

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TENOFOVIR E FUNÇÃO RENAL EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV**

RINGO STAR FERNANDES GUIMARÃES

Dissertação de mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Toledo

Co-orientadora: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Brasília – DF

2019

RINGO STAR FERNANDES GUIMARÃES

**CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TENOFOVIR E FUNÇÃO RENAL EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical da Universidade de
Brasília como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Medicina Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Toledo

Co-orientadora: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Brasília – DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fc

Fernandes Guimarães, Ringo Star
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TENOFOVIR E FUNÇÃO RENAL EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV / Ringo Star Fernandes Guimarães;
orientador Maria Inês de Toledo; co-orientador Eloísa Dutra
Caldas. -- Brasília, 2019.
124 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Pessoas vivendo com HIV. 2. HIV. 3. Tenofovir. 4. LC
MS/MS. 5. creatinina. I. de Toledo, Maria Inês , orient.
II. Dutra Caldas, Eloísa, co-orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo o apoio tanto financeiro quanto emocional em todos os momentos difíceis de decisões a tomar.

Às Profas. Dras. Maria Inês de Toledo e Eloisa Dutra Caldas pela orientação neste trabalho. Agradeço pela confiança, ajuda incondicional, orientação e aporte tecnológico.

À Profa. Dra. Ingrid Ferreira Metzger pela ajuda no recrutamento, organização dos dados e na análise estatística.

À Profa. Dra. Elza Ferreira Noronha, superintendente do HUB, pelo apoio institucional ao projeto e pelas contribuições da banca.

À Profa. Dra. Noêmia U. L. Tavares pela parceria no projeto e apoio da equipe da Farmácia Escola.

À Lorena Cristina dos Santos, chefe do laboratório, pela ajuda e presteza durante a coleta de amostras de sangue.

A toda equipe assistencial da DIP-HUB, em especial ao Dr. André Coelho e Dra Valéria Paes, pelo auxílio no recrutamento e discussão do projeto e dos resultados.

A Profa. Dra. Daydelane Mendonça da Silva pela participação na defesa e pelas contribuições ao trabalho.

A todos os professores do NMT pelas contribuições ao trabalho e ensinamentos durante o curso da pós-graduação.

Aos colegas do PPG-NMT, em especial ao Igór Araújo Cruz pela ajuda com o transporte de amostras de sangue. À estagiária Joyce pelo auxílio no recrutamento.

Ao INCQS pela doação dos padrões analíticos.

Ao LabTox por abrir as portas ao nosso projeto, disponibilizando todo o equipamento e material necessário para quantificação plasmática do tenofovir.

A todo pessoal do LabTox que me ajudou a trilhar essa jornada com todo apoio e aprendizado e acolhimento que ofereceram. Em especial às

colegas Nayara, Bia, Josy, Isabelle e Ana Júlia que me ajudaram doando o sangue para uso na pesquisa.

A todos os meus amigos que de alguma forma me apoiaram e contribuíram para a finalização do mestrado. Em especial para Dani Manchini que me apoiou e deu força de todas as formas para iniciar essa jornada e ao Firmino que me ajudou durante a compra do padrão analítico.

À Universidade de Brasília e de modo especial ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina.

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC – Lamivudina

AGHU – Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários

AMPK – *Adenosine monophosphate activated protein kinase* (Quinase ativada por monofosfato de adenosina)

ARV – Antirretroviral

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

ClCr – *Creatinine clearance* (depuração de creatina)

CV – Coeficiente de variação

CVir – Carga Viral

DRC – Doença Renal Crônica

DTG – Dolutegravir

EFV – Efavirenz

FIA – *Flow injection analysis*

FTC – Emtricitabina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPLC-UV – *High Performance Liquid Chromatography Coupled with ultravioleta* (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao ultravioleta)

HUB/UNB – Hospital Universitário de Brasília

IMC – Índice de massa corpórea

INI – Inibidor de integrase

INNTR – Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa

INTR – Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa

INtTR – Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa

IP – Inibidor de protease

LabTox – Laboratório de Toxicologia da UnB

LC-MS/MS – *Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas)

