renais (figura 1.1). Nos últimos 10 anos o número de transplantados renais aumentou consideravelmente, especialmente comparando com outros órgãos como fígado (figura 1.2). Mas ainda há muitos pacientes na fila de espera por um órgão, visto que a maioria dos transplantes realizados é utilizando enxerto de doador falecido (figura 1.3) (DAVID-NETO, 2015; FERREIRA; ECHER; LUCENA, 2014). O estado que realiza o maior número de transplantes renais é São Paulo, o Rio Grande do Sul encontra-se em 4 lugar tendo realizado 586 transplantes em 2017 (figura 1.3)(ABTO, 2017).

Apesar de o transplante ser o tratamento de escolha para pacientes com doença renal em estágio terminal, há o risco de rejeição, na qual o sistema imunológico reconhece o órgão transplantado como corpo estranho e reage (NHS, 2014). Para diminuir o risco de rejeição, é utilizada terapia imunossupressora após a realização do transplante (ELBARBRY; SHOKER, 2007). Além disso, Organização Mundial da Saúde considera a adesão ao tratamento um fator determinante no sucesso da terapia pós-transplante (WHO, 2015).

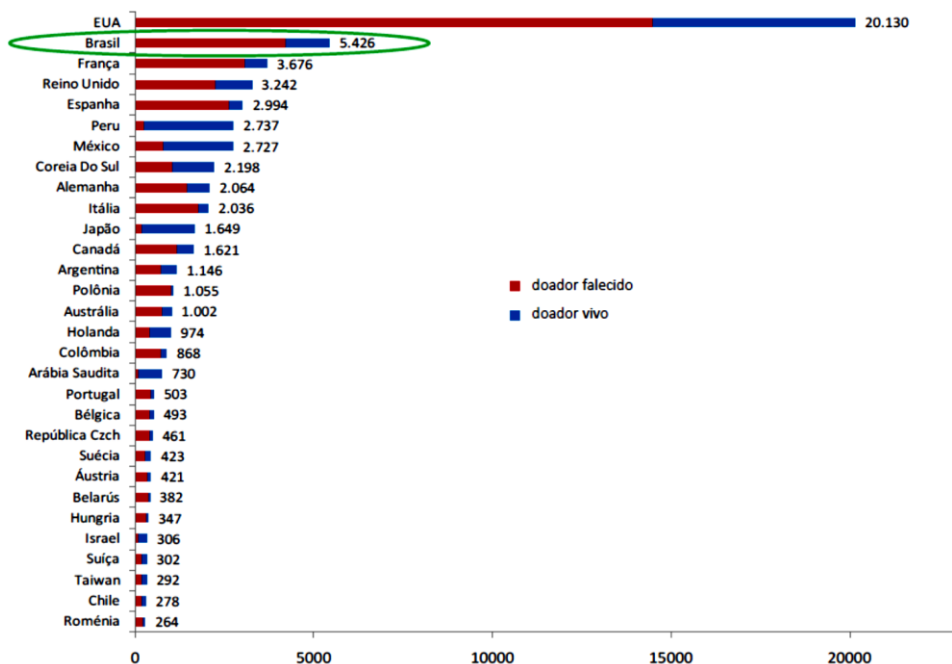


Figura 1.1 – Panorama mundial de transplante renal em números absolutos realizados em 2016. (ABTO, 2017)

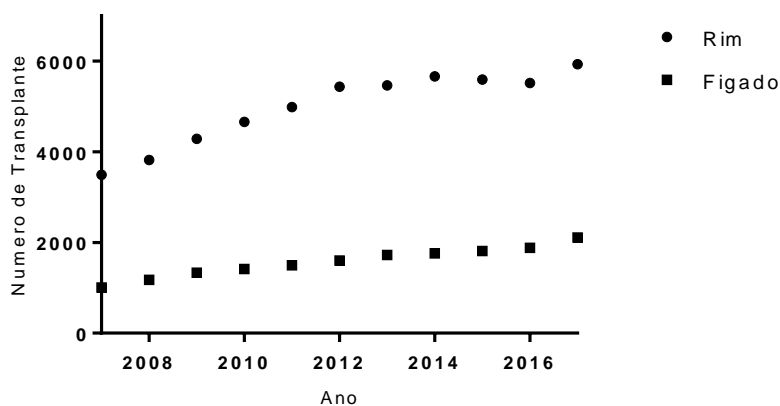


Figura 1.2 – Comparação entre número de transplantados renais e hepáticos nos últimos 10 anos no Brasil. (ABTO, 2017)

Dentre os fármacos utilizados na terapia imunossupressora destaca-se o micofenolato de mofetila (MMF) um pró-fármaco do ácido micofenólico (MPA) (ELBARBRY; SHOKER, 2007; SHUM et al., 2003). O MPA é metabolizado no fígado por uma enzima denominada uridina difosfato glicuronil-transferase formando o 7-O-glucoronídeo do MPA (MPAG), metabólito inativo, e o metabólito ativo, acilglicuronídeo (AcMPAG) (ELBARBRY; SHOKER, 2007; SHUM et al., 2003).

Imunossupressores, como o MMF, possuem janela terapêutica estreita, ou seja, exibem o efeito terapêutico desejado com tolerabilidade aceitável apenas em um pequeno intervalo de concentração sanguínea (ELBARBRY; SHOKER, 2007).

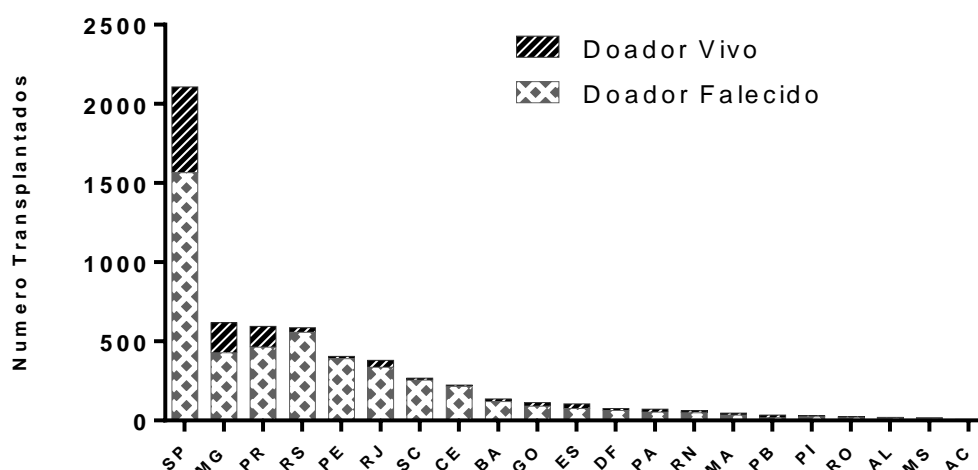


Figura 1.3 – Números absolutos de pacientes transplantados renais por estado em 2017. (ABTO, 2017)

O uso de imunossupressores leva a alguns efeitos adversos como perda de peso, dor abdominal, diarreia, crescimento de pelos, hipertrofia das gengivas, acne e sangramento (NHS, 2014). Por isso é importante o monitoramento terapêutico, a avaliação das concentrações de fármacos nos fluidos biológicos, com o objetivo de aumentar a eficácia e diminuir os efeitos tóxicos dos mesmos (KAHAN et al., 2002). Assim, o ajuste da dose para cada indivíduo é fundamental para manter níveis séricos terapêuticos sem atingir níveis tóxicos, contribuindo para o sucesso do tratamento (KAHAN et al., 2002; MADARIAGA et al., 2016).

Conhecer o perfil farmacocinético do fármaco em uso é um instrumento importante para o monitoramento terapêutico. De acordo com a guia do FDA, o estudo da farmacocinética populacional é realizado para avaliar as fontes de variabilidade entre indivíduos, que são pacientes da população alvo e que recebem doses clinicamente relevantes do medicamento de interesse (FDA, 1999). O estudo permite

identificar os fatores da variabilidade farmacocinética, explicando a diferença entre pacientes. Permite determinar o cálculo da primeira dose e da dose de manutenção no monitoramento terapêutico e pode fornecer modelos clinicamente aplicáveis (EMA, 2013; FDA, 1999). A descrição da farmacocinética de um dado fármaco na população alvo pode ser determinada pela média do comportamento farmacocinético populacional, pelos fatores que influenciam comportamento farmacocinético médio da população ou pelo grau de incerteza associado (EMA, 2013; FDA, 1999).

Já foi descrito na literatura que a farmacocinética do MPA varia com a função renal, concentração de albumina no soro, níveis de hemoglobina e utilização de outros medicamentos em associação à terapia imunossupressora (COLOM et al., 2012). Devido a esta variação, pacientes recém-transplantados terão uma concentração até 50% menor de MPA do que pacientes já transplantados e em terapia há algum tempo (COLOM et al., 2012; JEONG; KAPLAN, 2007).

Estudos farmacocinéticos já publicados não apresentam correlação entre plasma e fluido oral. Desta maneira, justifica-se a importância de um estudo farmacocinético para avaliar quanto da dose é biodisponível após sua administração oral, e relacionar os resultados obtidos de área sob a curva (ASC) plasmática com curva do fluido oral e assim tentar estabelecer uma correlação e verificar se o monitoramento terapêutico pode ser realizado utilizando-se essa segunda matriz.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar método analítico para avaliação das concentrações em plasma e fluido oral de ácido micofenólico e seu metabolito glicuronídeo em pacientes transplantados renais.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método para análise de MPA e MPAG em plasma, fluido oral e linfócitos por LC/MS.
- Determinar os níveis de MPA e MPAG no fluido oral e no plasma em diferentes tempos de coleta em pacientes transplantados renais tratados com MMF.
- Determinar a área sob a curva (ASC), C_{max} e T_{max} de MPA em plasma e fluido oral em pacientes transplantados renais tratados com MMF.
- Determinar a área sob a curva (ASC), C_{max} e T_{max} de MPAG em plasma e fluido oral em pacientes transplantados renais tratados com MMF.
- Correlacionar dados plasmáticos e com de fluido oral de MPA.
- Correlacionar dados plasmáticos e com de fluido oral de MPAG.
 - Determinar níveis de MPA intracelular por LC/MS.

3. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Pesquisas que envolvem seres humanos devem preservar a confidencialidade dos resultados encontrados bem como preocupar-se com o bem-estar dos indivíduos envolvidos. É necessário resguardar a privacidade, minimizar riscos e desconfortos, buscar benefícios e garantir a não discriminação dos voluntários. Desta forma, utiliza-se o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para informar e assegurar proteção ao participante, certificando os aspectos metodológicos e éticos mais adequados (Anexo).

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Pontífice Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS), onde serão realizadas as coletas, parecer número 2.082.466 (Anexo).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Histórico transplantes e uso de imunossupressores

Depois algumas tentativas falhas, no ano de 1954, em Boston, foi realizado o primeiro transplante renal com êxito, utilizando gêmeos idênticos, com uma técnica que é utilizada até hoje (DEL TACCA, 2004; WATSON; DARK, 2012). Após, observou-se o surgimento de uma resposta imune, sendo utilizada a radiação como tentativa de evitar essa resposta, porém sem sucesso (DEL TACCA, 2004; WATSON; DARK, 2012). Apenas a partir da década de 60 a terapia de imunossupressão farmacológica passou a ser utilizada, fazendo com que os transplantes passassem a ser uma terapêutica aplicável em maior escala. O primeiro imunossupressor utilizado foi a azatropina, um análogo das purinas menos tóxico, que age inibindo a replicação do DNA e bloqueando a proliferação dos linfócitos. (DEL TACCA, 2004; SCHWARZ et al., 2015; SILVA FILHO et al., 2015; WATSON; DARK, 2012). A azatropina, juntamente com a prednisona, elevaram em 50% o funcionamento do rim em transplantados não aparentados após cerca de um ano, uma evolução bastante significativa em uma época em que a diálise dava seus primeiros passos e ter insuficiência renal era considerado uma sentença de morte (HIBINO et al., 2016; WATSON; DARK, 2012; ZHANG et al., 2016). A introdução dos imunossupressores no tratamento pós-transplante mudou a expectativa de vida dos pacientes, sendo atualmente um tratamento aplicado mundialmente em milhares de pacientes transplantados (HIBINO et al., 2016; MADARIAGA et al., 2016; SILVA FILHO et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Hoje em dia a imunossupressão farmacológica é utilizada para todos os tipos de transplante de órgãos para evitar a rejeição do enxerto, aumentando a expectativa de vida do paciente (ELBARBRY; SHOKER, 2007; MADARIAGA et al., 2016; SCHWARZ et al., 2015).

A abordagem geral ao tratamento de transplante de órgãos deve seguir cinco princípios gerais: o primeiro deve ser a preparação do paciente e seleção criteriosa do doador como compatibilidade do grupo sanguíneo ABO e antígenos HLA. Segundo deve-se utilizar abordagem multicamadas no tratamento imunossupressor, semelhante ao utilizado no tratamento quimioterápico, buscando-se efeito sinérgico, que permite utilização dos diversos fármacos em doses relativamente menores, aumentando efeito imunossupressor e limitando os tóxicos específicos. O terceiro deve ser o grau de imunossupressão necessária para assegurar adaptação inicial do enxerto e/ou tratar rejeição estabelecida é maior do que a empregada no tratamento

imunossupressor a longo prazo. Em quarto lugar, é necessário investigar a disfunção do transplante incluindo-se a avaliação das possibilidades de rejeição, toxicidade dos fármacos e infecção, tendo em mente que esses fatores podem coexistir. Os problemas específicos de cada órgão também devem ser levados em consideração. O último e quinto critério deve ser que um agente imunossupressor deve ser reduzido ou retirado do esquema, se seus efeitos tóxicos suplantarem seus benefícios (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas abordagens para o controle da resposta aloimune tem sido muito significativa. A incidência e a intensidade da rejeição aguda têm sido reduzidas e o desenvolvimento de novos agentes imunossupressores, tais como ciclosporina, tacrolimus, micofenolato de mofetila (MMF), anticorpos monoclonais e policlonais específicos possuem papel fundamental nesta redução (MEIER-KRIESCHE, 2012; NOGUERAS et al., 2005). O primeiro dessa nova geração de imunossupressores foi a ciclosporina, que inicialmente foi desenvolvida como antifúngico, porém acabou sendo usada como imunossupressor, pois após testes clínicos diminuiu em 90-95% o risco de rejeição após um ano de transplante. A ciclosporina age inibindo a proliferação das células T (DEL TACCA, 2004; ELBARBRY; SHOKER, 2007; ZHANG et al., 2016). Os fármacos mais utilizados hoje na terapia imunossupressora renal estão relacionados na tabela 4.1 (MEDSACAPE, 2017).

4.2 Ácido micofenólico

Administrado na forma de pró-fármaco do ácido micofenólico (MPA) (micofenolotato de mofetila, MMF) ou na forma de sal (micofenolato de sódio, Myfortic®) para aumentar sua absorção, o ácido micofenólico destaca-se entre os imunossupressores mais utilizados (ELBARBRY; SHOKER, 2007; MADARIAGA et al., 2016; NOWAK; SHAW, 1995). Este fármaco é utilizado em transplantes de órgãos sólidos, na profilaxia e tratamento da rejeição em pacientes submetidos à alotransplantes renal, hepático ou cardíaco. Associado à grande redução na taxa de rejeição é mais potente que a azatioprina, porém não tão potente quanto inibidores mTOR e inibidores da calcineurina, por isso é utilizado em combinação com uma destas duas últimas classes (NOGUERAS et al., 2005; WATSON; DARK, 2012).

Tabela 4.1 – Regime de manutenção de imunossupressão recomendado para transplante de rim (ABTO, 2017; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; MEDSACAPE, 2017)

Regime Padrão de Imunossupressão		Potencial alternativa
<i>Classe farmacêutica/ mecanismo de ação</i>	<i>Agente específico</i>	
Inibidor de calcineurina (CNI)/inibe atividade da fosfatase	Tacrolimus	Tacrolimus pode ser substituído por ciclosporina ou inibidor mTOR .
Antimetabólito/inibe atividade da monofosfato inosina desidrogenase	Micofenolato de mofetila	Micofenolato pode ser substituído pelo inibidor mTOR (para pacientes intolerantes devido a toxicidade hematológica ou gastrointestinal, ou para câncer viral associado)
Antimetabólito/ inibe síntese de DNA, RNA e proteínas	Azatioprima	Micofenolato de mofetila
Corticosteroides	Prednisona (pode ou não estar presente)	
Inibidor mTOR*	Sirolimus ou everolimus	

mTOR: Proteinocinase envolvida na progressão do ciclo celular.

O MPA é um potente inibidor seletivo, não competitivo e reversível da inosina-monofosfato desidrogenase (IMPDH), inibindo a síntese de guanina, provocando diminuição da taxa de proliferação (figura 4.1). Uma taxa de proliferação lenta com alterações na glicosilação superficial das moléculas de adesão reduz, nos linfócitos, a capacidade de reconhecer e rejeitar transplantes (ELBARBRY; SHOKER, 2007).

Para garantir a segurança e eficácia dos derivados do MPA, é realizado um monitoramento terapêutico por diferentes razões. Em primeiro lugar, sabe-se que o MMF apresenta ampla variabilidade farmacocinética inter-paciente (BÖHLER et al., 2008; MEIER-KRIESCHE, 2012; SHAW et al., 2001). Estudos relataram que níveis de MPA abaixo do mínimo estão associados com aumento do risco de rejeição aguda, e que níveis elevados estão associados com o risco de toxicidade, além de efeitos adversos como aumento de infecções, distúrbios gastrintestinais, anemia e leucopenia

(ELBARBRY; SHOKER, 2007; KUYPERS et al., 2010; SHAW et al., 1998; SYED; SRINIVAS, 2016; ZHANG et al., 2016).

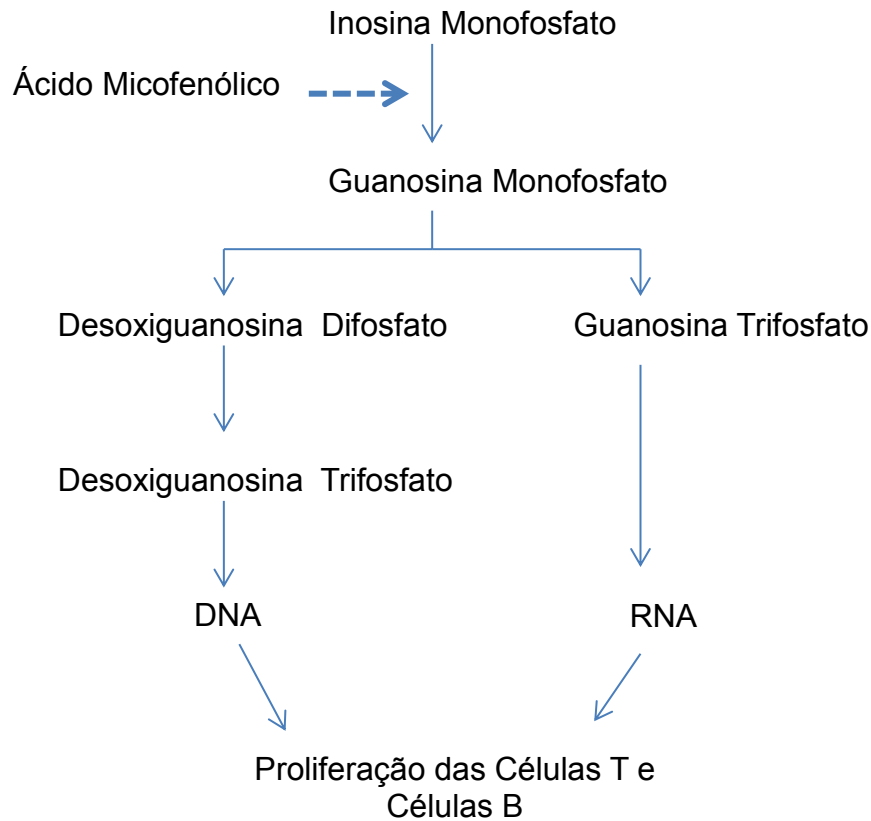


Figura 4.1 – Via Biosintética das purinas e atividade do ácido micofenólico

Após administração oral, o MMF é completamente absorvido e rapidamente hidrolisado a MPA pelas esterasas presentes na parede do estômago, fígado e possivelmente pulmões e tecidos periféricos (ELBARBRY; SHOKER, 2007). O MPA se difunde rapidamente para a circulação sistêmica, devido à completa absorção após a administração oral (MEIER-KRIESCHE, 2012). A biodisponibilidade média de uma dose oral é cerca de 90%, com elevada taxa de ligação à albumina (97%) para MPA e 82% para MPAG, sendo a concentração sérica máxima atingida cerca de 1,5 a 2,75 h após a administração do fármaco para micofenolato de sódio (Myfortic c[®]), e de 0,5 a 1,0 h para micofenolato de mofetila (CellCept[®]) (ELBARBRY; SHOKER, 2007; NOWAK; SHAW, 1995; SHAW et al., 1998, 2001). Devido a essa alta ligação a

proteínas, a fração livre disponível para atividade farmacológica é influenciada pelas condições do paciente (SHAW et al., 2001; ZHANG et al., 2016).