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MDDR – Modificação da Dieta na Doença Renal

MRM – *Multiple reaction monitoring*

MRP – *Multidrug resistance protein* (proteína resistente a multidrogas)

OAT – *Organic anion transporter* (Transportador de ânion inorgânico)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico

PCDT - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

PrEP – Profilaxia Pré-exposição

PVHIV – Pessoas vivendo com HIV

RNA – Ácido ribonucleico

Siclom – Sistema de Controle Logístico de Medicamentos

Sida – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SPE – Extração em fase sólida

T CD4+ – Linfócito T auxiliar com receptor CD4

TARV – Terapia antirretroviral

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TDF – Fumarato de tenofovir desoproxila

TDF-DP – Difosfato de tenofovir

TFA – ácido trifluoroacético

TFGe – Taxa de filtração glomerular estimada

USP – *United States Pharmacopoeia* (Farmacopeia Americana)

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de métodos utilizando cromatografia líquida de determinação de medicamentos da TARV contendo tenofovir.	37
Tabela 2	Parâmetros da fonte de íons após otimização da FIA.	54
Tabela 3	Efeito matriz do analito em plasma quando comparado em água. (media $\pm$ desvio padrão)	58
Tabela 4	Repetibilidade e precisão intermediária da determinação de tenofovir em plasma. Média (desvio padrão) em área do pico do tenofovir/ PI.	61
Tabela 5	Características sociodemográficas das PVHIV elegíveis para o estudo de avaliação da concentração plasmática de tenofovir atendidas no HUB.	63
Tabela 6	Dados clínicos de controle do HIV antes do início do tratamento e após aproximadamente três meses. Carga viral em cópias/mL plasma; T CD4+ em células/mm3 sangue.	65
Tabela 7	Valores da média e desvio padrão de creatinina sérica (mg/dL) e depuração de creatinina (CICr; mL/min/1,73m ²) antes do início do tratamento e após aproximadamente três e seis meses de tratamento.	67
Tabela 8	Valores de concentração plasmática de tenofovir conforme o tempo de ingestão do medicamento, média $\pm$ desvio padrão.	69
Tabela 9	Dados clínicos e concentração plasmática de tenofovir em PVHIV atendidas no HUB conforme o tempo de ingestão do medicamento, médias $\pm$ desvio padrão.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Terapia antirretroviral e possíveis efeitos adversos renais em pessoas vivendo com HIV.	30
-----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de replicação do vírus HIV. São apresentados passos sequenciais desde a fusão do vírus na célula do sistema imune humano até a liberação de novos vírus.	19
Figura 2	Resumo esquemático da infecção pelo HIV apresentando as fases da infecção e a relação linfócitos T CD4+ e ácido ribonucleico (RNA) viral ao decorrer do tempo.	20
Figura 3	Linha do tempo apresentando os novos fármacos antirretrovirais e a criação de novas classes terapêuticas até o ano de 2015.	21
Figura 4	Estrutura química e processos bioquímicos até a formação da molécula ativa de tenofovir em humanos. AMPK = Quinase ativada pelo monofosfato de adenosina.	26
Figura 5	Fluxograma para manejo da doença renal crônica em PVHIV.	32
Figura 6	Regiões de saúde do DF com suas respectivas regiões administrativas.	41
Figura 7	Resumo esquemático do processo de recrutamento das PVHIV.	42
Figura 8	Estrutura química de tenofovir e de aciclovir.	45
Figura 9	Tempos de retenção do tenofovir (10 ng/mL) no HPLC-UV eluídos em duas diferentes concentrações da fase orgânica - preto: acetonitrila 5% rosa: acetonitrila 3%.	50
Figura 10	Cromatograma no HPLC-UV do plasma branco (preto) e plasma branco fortificado 50 ng/mL de tenofovir (azul) e plasma branco fortificado 500 ng/mL (rosa). A seta mostra o sinal cromatográfico referente ao tenofovir e seus possíveis interferentes.	51

Figura 11	Cromatograma no HPLC-UV. Preto – extração com acetonitrila; rosa – extração SPE. A: plasma branco; B: plasma branco fortificado 50 ng/mL. Cromatógrafo A seta mostra o sinal cromatográfico referente ao tenofovir e seus possíveis interferentes.	53
Figura 12	Espectro de fragmentação para os íons precursores de tenofovir (A) e seu padrão interno, aciclovir (B) no LC-MS/MS.	55
Figura 13	Relação sinal/ruído para o tenofovir de concentração de 5 ng/mL (LOQ, A) e de concentração de 2 ng/mL (B). Monitoramento da transição m/z 279,1 $\rightarrow$ m/z 176,1 no LC-MS/MS.	56
Figura 14	Cromatogramas obtido no LC-MS/MS de A: cinco plasmas brancos (zoom) e plasma branco fortificado com concentração de 5 ng/mL tenofovir (azul); monitoramento da transição m/z 278,9 $\rightarrow$ m/z 176,1 e B: cinco plasmas brancos (zoom) e plasma branco fortificado com aciclovir com concentração de 50 ng/mL (azul); monitoramento da transição m/z 226,0 $\rightarrow$ 151,1.	57
Figura 15	Curvas analíticas do tenofovir em água e no plasma branco para teste de efeito matriz, mostrando a supressão do sinal. PI= padrão interno aciclovir.	59
Figura 16	Curva analítica construída em plasma branco com seis concentrações (n=5 em cada concentração).	60
Figura 17	Dispersão dos resíduos normalizados da curva analítica de tenofovir na faixa de concentração de 5 a 200 ng/mL (em log).	60
Figura 18	Fluxograma dos participantes da pesquisa.	62

- Figura 19** Comparação da contagem de leucócitos T CD4+ (CD4+) basal e após aproximadamente três meses em todas as pessoas elegíveis, em células/mm³ sangue (A), grupo de pessoas que colheram sangue para determinar tenofovir (B) e grupo de pessoas que não colheram sangue (C). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Teste de Wilcoxon pareado). 66
- Figura 20** Comparação da creatinina basal e após aproximadamente três meses em todas as pessoas elegíveis (A), grupo de pessoas que colheram sangue para determinar tenofovir (B) e grupo de pessoas que não colheram sangue (C). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Teste de Wilcoxon pareado). 68
- Figura 21** Comparação da depuração estimada de creatinina (ClCr) basal e após aproximadamente três meses em todas as pessoas elegíveis (A), grupo de pessoas que colheram sangue para determinar tenofovir (B) e grupo de pessoas que não colheram sangue (C). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Teste de 68 Wilcoxon pareado).
- Figura 22** Análise de dispersão das concentrações plasmáticas de tenofovir em PVHIV atendidas no HUB-UNB. Cada ponto representa um indivíduo diferente LN = logaritmo em base natural (e). 71

SUMÁRIO

I.	Introdução	16
II.	Revisão da literatura	18
1.	HIV e esquema antirretroviral	18
2.	Fumarato de tenofovir desopoxila: metabolismo e farmacocinética	24
3.	Alterações renais associadas ao uso de tenofovir	28
4.	Monitoramento da função renal	33
5.	Quantificação plasmática de fármacos	34
III.	Objetivos	38
1.	Objetivo Geral	38
2.	Objetivos Específicos	38
IV.	Material e métodos	39
1.	Local, período de estudo, desenho do estudo e população alvo	39
2.	Recrutamento dos participantes e coleta dos dados clínicos e sociodemográficos	40
3.	Coleta do material biológico e processamento das amostras	42
4.	Determinação de tenofovir em plasma	43
4.1	Preparo das soluções para curva de calibração	43
4.2	Determinação de tenofovir por HPLC-UV	43
4.2.1	Preparo da fase móvel	43
4.2.2	Desenvolvimento do método de extração	44
4.3	Determinação de tenofovir por LC-MS/MS	45
4.3.1	Preparo da fase móvel e das soluções padrão	45
4.3.2	Otimização dos parâmetros no LC-MS/MS	46
4.3.3	Método de extração	46
5.	Validação do método analítico LC-MS/MS otimizado	47
6.	Quantificação plasmática de tenofovir	48
7.	Análise estatística dos dados	49
8.	Aspectos éticos	49