A metabolização do MPA ocorre no fígado, por ação da enzima uridina difosfato glicuroniltransferase (UGT), gerando o 7-O-glicuronídeo do MPA (MPAG), metabólito inativo e, em menor quantidade, o metabólito ativo acilglicuronídeo AcMPAG (figura 4.2) (KUYPERS et al., 2010; SHAW et al., 1998). O MPAG é secretado pela bile e ao ser liberado no trato gastrointestinal é hidrolisado novamente à MPA por uma glicuronidase bacteriana da microbiota intestinal, sendo uma parte reabsorvida, caracterizando a recirculação entero-hepática (CREMERS *et al.*, 2005). Devido a este fato o MPA e MPAG estão sujeitos à recirculação, a qual pode ser responsável de 10 a 60% do total da área sob a curva no intervalo de doses ($ASC_{0-12\text{ h}}$) (ALLISON E EUGUI, 2000; BULLINGHAM, NICHOLLS e KAMM, 1998; CREMERS *et al.*, 2005; KUYPERS *et al.*, 2010). A excreção biliar de MPA/MPAG e subsequente absorção e reabsorção distal envolvem diversos mecanismos, incluindo o envolvimento ativo das UGTs (ELBARBRY; SHOKER, 2007).

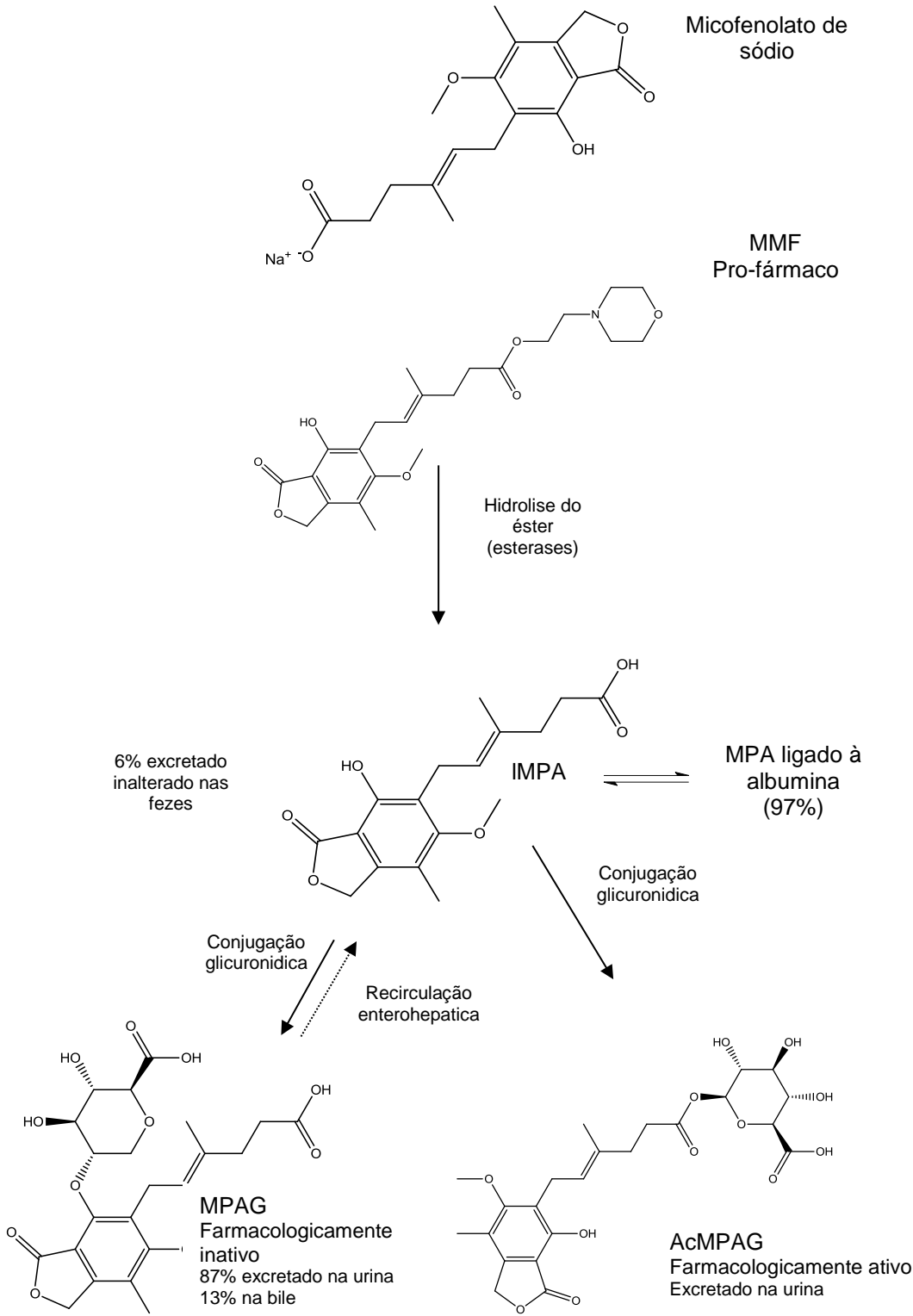


Figura 4.2 – Biotransformação do ácido micofenólico. (ELBARBRY; SHOKER, 2007)

4.3 Métodos Analíticos

Do ponto de vista analítico, a detecção do MMF pode ser realizada em plasma, fluido oral e urina através de seus metabólitos MPA, MPAG e AcMPAG. Na literatura há métodos analíticos descritos por CL-UV, LC-MS/MS, UPLC-MS/MS e CL-Fluorescência (Tabela 4.2) (ELBARBRY; SHOKER, 2007).

4.4 Validação

Validar um método analítico ou bioanalítico é o processo de documentar experimentos que desafiam o método, objetivando produzir evidências científicas e estatísticas para comprovar que suas características e desempenho são adequados e confiáveis para realização das análises pretendidas (FDA, 2018)

Há diversas guias e organizações que os publicam, como Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Existem notáveis diferenças entre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, pois quando se trabalha com matrizes biológicas espera-se uma maior variação nos resultados, tendo em vista a complexidade de extração dos analitos de suas matrizes. Os parâmetros avaliados pelas guias normalmente são semelhantes (linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e detecção, entre outros), mas pode haver algumas diferenças, como o procedimento para realizar o teste ou a forma de calcular e avaliar os resultados estatisticamente (ANVISA, 2012; EMA, 2012; FDA, 2018).

Apesar da ANVISA ter sua própria guia com recomendações algumas vezes até mais exigentes, é comum e praticamente obrigatório avaliar os parâmetros estabelecidos pela FDA ou EMA para fins de publicação. A guia da FDA foi publicada primeiramente em 2001, baseado em workshops realizados em anos anteriores (1990 e 2000). Para se adequar a algumas mudanças, a guia foi revisada e publicada novamente em 2013. Essa guia, juntamente com a da EMA (2012) foi utilizado como base para validação do método apresentado neste trabalho.

Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabólitos glicuronídeos.

Sistema	Detector	Cromatografia		Metabólito	Matrix /extração	Limite de detecção	Referência
		Fase estacionaria	Fase móvel				
LC	UV-DAD	C18	ACN: tampão fosfato 100 mM pH 3 (25:75, v/v)	MPA, MPAG	Plasma/precipitação de proteína	MPA 100 ng/mL; MPAG 1µg/mL	(INDJOVA; KASSABOVA; SVINAROV, 2005)
LC	UV-DAD	C18	50mM/L solução de fosfato de sódio pH 3: ACN (15:85, v/v)	MPA	Plasma/SPE	200 ng/mL	(DAUREL-RECEVEUR, MATHILDE TITIER <i>et al.</i> , 2006)
LC	UV	Fenil	MeOH: tampão fosfato 50 mM pH 2.5 (46:54, v/v)	MPA, MPAG	Soro/precipitação de proteína	MPA 50 ng/mL; MPAG 125 ng/mL	(BAHRAMI; MOHAMMADI, 2006)
LC	MS/MS	POROS perfusion	Metanol/H ₂ O contendo 10 mM de acetato de amônia e 0.1% ácido acético (10:90 v/v)	MPA, MPAG	Plasma/ SPE	MPA – 50 ng/mL MPAG – 100 ng/mL	(CEGLAREK <i>et al.</i> , 2006)
LC	MS/MS	C18	H ₂ O com 3 mM formiato de amônia e 0.5% ácido acético: MeOH com 3 mM formiato de amônia e 0.5% ácido acético. Eluição em gradiente	MPA, MPAG, AcMPAG	Plasma e urina/SPE	Plasma MPA – 50 ng/mL; MPAG- 50 ng/mL; AcMPAG – 10 ng/mL MPA _{free} Urina MPA – 125 ng/mL; MPAG- 50 ng/mL; AcMPAG – 100 ng/mL	(BENOIT-BIANCAMANO <i>et al.</i> , 2007)

Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabólitos glicuronídeos.

LC	MS/MS	C18	(A) 95% 5mM tampão acetato de amônio pH 3.5 (B) 95% metanol e 5% 5mM tampão acetato de amônio pH 3.5. Eluição em gradiente	MPA, MPAG	Plasma/ SPE	MPA – 0.66 µg/mL MPAG – 6.75 µg/mL	(DIFRANCESCO <i>et al.</i> , 2007)
LC	UV	C18	ACN: tampão fosfato 0.1 M pH 3 (43:57, v/v)	MPA	Plasma/precipitação de proteína	MPA 250 ng/mL	(ELBARBRY; SHOKER, 2007)
LC	MS/MS	Zorbax CN	20mM formato de amônia pH 2.5/ACN (72:28 v/v)	MPA	Monócitos de sangue periférico	0.25 ng/pellet	(BÉNECH <i>et al.</i> , 2007)
LC	UV-DAD	C18	ACN:tampão fosfato de dihidrogenio 40 mM pH 2.4 (28:72 v/v)	MPA; MPAG	Plasma e urina/ SPE	MPA 100 ng/mL; MPAG 200 ng/mL	(ZIVANOVIĆ <i>et al.</i> , 2008)
LC	UV	ODS-80Ts	Pareamento iônico ACN: brometo tetra-n-butilamonio 30 mM com 5 mM acetato de amônio pH 9.0 (33:67 v/v)	MPA; MPAG; AcMPAG	Plasma/ SPE	MPA 50 ng/mL; MPAG 125 ng/mL	(MINO <i>et al.</i> , 2008)
LC	MS/MS	C18	(A) 1mM ácido acético em agua (B) 1mM em ACN Eluição em gradiente	MPA, MPAG	Biopsia de fígado humano/precipitação de proteínas	1µM	(MOHAMED; HARVEY; FRYE, 2008)
LC	UV	ODS-80Ts	Pareamento iônico ACN: brometo tetra-n-butilamonio 30 mM com 5 mM acetato de amônio pH 9.0 (33:67 v/v)	MPA; MPAG; AcMPAG	Plasma/ SPE	MPA 50 ng/mL; MPAG 125 ng/mL	(MINO <i>et al.</i> , 2008)

Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabólitos glicuronídeos.