V.	Resultados	50
1.	Determinação de tenofovir em plasma humano por HPLC-UV	50
1.1	Testes iniciais realizados em água milli-Q	50
1.2	Análises para otimização do método utilizando plasma humano	51
2.	Determinação de tenofovir em plasma humano por LC-MS/MS	54
2.1	Otimização dos parâmetros experimentais	54
2.2	Limite de quantificação (LOQ) do tenofovir no equipamento LC-MS/MS	56
2.3	Seletividade	57
2.4	Efeito Matriz	58
2.5	Linearidade	59
2.6	Precisão	61
3.	Caracterização das PVHIV elegíveis para o estudo	61
4.	Quantificação plasmática de tenofovir	69
VI.	Discussão	72
VII.	Conclusão	78
VIII.	Referências	79
IX.	Apêndices	91
1.	Dados clínicos individualizados dos participantes da pesquisa	91
2.	TCLE	95
X.	Anexo	97
1.	Parecer do CEP/FS	97
2.	Artigo para publicação	104

RESUMO

O fumarato de tenofovir desoproxila, inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, utilizado no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), em associação com a lamivudina e o dolutegravir sódico, compõem a terapia antirretroviral (TARV) de primeira linha no Brasil desde 2017. Alguns autores observaram associação entre a concentração plasmática de tenofovir e diminuição da função renal. Este trabalho teve como objetivo determinar as concentrações plasmáticas de tenofovir e possíveis alterações da função renal em pessoas vivendo com HIV (PVHIV) em uso da TARV de primeira linha no Brasil. Trata-se de estudo observacional transversal com a participação de 89 PVHIV atendidas no Hospital Universitário de Brasília que foram recrutadas entre agosto de 2018 e abril de 2019. Dados clínicos foram obtidos de todos participantes e 24 deles tiveram amostras de sangue coletadas para análise de tenofovir. O método analítico validado para determinação de tenofovir envolve precipitação de proteínas com acetonitrila e quantificação de tenofovir por LC-MS/MS, com limite de quantificação de 5 ng/mL. As PVHIV participantes do estudo tinham entre 19 e 67 anos (mediana de 31,5 anos), eram predominantemente homens, com índice de massa corporal média de $24,6 \pm 3,8$, e média de T CD4⁺ de 541,2 células/mm³. Os dados de dosagem de creatinina sérica mostraram queda significativa da função renal após o início do tratamento, com depuração de creatinina caindo de 114,3 para 97,4 mL/min/1,73m². As concentrações plasmáticas de tenofovir variaram em função do tempo da última dose, com valores entre 19,7 e 112,7 ng/mL (média de 46,7 ng/mL), e foi possível estabelecer valores de referência para utilização em estudos futuros considerando o esquema de TARV de primeira linha vigente no Brasil.

Palavras-chave: Pessoas vivendo com HIV, HIV, tenofovir, LC-MS/MS, creatinina, nefropatias.

ABSTRACT

Tenofovir disoproxil fumarate, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, is used to treat infections caused by human immunodeficiency virus (HIV), in association with lamivudine and sodium dolutegravir, which are the components of the Brazilian antiretroviral therapy (ARVT) since 2017. Some studies have reported an association between plasma tenofovir concentration and renal function decrease. This is a transversal observational study that aimed to determine the levels of plasma tenofovir and renal function of people living with HIV (PLHIV) who attend the University Hospital of Brasilia and were under the Brazilian ARVT protocol. A total of 89 PLHIV were recruited from August 2018 and April 2019. Clinical data were obtained for all participants and 24 of them had their blood collected for tenofovir analysis. The validated method for tenofovir determination involves protein precipitation and LC-MS/MS, with a limit of quantification of 5 ng/mL. The participants aged 19 to 67 years old (median of 31.5 years), mainly men, with mean body mass index of 24.6 ± 3.8 and mean T CD4+ of 541.2 cells/mm^3 . Creatinine levels indicated a decrease in renal function after treatment initiation, with creatinine clearance dropping from 114.3 to 97.4 mL/min/1.73m². Tenofovir plasma levels changed as a function of time between the last dose and blood sampling, varying from 19.7 to 112.7 ng/mL (mean of 46.7 ng/mL), and it was possible to establish reference values for future studies involving PLHIV under the current Brazilian ARVT.

Key-words: People living with HIV, tenofovir, LC-MS/MS, creatinine, nephropathy

I. INTRODUÇÃO

Após a introdução da terapia antirretroviral (TARV) combinada houve declínio da mortalidade associada às infecções oportunistas e à aids, doença crônica causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (FINE & GALLANT, 2013). O foco no cuidado de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) deve ser semelhante a outras doenças crônicas, sendo que existe complexa associação entre imunodeficiência, inflamação crônica causada pelo HIV, envelhecimento e toxicidade em longo prazo dos antirretrovirais (MOCROFT et al., 2016). Pode-se dizer que, atualmente, as complicações do uso da TARV se tornaram mais importantes do que as consequências da infecção pelo vírus em si (FINE & GALLANT, 2013).

Em 2017 o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos do Brasil recomendou nova escolha de TARV para início de tratamento, contendo fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico, esquema ainda pouco utilizado em outros países. O fumarato de tenofovir desoproxila e a lamivudina já eram usados como componente da TARV de primeira linha desde 2013 e em esquemas alternativos anteriores (BRASIL, 2017a).

Problemas renais podem ter prevalência em PVHIV em tratamento com a TARV entre 2% a mais de 30%, dependendo da existência de outros fatores de risco (MOCROFT et al., 2016). Rodriguez-Novoa et al. (2010) mostraram que o tenofovir age sobre os rins de maneira dose-dependente, com uma relação direta com as concentrações plasmáticas. Desta forma, o monitoramento plasmático de tenofovir pode ser uma estratégia eficiente para prevenir problemas renais provenientes da TARV, pois pode identificar usuários que apresentam elevada concentração plasmática do fármaco.

Analisar a farmacocinética de um fármaco por meio do monitoramento das concentrações plasmáticas durante seu uso fornece um ótimo preditor fisiológico para estabelecer se o medicamento é eficaz e seguro (WAHL et al., 2017). A maioria dos estudos que aponta a toxicidade

do tenofovir sobre os rins tem sido realizada em países desenvolvidos com adultos (HALL, 2013; COOPER et al., 2010). São necessários estudos com a população brasileira, considerando o novo esquema antirretroviral proposto pelo atual PCDT, tendo em vista que esses medicamentos não foram adotados em larga escala em outros países.

O objetivo deste trabalho foi quantificar tenofovir no plasma humano de PVHIV por meio do desenvolvimento e validação de um método analítico e avaliar efeitos renais que podem ocorrer com o uso da TARV e por fim observar se há alguma correlação entre esses efeitos e as concentrações plasmáticas de tenofovir.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. HIV e esquema antirretroviral

O HIV foi identificado em humanos na década de 1970, mas a aids só foi reconhecida como doença em 1981 nos Estados Unidos quando já havia muitos doentes com comprometimento substancial do sistema imune causado pelo vírus. No Brasil o primeiro caso foi relatado em 1982, embora seja possível já ter havido outros casos anteriormente (Brasil, 2006).