LC	UV-DAD	C18	ACN:tampão fosfato de dihidrogenio 40 mM pH 2.4 (28:72 v/v)	MPA; MPAG	Plasma e urina/ SPE	MPA 100 ng/mL; MPAG 200 ng/mL	(ZIVANOVIĆ <i>et al.</i> , 2008)
UPLC	UV	C8	H ₂ O 0,1% ácido fosfórico:MeOH (47.5:52.5 v/v)	MPA	DBS/liquido-liquido	MPA 0.75 µg/mL	(WILHELM <i>et al.</i> , 2009)
UPLC	MS/MS	BEH HSST3	H ₂ O:MeOH 0.1% ácido fórmico Eluição em gradiente.	MPA, MPAG	Plasma e soro/precipitação de proteína	MPA 14 ng/mL; MPAG 1.85 µg /mL	(KUHN <i>et al.</i> , 2009)
LC	MS/MS	Allure propil	PFP ACN 0.1% ácido fórmico H ₂ O 0.1% ácido fórmico Eluição em gradiente.	MPA, MPA-livre	Plasma, saliva/ precipitação de proteínas	Plasma MPA 100 ng/mL; MPA-livre 2 ng/mL; Saliva MPA 2 ng/mL	(SHEN <i>et al.</i> , 2009)
LC	MS/MS	C18	H ₂ O 0.5% ácido fórmico: MeOH:ACN. Eluição em gradient	MPA, MPA-livre, MPAG, MPAG-livre, AcMPAG	Plasma, urina e tecido/ SPE	MPA- 50n/mL MPA-livre- 1 µg/mL MPAG- 500 ng/mL MPAG-livre- 200 µg/mL /mL AcMPAG- 25 ng/mL	(FIGURSKI <i>et al.</i> , 2009)
LC	MS	C18	A) 95-5% H ₂ O MeOH com 0.1% ácido fórmico (B) MeOH com 0.1% ácido fórmico e acetato de amônia. Eluição em gradiente.	MPA, MPAG	Plasma e soro/precipitação de proteína	MPA 9 ng/mL; MPAG 4500 ng /mL	(KUHN <i>et al.</i> , 2009)

Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabólitos glicuronídeos.

UPLC	UV	C8	H ₂ O 0,1% ácido fosfórico:MeOH (47.5:52.5 v/v)	MPA	DBS/liquido-liquido	MPA 0.75 µg/mL	(WILHELM <i>et al.</i> , 2009)
LC	MS/MS	C18	0.1-0.2% ácido fórmico em H ₂ O: ACN. Eluição em gradiente.	MPA, MPAG	Plasma/SPE	MPA 1 ng/mL; MPAG 100 ng /mL	(HEINIG <i>et al.</i> , 2010)
UPLC	MS/MS	BEH	A) 95-5% H ₂ O:MeOH 0.1% ácido fórmico:(B) acetato de amônia 2 mM. Eluição em gradiente.	MPA, MPAG, AcMPAG	Plasma/precipitação de proteína	MPA 50 ng/mL; MPAG 50 ng /mL; AcMPAG 50 ng/mL	(DELAVENNE <i>et al.</i> , 2011)
LC	MS/MS	C18	Tampão metanólico	MPA e outros fármacos na terapia	Plasma/SPE	MPA- 10 ng/mL	(BUCHWALD; WINKLER; EPTING, 2012)
LC	MS/MS	C18	0.1% ácido fórmico em H ₂ O:MeOH com 0.1% ácido fórmico. Eluição em gradiente.	MPA, MPAG, AcMPAG	Plasma e urina/precipitação de proteína	MPA 98 ng/mL; MPAG 98 ng /mL; AcMPAG 156 ng/mL	(KLEPACKI <i>et al.</i> , 2012)
LC	MS/MS	C18	ACN: 0.1% ácido fórmico 50:50, v/v	MPA, MPAG	Plasma, precipitação de proteínas	saliva/ de Plasma MPA 1.6 ng/mL; MPAG 5 ng/mL; Saliva MPA 2 ng/mL; MPAG 9 ng/mL	(WIESEN <i>et al.</i> , 2012)

Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabólitos glicuronídeos.

LC	UV-DAD	C8	ACN:tampão fosfato 50mM pH 2.3 (50:50 v/v)	MPA	Dried blood sopt (DBS) e plasma/ líquido- líquido; precipitação de proteína.	MPA 250 ng/mL	(ARPINI <i>et al.</i> , 2013)
LC	MS/MS	C18	ACN 0.1% ácido fórmico: 2M acetato de amônia 0.1% ácido fórmico. Eluição em gradiente.	MPA	Células mononucleares de sangue periférico/ precipitação de proteínas	MPA – 100 ng/mL	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2013)
UPLC	MS/MS	HSS-T3	Sistema Binário 2M acetato de amônia com 0.1% ácido fórmico em água: 2M acetato de amônia 0.1% ácido fórmico. Eluição em gradiente.	MPA e outros fármacos na terapia	Plasma/precipitação de proteína	MPA – 100 ng/mL	(TSZYRSZNIC <i>et al.</i> , 2013)
UPLC	MS/MS	Fenil	H ₂ O:MeOH ambos contendo 0,1% ácido fórmico e 2M acetato de amônio. Eluição em gradient	MPA	Biopsia de transplantado renal/sólido-líquido	MPA – 0.6 ng/mL	(MD DOM <i>et al.</i> , 2014)
UPLC	MS/MS	Fenil	H ₂ O 0.1% ácido fórmico: MeOH eluído em gradiente	MPA, MPAG, AcMPAG	Plasma/precipitação de proteína	MPA 1 µg/mL; MPAG 10 µg/mL; AcMPAG 0.5 µg/mL	(ZEGARSKA <i>et al.</i> , 2015)
LC	MS/MS	C18	H ₂ O:MeOH com 0,1% ácido fórmico e 2M acetato de amônio. Eluição em gradiente	MPA, MPA-livre, MPAG, MPAG- livre, AcMPAG	Plasma/precipitação de proteína	MPA 100 ng/mL; MPAG 800 ng/mL; AcMPAG 20 ng/mL; MPA-livre 5ng/mL; MPAG-livre 500 ng/mL	(KAWANISHI <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 4.2 – Métodos de quantificação do MPA e seus metabólitos glicuronídeos.

UPLC	MS/MS	BEH C18	0.1% ácido fórmico em H ₂ O: 0.1% ácido fórmico em MeOH. Eluição em gradiente.	MPA, MPAG, AcMPAG	Plasma/precipitação de proteína	MPA 20 ng/mL; MPAG 20 ng/mL; AcMPAG 2 ng/mL.	(ZHANG; CHOW; RENBARGER, 2016)
HPLC	UV	C18	MeOH:0.1% ácido trifluracetico em agua (54:46 v/v)	MPA, MPAG	Plasma/precipitação de proteína	n.i	(XU <i>et al.</i> , 2018)

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABTO. **Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - Registro Brasileiro de Transplantes.** Sao Paulo: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/Noticias/anexo5.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2–3, p. 85–118, maio 2000.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RESOLUÇÃO - RDC Nº 27 Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.**2012
- ARPINI, J. *et al.* Clinical evaluation of a dried blood spot method for determination of mycophenolic acid in renal transplant patients. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 18, p. 1905–1908, 2013.
- BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid-liquid extraction: application to human pharmacokinetic studies. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 370, n. 1–2, p. 185–90, ago. 2006.
- BÉNECH, H. *et al.* Development and validation of an LC/MS/MS assay for mycophenolic acid in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1–2, p. 168–174, 2007.
- BENOIT-BIANCAMANO, M.-O. *et al.* Sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma and urine. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 858, n. 1–2, p. 159–167, 2007.
- BÖHLER, T. *et al.* Pharmacodynamic monitoring of the conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in stable kidney-allograft recipients. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 769–73, maio 2008.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.** 12. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011.
- BUCHWALD, A.; WINKLER, K.; EPTING, T. Validation of an LC-MS/MS method to determine five immunosuppressants with deuterated internal standards including MPA. **BMC Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 2, 11 dez. 2012.
- BULLINGHAM, R. E. S.; NICHOLLS, A. J.; KAMM, B. R. Clinical Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 34, n. 6, p. 429–455, 1998.
- CEGLAREK, U. *et al.* Inclusion of MPA and in a rapid multi-drug LC-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of immunosuppressants. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 373, n. 1–2, p. 168–71, nov. 2006.
- COLOM, H. *et al.* Clinical pharmacokinetics of mycophenolic acid and its metabolites in solid organ transplant recipients. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 661, n. 2, p. 183–201, 2012.
- CREMERS, S. *et al.* Characterizing the role of enterohepatic recycling in the interactions between mycophenolate mofetil and calcineurin inhibitors in renal transplant patients by pharmacokinetic modelling. **British journal of clinical pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 249–56, set. 2005.
- DAUREL-RECEVEUR, MATHILDE TITIER, K. *et al.* Fully Automated Analytical Method for Mycophenolic Acid Quantification in Human Plasma Using On-line Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detection. **Therapeutic Drug**

Monitoring, v. 28, n. 4, p. 505–511, 2006.

DAVID-NETO, E. **Registro Brasileiro de Transplantes**. Sao Paulo: [s.n.].

DELAVENNE, X. *et al.* UPLC MS/MS method for quantification of mycophenolic acid and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic study. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 1–2, p. 59–65, 14 jan. 2011.

DIFRANCESCO, R. *et al.* Simultaneous determination of cortisol, dexamethasone, methylprednisolone, prednisone, prednisolone, mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 859, n. 1, p. 42–51, 2007.

ELBARBRY, F. A.; SHOKER, A. S. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. **Clinical biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 752–64, jul. 2007.

EMA. **European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation** **Guideline on bioanalytical method validation** London, United Kingdom: 2012 Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>

EMA. **European Medicines Agency. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms**. London: 2013

FDA. **Guidance for Industry Population Pharmacokinetics** Rockville: 1999

FDA. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation** U.S. Department of Health and Human Services. **Anais**: 2013

FERREIRA, S. A. L.; ECHER, I. C.; LUCENA, F. A. DE. Evidence From Clinical Practice. **Nursing Diagnoses Among Kidney Transplant Recipients**, v. 25, n. 1, 2014.