O HIV é um retrovírus da família Retroviridae, com duas fitas simples de ácido ribonucleico (RNA) como material genético. O processo de replicação inicia-se com a ligação da gp120 do envelope do HIV à célula T CD4+ humana, ocorrendo a fusão do vírus mediada pelo gp41, ocasionando a entrada do HIV no citoplasma da célula infectada (Figura 1). Para a sua replicação, o HIV utiliza a transcriptase reversa que tem como função transformar o RNA em ácido desoxirribonucleico (DNA) fita simples que é alocado no DNA humano por meio da integrase, iniciando o processo de transcrição para posterior produção de proteínas virais. Essas proteínas vão para o citoplasma da célula hospedeira na forma de proteínas virais desorganizadas, onde são clivadas pela protease e formarão novos vírus (Brasil, 2006). O processo detalhado de replicação do HIV nas células do sistema imune pode ser observado na Figura 1.

A transmissão do HIV ocorre pelo contato do vírus com a mucosa humana, sendo que o contágio é facilitado quando há alguma lesão. O meio de contágio mais comum é nos tecidos anogenitais (vagina feminina e ânus tanto masculino quanto feminino) durante o sexo desprotegido (COLLINS et al., 2017). Pode ocorrer também transmissão vertical (durante a gestação, parto e amamentação) e pelo uso ou compartilhamento de materiais perfuro cortantes não estéreis (principalmente no uso de drogas injetáveis) (BRASIL, 2006).

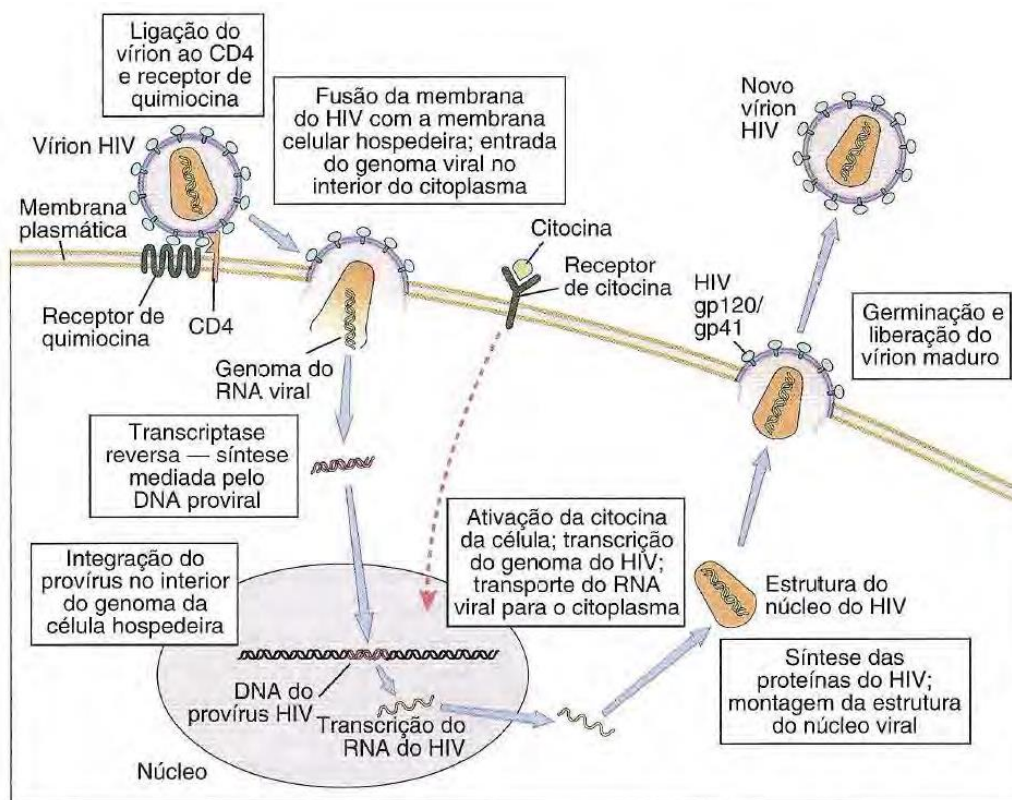


Figura 1. Ciclo de replicação do vírus HIV. São apresentados passos sequenciais desde a fusão do vírus na célula do sistema imune humano até a liberação de novos vírus. Fonte: Abbas e Lichtman (2007).