FIGURSKI, M. J. *et al.* High-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy method for simultaneous quantification of total or free fraction of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 9, 2009.

HEINIG, K. *et al.* Determination of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide in human plasma, ultrafiltrate, blood, DBS and dried plasma spots. **Bioanalysis**, v. 2, n. 8, p. 1423–1435, ago. 2010.

HIBINO, S. *et al.* Pharmacokinetics of mycophenolic acid in children with clinically stable idiopathic nephrotic syndrome receiving cyclosporine. **Clinical and Experimental Nephrology**, p. 1–7, 2016.

INDJOVA, D.; KASSABOVA, L.; SVINAROV, D. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography procedure. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 817, n. 2, p. 327–330, 2005.

JEONG, H.; KAPLAN, B. Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 2, n. 1, p. 184–91, jan. 2007.

KAHAN, B. D. *et al.* Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 330–350, mar. 2002.

KAWANISHI, M. *et al.* Sensitive and validated LC-MS/MS methods to evaluate mycophenolic acid pharmacokinetics and pharmacodynamics in hematopoietic stem cell transplant patients. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1309–1316, 2015.

KLEPACKI, J. *et al.* A high-throughput U-HPLC-MS/MS assay for the quantification of mycophenolic acid and its major metabolites mycophenolic acid glucuronide and mycophenolic acid acyl-glucuronide in human plasma and urine. **Journal of chromatography. B, Analytical**

technologies in the biomedical and life sciences, v. 883–884, p. 113–9, 1 fev. 2012.

KUHN, J. *et al.* Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry assay. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 1–2, p. 83–90, jan. 2009.

KUYPERS, D. R. J. *et al.* Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 2, p. 341–358, 2010.

MADARIAGA, M. L. L. *et al.* Effect of tolerance versus chronic immunosuppression protocols on the quality of life of kidney transplant recipients. **JCI Insight**, v. 1, n. 8, p. 4062–4072, 2 jun. 2016.

MD DOM, Z. I. *et al.* Validation of an LC-MS/MS method for the quantification of mycophenolic acid in human kidney transplant biopsies. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 945–946, p. 171–7, 15 jan. 2014.

MEDSACAPE. **No Title**. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/804473_3>. Acesso em: 1 abr. 2017.

MEIER-KRIESCHE, H. Sirolimus in combination with tacrolimus is associated with worse renal allograft survival compared to mycophenolate mofetil combined with tacrolimus. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 547–556, 2012.

MINO, Y. *et al.* Development and validation of an LC/MS/MS assay for mycophenolic acid in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 47, n. 2, p. 575–585, 2008.

MOHAMED, M.-E. F.; HARVEY, S. S.; FRYE, R. F. Determination of mycophenolic acid glucuronide in microsomal incubations using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 870, n. 2, p. 251–4, 2008.

NGUYEN, T. M. T. *et al.* Mycophenolic acid quantification in human peripheral blood mononuclear cells using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clin Biochem**, v. 46, n. 18, p. 1909–1911, 2013.

NHS. **National Health Service**. Disponível em: <<http://www.nhs.uk/Conditions/kidney-transplant/Pages/risks.aspx>>. Acesso em: 5 maio. 2017.

NOGUERAS, F. *et al.* Mycophenolate Mofetil-Induced Neutropenia in Liver Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 37, n. 3, p. 1509–1511, abr. 2005.

NOWAK, I.; SHAW, L. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. **Clinical chemistry**, v. 40, n. 4, p. 307–313, 1995.

PINSKY, B. W. *et al.* Transplant outcomes and economic costs associated with patient noncompliance to immunosuppression. **American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 9, n. 11, p. 2597–606, nov. 2009.

SCHWARZ, C. *et al.* Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil, and Low-Dose Steroids with or Without Interleukin-2 Receptor Antibody Induction Therapy: A Retrospective Cohort Analysis. **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 8, p. 2446–2449, 2015.

SHAW, L. M. *et al.* Analysis , Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid. v. 31, n. 5, p. 323–328, 1998.

SHAW, L. M. *et al.* Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. **Therapeutic drug monitoring**, v. 23, n. 4, p. 305–315, 2001.

SHEN, B. *et al.* Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS

- method: Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 515–521, 2009.
- SHUM, B. *et al.* Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. **British journal of clinical pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 188–97, ago. 2003.
- SILVA FILHO, A. P. E *et al.* Evaluation of tolerability of enteric-coated mycophenolate sodium versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplantation. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 3, p. 291–296, 2015.
- SYED, M.; SRINIVAS, N. R. A comprehensive review of the published assays for the quantitation of the immunosuppressant drug mycophenolic acid and its glucuronidated metabolites in biological fluids. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 5, p. 721–748, maio 2016.
- TACCA, M. DEL. Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tools--a review. **Transplantation proceedings**, v. 36, n. 3, p. 687–9, abr. 2004.
- TSZYRSZNIC, W. *et al.* Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 9–15, jun. 2013.
- WATSON, C. J. E.; DARK, J. H. Organ transplantation: Historical perspective and current practice. **British Journal of Anaesthesia**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 29–42, 2012.
- WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/transplantation/organ/en>>. Acesso em: 2 mar. 2017.
- WIESEN, M. H. J. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva collection device. **Journal of chromatography. A**, v. 1241, p. 52–9, 8 jun. 2012.
- WILHELM, A. J. *et al.* Analysis of mycophenolic acid in dried blood spots using reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 30, p. 3916–3919, 2009.
- XU, L. *et al.* Pharmacokinetics Evaluation of Mycophenolic Acid and its Glucuronide Metabolite in Chinese Renal Transplant Recipients Receiving Enteric-coated Mycophenolate Sodium and Tacrolimus. **Therapeutic Drug Monitoring**, p. 1, maio 2018.
- ZEGARSKA, J. *et al.* Mycophenolic acid metabolites acyl-glucuronide and glucoside affect the occurrence of infectious complications and bone marrow dysfunction in liver transplant recipients. **Annals of Transplantation**, v. 20, p. 483–492, 2015.
- ZHANG, D. *et al.* Organ transplantation: Historical perspective and current practice. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 5, p. 1309–1316, 2016.
- ZHANG, D.; CHOW, D. S.-L.; RENBARGER, J. L. Simultaneous quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma by an UPLC-MS/MS assay. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 10, p. 1648–1655, 2016.
- ZIVANOVIĆ, L. *et al.* Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 3, p. 575–85, 15 jul. 2008.

6. CAPÍTULO 1 - Parameters that can interfere on the pharmacokinetics of mycophenolic acid

Artigo submetido ao Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics como mini-

review

O texto completo do capítulo 1, que na tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 63 – 77, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da revisão bibliográfica sobre fatores que podem influenciar na farmacocinética e níveis plasmático do ácido micofenólico e seu metabolito glicuronídeo. O trabalho tem como objetivo demonstrar a importância do monitoramento terapêutico na clínica, com intuito de diminuir efeitos adversos e aumentar eficácia do tratamento.

7. CAPÍTULO 2 - Comparison of plasma and oral fluid concentrations of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite by LC/MS in renal transplant patients

Artigo aceito na revista European Journal of Clinical Pharmacology

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico aceito para publicação que no texto integral, conforme referência abaixo, da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 81 – 100.

FERREIRA, P. C. L.; THIESEN, F. V.; ARAUJO, T. T.; D`AVILA, D. O.; GADONSKI, G.; OLIVEIRA, C. S. A.; ZIMMER, A. R.; FRÖEHLICH, P. E. Comparison of plasma and oral fluid concentrations of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite by LC/MS in renal transplant patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 2019. 10.1007/s00228-018-02614-9

**8. CAPÍTULO 3 - Investigation of in vitro MPA levels and compared
with samples from renal transplanted patients**

Artigo submetido ao Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

O texto completo do capítulo 3, que na tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 103– 117, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da análise in vitro e in vivo do ácido micofenólico em linfócitos e avaliação da toxicidade do mesmo.

O monitoramento terapêutico de imunossupressores é alvo de estudos que procuram avaliar diversos fatores – incluindo efeitos colaterais que variam de acordo com o paciente, concentração plasmática, concentração no fluido oral, comparação entre concentrações máximas, métodos para detecção, entre outros – para diminuir riscos de rejeição ajustando a dose em sua concentração ideal (COLOM et al., 2012; ELBARBRY; SHOKER, 2007).

O ácido micofenólico (MPA), utilizado na forma de sal sódico ou pró-fármaco, encontra-se entre os imunossupressores mais utilizados no tratamento de transplantados renais e, por isso, são necessários estudos que ajudem a estabelecer perfis farmacocinéticos adequados, através da utilização de matrizes menos invasivas, como fluido oral, para um monitoramento terapêutico mais rápido e viável, (BORDIN et al., 2015; COLOM et al., 2012; MADARIAGA et al., 2016; MENDONZA; GOHH; AKHLAGHI, 2006; SHEN et al., 2009; SHUM et al., 2003).

Na literatura são descritos inúmeros métodos para detecção do MPA e seu metabolito glicuronídeo (MPAG), com outros equipamentos, que foram utilizados como referência para desenvolver e validar método analítico de CL/EM para as matrizes de plasma e fluido oral, com objetivo de separar cromatograficamente todos os picos do MPA e MPAG com eluição no modo gradiente.

A partir da revisão, adaptou-se um método que separasse eficientemente os analitos e apresentasse boa ionização (DELAVENNE et al., 2011; KLEPACKI et al., 2012; KUHN et al., 2009; SHEN et al., 2009; WIESEN et al., 2012; ZHANG; CHOW; RENBARGER, 2016). O MPAG é uma molécula que apresenta bastante dificuldade em ionizar, devido à sua polaridade e tamanho molecular. A maioria dos métodos propostos na literatura que foram testados não apresentaram boa ionização em condições experimentais. Um método analítico com uma baixa ionização do MPAG apresentará limite de quantificação maior, o que pode prejudicar a detecção do metabolito em amostras reais. Apenas um artigo mencionou a dificuldade de ionização do MPAG, e partiu-se deste para o desenvolvimento do método proposto neste trabalho (DiFrancesco et al. 2007). O MPAG possui um pka em torno de 2,80 (Drugbank 2017), sendo o ideal para ionização trabalhar numa faixa de duas unidades acima ou duas unidades abaixo deste valor. Testou-se tampão acetato de amônia e

formato de amônia com pH de 4,0, 4,5 e 5,0 e não se obteve bons resultados, pois o MPA e MPAG apresentaram menor ionização e resolução de pico.

Todos os trabalhos analisados utilizam fase móvel com pH menor que 3,0 e, em sua maioria com *água*, acetonitrila e metanol acidificado. Partindo-se dessas informações, testou-se fase móvel com água e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, porém a ionização ainda era baixa. Acidificou-se todos os solventes da fase móvel com ácido fórmico e obtivemos uma boa ionização do MPAG com um limite de detecção de 5,0 ng/mL para MPAG e 1,0 ng/mL para MPA, para as matrizes fluido oral e plasma, respectivamente. Após outros testes conseguimos estabelecer uma melhor ionização tanto para MPA como para MPAG diluindo-os em metanol acidificado, o qual apresentou melhores resultados relativos a ionização.

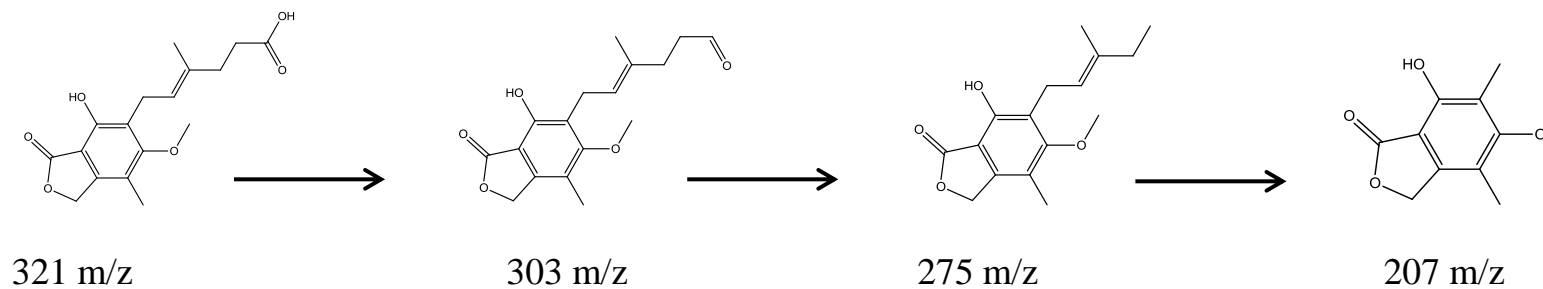
Não foi possível realizar uma eluição isocrática, pois o MPAG é uma substância mais polar e sua eluição estava bem no início da corrida. Inicialmente o MPAG eluia em menos de 2 min, o que é ruim visto que as *substâncias* não eliminadas após a extração, normal em extrações de amostras biológicas, em geral eluíam nesse tempo e isso poderia interferir nas análises utilizando detector de massas simples. Após muitos testes, foi possível estabelecer uma fase móvel em modo gradiente utilizando-se de uma maior proporção de metanol no início da corrida, obtendo-se um tempo retenção adequado para o MPAG. Porém, com uma alta concentração de metanol, os picos do MPA e PI começaram a eluir no mesmo tempo de retenção e a resolução e simetria desses picos diminuíram. Por este motivo foi feito um método em gradiente que vai diminuindo a proporção de metanol durante a corrida.

Para os dois metabolitos foi realizado o monitoramento de massas com o íon molecular e mais dois de confirmação (figura 7.1). Utilizou-se o modo positivo, pois apresentou melhor ionização e abundância quando comparado com o modo negativo além de ser utilizado em mais de 90% dos métodos já publicados. Todos os parâmetros utilizados foram otimizados utilizando o método FIA, no qual é possível realizar injeções diretas e seguidas modificando os parâmetros desejados a fim de estabelecer qual o mais adequado para cada molécula. A partir do FIA pudemos observar qual melhor fragmentação, voltagem de capilar, temperatura de gás de secagem.

Para iniciar o desenvolvimento do método de extração das amostras de fluido oral, realizaram-se diversos testes com pool de 6 doadores. O desenvolvimento do presente método para análise baseou-se nos já descritos na literatura (MENDONZA; GOHH; AKHLAGHI, 2006; SHEN et al., 2009; ZHANG; CHOW; RENBARGER, 2016) Os métodos utilizam a precipitação de proteína como principal técnica de extração do MPA e MPAG. Como agente precipitante os métodos em geral utilizam acetonitrila, porém ao tentarmos reproduzir não houve boa recuperação e percebemos que poderia ser um problema de ionização, visto que nas análises do padrão já havíamos observado que os metabólitos diluídos em acetonitrila possuem uma menor ionização. Partiu-se para extração com metanol e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico e após vários testes, incluindo volumes diferentes (100 a 400 μL), em temperatura ambiente ou gelado, sempre centrifugados a 4 °C na velocidade de 14.000 r.p.m, em tempos variando de 5 a 30 minutos. A avaliação comparativa entre as áreas dos picos e limpidez da solução após extração foi favorecida pelo uso da MeOH com 0,1% ácido fórmico a 4 °C. O melhor método utiliza 150 μL de solvente por amostra e conseguiu extrair os metabólitos do fluido oral e obter os limites de quantificação de 10,0 ng/mL para MPAG e 5,0 ng/mL para MPA, com volume de injeção de 15 μL durante a análise. Após cada dia de análise se faz necessário a limpeza da coluna com gradiente de ACN e água, por 120 minutos, e também da fonte ESI, tendo em vista que o método de precipitação não exclui completamente micropartículas e outros interferentes da matriz.

O método cromatográfico empregando CL/EM para análise de MPA e MPAG em fluido oral demonstrou ser capaz de avaliar também as amostras de plasma, utilizando-se um procedimento de extração dos metabólitos bastante semelhante em ambas às amostras biológicas, sendo apenas adicionado ao agente precipitante 0,1% (p/v) de sulfato de zinco, que demonstrou ser eficiente e melhorar a precipitação das proteínas presentes nessa matriz. Todos os parâmetros de configuração do detector

A



B

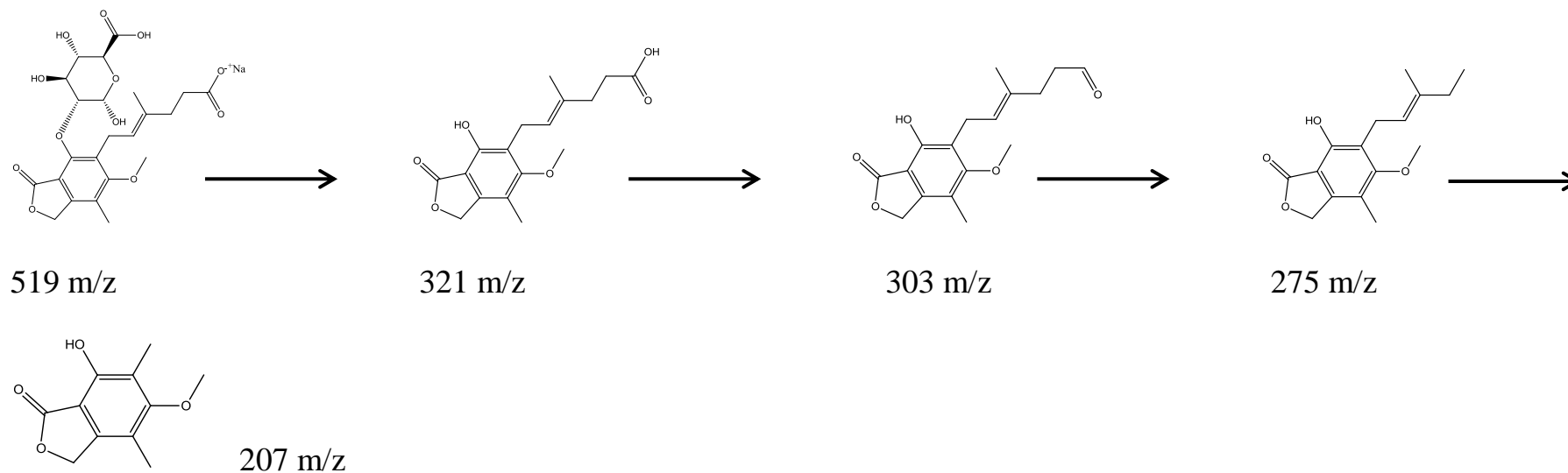


Figura 9.1 – Fragmentação proposta para (A) MPA e (B) MPAG

de massas e do cromatógrafo a líquido, incluindo coluna e fase móvel, foram mantidos iguais; porém, devido a troca da matriz biológica, modificações do processo de extração, foi necessária nova validação.

Testes de estabilidade foram realizados para as amostras de fluido oral e plasma. Os testes realizados foram de bancada, congelamento-descongelamento, curta e longa duração. Os resultados do material suplementar apresentado no capítulo 6 demonstram que os dois metabólitos, após extração, são estáveis a 20 °C (estabilidade no autoinjeter) por pelo menos 12 h. Alguns testes realizados durante o desenvolvimento do método mostraram que, se deixadas a 4 °C, as amostras após extração são estáveis por até 24 h. As amostras demonstram que são estáveis na matriz plasma e fluido oral por até 8 h. A estabilidade de curta, 3 meses, e longa duração, 6 meses, a -20 °C demonstrou resultados variáveis e não satisfatórios, o que mostra que as amostras não podem ser armazenadas por maiores períodos sem alteração de sua concentração. Na literatura há relatos de que as amostras são estáveis a -80 °C por um período maior de tempo, por isso, após coleta dos pacientes transplantados renais, as amostras serão imediatamente processadas e armazenadas nessa temperatura até análise (FIGURSKI et al., 2009).

Para testar a estabilidade dos metabólitos em sangue total foi coletado sangue de voluntários saudáveis em tubos de EDTA, adicionado solução padrão de MPA e MPAG na concentração final de 500,0 ng/mL. A análise foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75 min. Na tabela 9.1 podemos observar que no tempo 15 min já temos um decaimento bastante significativo nos dois metabólitos, sendo que o MPA apresentou o maior decaimento. Esses resultados confirmam o que já foi descrito na literatura que para análise dos metabólitos em plasma, após coleta de sangue no paciente é necessário realizar o processamento da amostra imediatamente (FIGURSKI et al., 2009). Mesmo teste foi realizado para fluido oral e nos tempos analisados, 0, 15, 30, 45, 60 e 75 min, não houve decaimento significativo das concentrações de MPA e MPAG. Porém as amostras também foram processadas assim que coletadas e refrigeradas.

Tabela 9.1 - Estabilidade de MPA e MPAG em sangue total

Tempo no sangue	% bias	
	MPA	MPAG
0	-0.5974	-1.19438
15,0	-21.5147	-8.6558
30,0	-30.0264	-11.1072
45,0	-36.7510	-16.3084
60,0	-40.1863	-26.0113
75,0	-49.0568	-29.8137

Observando-se a complexidade das matrizes envolvidas no estudo considera-se que o limite de quantificação de 5,0 ng/mL para MPA e 10,0 ng/mL para MPAG (em ambas as matrizes) adequado, tendo em vista que se empregou detector de massas com quadrupolo único após um procedimento de extração dos analitos bastante simples e rápido.

O método desenvolvido foi aplicado em amostras coletadas de pacientes transplantados renais internados no Hospital São Lucas da PUC/RS. No total foram coletadas amostras de plasma e fluido oral de 13 pacientes que se encaixavam nos critérios de inclusão já descritos no capítulo 6. Os tempos de coleta inicialmente seriam 9 (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 10, 12h), porém já no início do trabalho várias dificuldades foram encontradas. A primeira foi manter o acesso venoso por 12 h para que as coletas pudessem ser realizadas e por isso tentamos a estratégia de coletar apenas 5 pontos utilizando as 2 primeiras horas após o paciente ter tomado o ácido micofenólico. Entretanto essa estratégia não funcionou, pois o acesso dos pacientes não refluía o sangue e em alguns não era possível conseguir uma veia para o acesso. Após conversar com enfermeiras que trabalham com esses pacientes descobrimos que eles em geral apresentam dificuldade para retirar sangue devido a seu histórico de hemodiálise. A alternativa para retirar todos os pontos seria a cada coleta achar uma nova veia, porém outros dois novos obstáculos apareceram: primeiro nenhum paciente aceitaria, visto que ao ser solicitado uma amostra de sangue já era difícil e a segunda é a dificuldade em achar veia, tivemos ajuda das enfermeiras especializadas em coletas difíceis e mesmo assim em alguns pacientes não conseguimos nem um ponto de plasma.

Após discussões sobre qual caminho seguir optamos por seguir uma outra estratégia, que foi nos pacientes que conseguíssemos coletar mais pontos com acesso usaríamos e aqueles em que não era possível pelo menos uma coleta seria realizada. Foi importante que as coletas se realizassem em pontos diferentes para que pudéssemos no final estabelecer uma média e traçar um perfil para realizar uma análise farmacocinética preliminar. Para o fluido oral foram coletados 6 pontos, um antes de tomar nova dose do medicamento (t_{12}), e os outros 5 (0, 0.5, 1, 1.5 e 2 h).

A análise não compartimental apresentou resultados de C_{max} , AUC e T_{max} dentro do que é descrito na literatura, levando em consideração a grande variação interpaciente. Análise do MPAG demonstrou que tanto a concentração quanto área sob a curva são em média 10 vezes mais alta que do MPA. Esse resultado era esperado, devido a metabolização de primeira passagem do MPA em AcMPA, ativo em pequena quantidade, e MPAG em maior proporção e inativo, e que devido a enzimas presentes no intestino iram lisar o MPAG a MPA novamente, que será reabsorvido e representará a maior proporção da concentração do MPA na circulação sistêmica (recirculação entero-hepática).

Para fluido oral poucos estudos descrevem a farmacocinética do MPA e MPAG e apenas um apresentou resultados dos parâmetros farmacocinéticos para que pudéssemos comparar (MENDONZA; GOHH; AKHLAGHI, 2006; SHEN et al., 2009). Como já esperado as concentrações, AUC são menores do que o encontrado no plasma, estando em escala de nanogramas. Como apenas um estudo apresenta valores farmacocinéticos para o fluido oral e levando em consideração que o MPA e seu metabolito glicuronideo apresentam uma grande variação interpaciente, e que essa matriz pode sofrer interferências externas não é possível comparar nossos resultados e dizer que está de acordo com o encontrado na literatura.

Desde o início do trabalho a ideia era estabelecer se havia uma correlação farmacocinética entre MPA e MPAG de fluido oral *versus* plasma para avaliar a viabilidade de utilizar o fluido oral no monitoramento terapêutico, substituindo o plasma, que como já descrito acima apresenta dificuldades de coleta, e conseguir uma matriz que não seja invasiva, não precise de pessoal treinado para realizar seria de grande valor na prática clínica.

Conforme resultados apresentados no capítulo 2, o fluido oral pode ser uma matriz a ser considerada para o monitoramento terapêutico do MPA e seu metabolito glicuronideo. Ainda são necessários mais estudos, com mais pacientes, para avaliar se nossa estratégia de coleta com pontos limitados se reproduz. Outro parâmetro a ser estudado para a implementação do fluido oral na clínica seria tentar correlacionar os valores encontrados com parâmetros clínicos dos pacientes, em especial com efeitos adversos (LU et al., 2005; NAESENS et al., 2007; TORNATORE et al., 2015; ZICHENG et al., 2006).

Um ponto a ser avaliado na questão do monitoramento terapêutico é qual tempo de coleta deve ser utilizado, pois em geral utiliza-se o T_0 para realizar as análises, porém devido à grande variabilidade do MPA alguns estudos já demonstraram que isso não seria eficiente. No T_0 a concentração do fluido oral é cerca de 100 vezes menor que a do plasma, com grande variabilidade nos dois fluidos ($\pm 70\%$). Sendo fluido oral uma técnica não invasiva seria possível pensar em uma estratégia de monitoramento utilizando mais de um ponto de coleta.

Durante as coletas de sangue também foi coletado outra amostra em tubo de heparina para isolamento dos linfócitos, a fim de realizar a análise da concentração intracelular do MPA, já que é seu sítio de ação. Um estudo já havia sido publicado demonstrando que não há uma correlação entre concentração nos linfócitos e a concentração plasmática (em C_0), porém como em nosso estudo fizemos coletas em diferentes pontos realizamos a análise para verificar se existe uma correlação (NGUYEN et al., 2013; NGUYEN THI et al., 2015).

Após análise da concentração intracelular por CL/EM elas foram normatizadas para $\text{ng}/10^7$ linfócitos, como é comumente apresentado na literatura. A figura 7.2 demonstra que a princípio as concentrações intralinfocitárias não são constantes e variou assim como no plasma apresentando a concentração máxima em 1.5 h.

Foi detectado dentro do linfócito o MPAG, e que em amostras de pacientes transplantados renais ainda não havia sido descrito na literatura. Os trabalhos publicados de isolamento de linfócitos, lise e quantificação são somente para o MPA por isso não esperávamos encontrar o MPAG, tanto que em nossos experimentos *in vitro* com o MPAG não utilizamos ele. Assim como no plasma esse metabolito está em maior concentração em relação ao MPA, contudo, por ser um metabolito inativo,

sua presença no sítio de ação pode não ter significado clínico. Dois trabalhos foram publicados um mostrando resultados que o MPAG tem atividade dentro do linfócito outro fala que não tem atividade, por esse motivo seria importante mais estudos serem realizados avaliando a atividade e assim determinar a impotência do MPAG intralinfocitário (ATCHESON et al., 2004; MILLAN et al., 2000)

A proporção intracelular de MPA comparada com no plasma é em média de 2% resultado que é próximo aos dos ensaios realizado em sangue total. Nele adicionamos MPA a uma amostra de sangue total e, após algum tempo, foram separados os linfócitos para ver quanto havia permeado, com uma porcentagem de permeação média de 1.75%.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de imunossupressores em doses terapêuticas corretas é um ponto crucial para o sucesso do transplante renal, sobrevida do paciente e diminuição dos efeitos colaterais, já que muitos estudos provaram que a dose está relacionada a estes fatores. A coleta de amostras de fluido oral, procedimento não invasivo, facilitaria enormemente o monitoramento terapêutico desses imunossupressores e não necessitaria de alguém especializado para realizá-la.

No presente trabalho foi desenvolvido e validado método para análise em plasma, fluido oral e linfócitos visando a detecção de ácido micofenólico (MPA) e seu metabólito glicuronídeo (MPAG). O método desenvolvido utiliza um protocolo para limpeza da matriz biológica bastante simples e rápido, que possibilita a análise das substâncias de interesse por LC-MS com um limite de detecção adequado.

O método foi aplicado em amostras de fluido oral e plasma de pacientes transplantados renais, internados no hospital São Lucas da PUC, com sucesso. Mesmo com número limitado de amostras foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos e estabelecer uma correlação entre as duas matrizes. Mais estudos necessitam ser realizados para estabelecer o fluido oral como uma matriz alternativa ao plasma no monitoramento terapêutico do MPA.

O baixo limite de detecção permitiu realizar estudos *in vitro* e *in vivo* de permeação do MPA nos linfócitos e comparar os resultados com amostras coletadas de pacientes transplantados renais. A comparação dos dados de permeação permitiu concluir que os estudos realizados *in vitro* (sangue total) tem maior correlação com os resultados encontrados nas amostras de pacientes. Ao analisar as amostras foi detectado além do MPA, como já esperado, também o MPAG, que ainda não havia sido descrito. Como não há consenso na literatura relativo a atividade do MPAG mais estudos devem ser realizados no futuro para determinar a importância de sua quantificação.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATCHESON, B A.; et al. Free Mycophenolic Acid Should Be Monitored in Renal Transplant Recipients with Hypoalbuminemia. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, n. 3, p. 284–286, 2004.
- BORDIN, D. C. M. *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.
- COLOM, H. *et al.* Clinical pharmacokinetics of mycophenolic acid and its metabolites in solid organ transplant recipients. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 661, n. 2, p. 183–201, 2012.
- DELAVENTE, X. *et al.* UPLC MS/MS method for quantification of mycophenolic acid and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic study. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 1–2, p. 59–65, 14 jan. 2011.
- DIFRANCESCO, R. *et al.* Simultaneous determination of cortisol, dexamethasone, methylprednisolone, prednisone, prednisolone, mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 859, n. 1, p. 42–51, 2007.
- DRUGBANK. **The DrugBank database.** Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/metabolites/DBMET00916>>. Acesso em: 3 maio. 2017.
- ELBARBRY, F. A; SHOKER, A. S. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. **Clinical biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 752–64, jul. 2007.
- FIGURSKI, M. J. *et al.* High-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy method for simultaneous quantification of total or free fraction of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 9, 2009.
- KLEPACKI, J. *et al.* A high-throughput U-HPLC-MS/MS assay for the quantification of mycophenolic acid and its major metabolites mycophenolic acid glucuronide and mycophenolic acid acyl-glucuronide in human plasma and urine. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 883–884, p. 113–9, 1 fev. 2012.
- KUHN, J. *et al.* Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry assay. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 1–2, p. 83–90, jan. 2009.
- LU, X.-Y. *et al.* Pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese kidney transplant patients. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 6, n. 9, p. 885–891, 2005.
- MADARIAGA, M. L. L. *et al.* Effect of tolerance versus chronic immunosuppression protocols

on the quality of life of kidney transplant recipients. **JCI Insight**, v. 1, n. 8, p. 4062–4072, 2 jun. 2016.

MENDONZA, A. E.; GOHH, R. Y.; AKHLAGHI, F. Analysis of mycophenolic acid in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Therapeutic drug monitoring**, v. 28, n. 3, p. 402–406, 2006.

MILLAN, Olga et al. Assessment of Mycophenolic Acid-induced Immunosuppression : A New Approach. **Clinical chemistry**, v. 46, n. 9, p. 1376–1383, 2000.

NAESENS, M. *et al.* Effects of gastric emptying on oral mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal allograft recipients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 541–547, 2007.

NGUYEN, T. M. T. *et al.* Mycophenolic acid quantification in human peripheral blood mononuclear cells using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clin Biochem**, v. 46, n. 18, p. 1909–1911, 2013.

NGUYEN THI, M. T. *et al.* Plasma and intracellular pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of mycophenolic acid in de novo kidney transplant patients. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 401–405, 2015.

SHEN, B. *et al.* Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 515–521, 2009.

SHUM, B. *et al.* Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. **British journal of clinical pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 188–97, ago. 2003.

TORNATORE, K. M. *et al.* Influence of Sex and Race on Mycophenolic Acid Pharmacokinetics in Stable African American and Caucasian Renal Transplant Recipients. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 4, p. 423–434, 16 abr. 2015.

WIESEN, M. H. J. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva collection device. **Journal of chromatography. A**, v. 1241, p. 52–9, 8 jun. 2012.

ZHANG, D.; CHOW, D. S.-L.; RENBARGER, J. L. Simultaneous quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma by an UPLC-MS/MS assay. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 10, p. 1648–1655, 2016.

ZICHENG, Y. *et al.* Investigation on pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese adult renal transplant patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 446–452, 2006.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOFENOLATO E PRINCIPAIS METABÓLITOS POR CL-EM

Pesquisador: Flavia Valladão Thiesen

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67864517.9.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.082.466

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOFENOLATO E PRINCIPAIS METABÓLITOS POR CL-EM - (CAAE: 67864517.9.0000.5336)

pesquisador responsável: Flavia Valladão Thiesen

instituição responsável: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA - PUCRS

Objetivo da Pesquisa:

Este trabalho propõe um estudo farmacocinético dos metabólitos do micofenolato de mofetila -MMF em pacientes transplantados renais, relacionando os resultados obtidos com seus efeitos secundários

Objetivo Primário:

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliação farmacocinética de pacientes transplantados renais tratados com MMF

Objetivo Secundário:

Desenvolver e validar método para análise de MPA e MPAG por CL-EM.

Determinar os níveis na saliva e no plasma de MPA e MPAG em 12 tempos de coleta em 20

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 2.082.466

pacientes transplantados renais tratados com ácido micofenólico.

Determinar a área sob a curva (ASC) de MPA em pacientes transplantados renais tratados com ácido micofenólico.

Determinar a área sob a curva (ASC) de MPAG em pacientes transplantados renais tratados com ácido micofenólico.

Determinar níveis de MPA intracelular. Investigar a relação dos níveis de MPA com a incidência de diarreia e leucocitose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Além da coleta de saliva e sangue, não estão previstos riscos para o paciente.

Benefícios: Os resultados do estudo contribuirão para o sucesso do tratamento com ácido micofenólico, reduzindo risco de rejeição ao transplante e ocorrência de efeitos adversos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia: Fluido oral será coletado através de dispositivo específico em pacientes transplantados renais em uso de micofenolato. Plasma será coletado por profissional capacitado utilizando tubos de coleta de EDTA e heparina. Serão incluídos neste estudo pacientes transplantados renais, maiores de 18 anos, internados e atendidos pelo Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS, que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no período de realização deste estudo.

Após coletadas as amostras serão congeladas até serem processadas e analisadas. Após processamento as amostras serão analisadas por CL-EM para determinação da concentração nos devidos fluidos biológicos e com esses dados obtidos será feito um perfil farmacocinético e análise estatística.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão adequadamente redigidos e assinados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências. O projeto tem relevância clínica e científica, está bem desenhado, metodologicamente e eticamente adequado e não traz riscos significativos para os participantes.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 2.082.466

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas nas Resoluções CNS n° 466 de 2012, n° 510 de 2016 e Norma Operacional n° 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_263654.pdf	17/05/2017 11:31:01		Aceito
Outros	_cartaRespostaPendenciasaCEP.pdf	17/05/2017 11:29:27	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Outros	_cartaRespostaPendenciasaCEP.doc	17/05/2017 11:29:07	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Cronograma	_Cronograma_Alteracoes.docx	17/05/2017 11:28:45	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Cronograma	_Cronograma_Alteracoes.pdf	17/05/2017 11:27:16	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Cronograma	_Cronograma_.docx	17/05/2017 11:25:57	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	17/05/2017 11:24:49	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Outros	Documento_Unificado_do_Projeto_de_Pesquisa_1400106427049.pdf	03/05/2017 11:45:17	Flavia Valladão Thiesen	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	20/04/2017 10:34:40	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
Outros	carta_aprovacao.pdf	20/04/2017 10:32:51	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
Outros	_Curriculo_lattes_pesquisadores_.pdf	20/04/2017 10:30:52	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
Outros	apresentacao.pdf	20/04/2017 10:29:09	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
Outros	carta_chefe.pdf	20/04/2017 10:27:21	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
Folha de Rosto	img20170404_17482367.pdf	05/04/2017 19:54:41	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	22/03/2017 20:01:32	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo.docx	19/12/2016 17:42:35	THAINA TAVARES DE ARAUJO	Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703
 Bairro: Partenon CEP: 90.619-900
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 2.082.466

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 25 de Maio de 2017

Assinado por:

Paulo Vinicius Sporleder de Souza
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Número do caso no estudo: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar de um estudo no projeto intitulado **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOFENOLATO E PRINCIPAIS METABÓLITOS POR CL-EM** que irá identificar os metabólitos do micofenolato (ácido micofenólico e ácido micofenólico glucoronideo) em pacientes renais transplantados.

Objetivos: Estabelecer exames simples capazes de identificar os metabólitos do micofenolato mofetil/micofenolato de sódio em saliva e plasma e realizar análise farmacocinética com estes dados.

Justificativa: Realizar estudo farmacocinético em amostras de plasma e saliva e comparar os resultados obtidos para ver se é possível utilizar para monitoramento terapêutico à saliva, que possui coleta simples e não invasiva, substituindo o plasma.

Como será realizado o estudo: Pacientes transplantados renais que estiverem internados no Hospital São Lucas da PUCRS serão avaliados e convidados a participar do estudo, no qual será feita coleta de saliva e sangue, 5 pontos em 2h, após administração de MMF.

Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa: Não estão previstas despesas.

Desconforto ou Riscos esperados: Além da coleta de saliva e sangue, não estão previstos riscos para o paciente.

Informações: O voluntário tem garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Os pesquisadores assumem o compromisso de dar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

Retirada do consentimento: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

Garantia de Proteção dos Dados dos Voluntários: Talvez os resultados deste estudo apareçam em revistas médicas ou em palestras, mas nunca irá aparecer seu nome.

Ao assinar este termo de consentimento, você não abre mão de nenhum direito legal que teria de outra forma. Não assine este termo de consentimento a menos que tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e tenha recebido respostas satisfatórias para todas as suas dúvidas. Se você concordar em participar deste estudo, você rubricará todas as páginas e assinará e datará duas vias originais deste termo de consentimento. Você receberá uma das vias para seus registros e a outra será arquivada pelo responsável pelo estudo.

A saliva e o sangue coletados neste estudo serão processados e analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL/MS), equipamento de última geração, para determinar as

concentrações de ácido micofenólico presentes nas amostras e realizar análise farmacocinética com esses resultados.

Local de Realização do estudo: Hospital São Lucas da PUCRS e Faculdades de Farmácia da PUCRS e UFRGS. Esta última está situada na Av. Ipiranga, 2752, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre/RS.

Contato com Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-PUCRS) Prédio 50 - 7º andar, Sala 703 Av. Ipiranga, 6681 CEP: 90619-900 - Bairro Partenon - Porto Alegre - RS. Fone: (51) 3320-3345 e-mail: cep@pucrs.br, de segunda a sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h30min às 17h.

Nome Completo e telefones dos Pesquisadores para contato: Prof. Dr Pedro Eduardo Fröhlich (51) 33085451, Prof. Dr Flavia Valladao Thiesen (51) 33203512, aluna Pâmela Cristina Lukasewicz Ferreira (51) 33085313.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, declaro que fui informado(a) dos objetivos e de como vou participar deste estudo de forma clara e detalhada. Todas as minhas dúvidas foram respondidas e sei que poderei ter novos esclarecimentos a qualquer momento. Entendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum para mim. Confirmando que recebi cópia deste termo, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo em revistas de medicina.

*Não assine este termo se ainda tiver alguma dúvida a respeito.

Porto Alegre, _____ de _____ de 201_____

Nome (por extenso): _____

Assinatura: _____

DECLARAÇÃO DO PROFISSIONAL QUE OBTVEU O CONSENTIMENTO

Expliquei integralmente este estudo clínico ao participante ou ao seu cuidador. Na minha opinião e na opinião do participante e do cuidador, houve acesso suficiente às informações, incluindo riscos e benefícios, para que uma decisão consciente seja tomada.

Data: _____

Assinatura do Investigador

Nome do Investigador (letras de forma)

1 via Instituição:

2 via Voluntario

PROTOCOLO DE PESQUISA

PROTOCOLO DE PESQUISA

Número do prontuário: _____ Gênero: () Masculino

() Feminino

Idade: _____ Altura: _____ cm Peso: _____ kg

Tempo pós-transplante: _____ meses

Presença de diarreia?

História

clínica: _____

_____ Medicamentos

utilizados:

Medicamento	Via	Dose	Posologia

Dados			
Data	Creatinina	Leucócitos	Eritrócitos

Protocolo para coleta de Fluido Oral

Material:

- a) Copo plástico
- b) Água
- c) Dispositivo de Coleta Salivette
- d) Luva
- e) Eppendorf 1.5 mL

Procedimento:

- a) Fazer bochecho com água e descartar;
- b) Abrir o dispositivo Salivette;
- c) Colocar o algodão na boca e ficar por 30 segundos
- d) Após retirar o algodão da boca recolocar no dispositivo Salivette e centrifugar por 10 minutos, 4°C a 14.000 rpm.
- e) Após centrifugação o fluido oral estará no tubo e deve ser pipetado em eppendorf de 1.5 mL, identificado e armazenado a -80°C.

* Em caso de pacientes com pouca produção de saliva permanecer mais tempo com o dispositivo na boca.