O organismo humano precisa de uma resposta acelerada e eficaz contra infecção, principalmente quando se trata de vírus reincidente, função mediada pelas células T (SHEDLOCK e SHEN, 2003). As células T CD4+, também chamadas de células auxiliares, são essenciais na regulação de respostas imunes, e são atacadas pelo vírus HIV, o que torna o organismo vulnerável às infecções oportunistas (PARK et al., 2005). A infecção pelo HIV é gradual e muitas vezes pode demorar anos até aparecerem os primeiros sintomas, tendo como característica principal a supressão da imunidade mediada por essas células T. São descritas quatro fases da infecção: infecção aguda, latência clínica ou assintomática, fase sintomática inicial ou precoce e aids. Essas fases são caracterizadas por sintomas clínicos, muitas vezes inespecíficos e nem sempre identificados, e pela contagem de células T CD4+ no plasma humano. A Figura 2 apresenta resumo esquemático com o tempo de duração e variações de T CD4+ e

RNA viral de cada fase (Australasian Society HIV, 2016). Indivíduos com sistema imune muito deprimido devido à doença têm baixa contagem de T CD4+ e alta contagem de RNA viral.

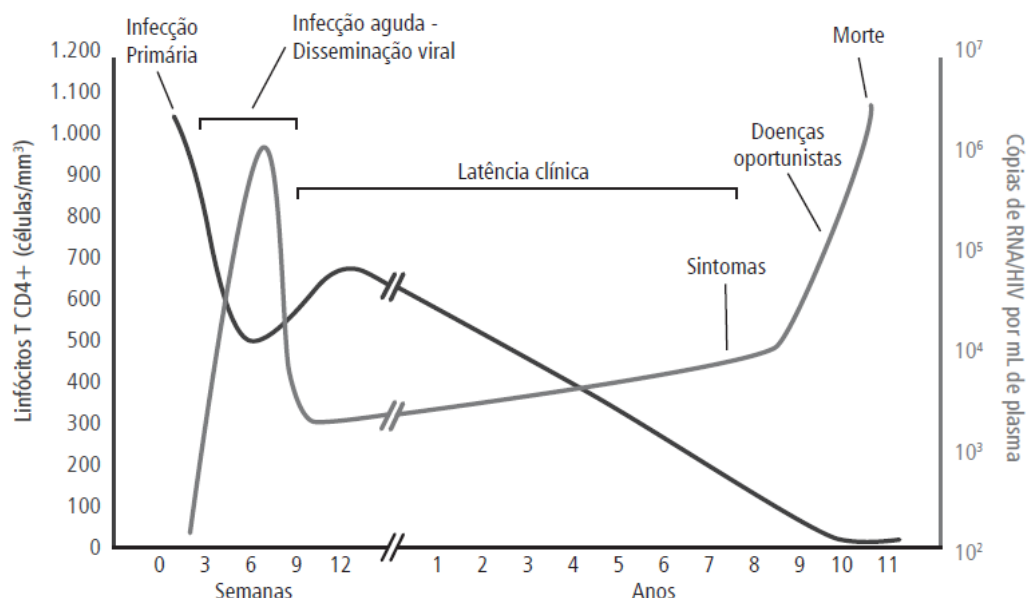


Figura 2. Resumo esquemático da infecção pelo HIV apresentando as fases da infecção e a relação linfócitos T CD4+ e RNA viral no decorrer do tempo. Fonte: Traduzido de CARTER, 2007.

O desenvolvimento de novas classes terapêuticas e novos fármacos antirretrovirais (ARV) foi impulsionado pela indústria desde a descoberta do vírus, principalmente pela grande quantidade de efeitos adversos dos primeiros medicamentos, e da resistência viral (MOSS et al., 2017). A Figura 3 apresenta um esquema do desenvolvimento e produção de novas classes terapêuticas e fármacos ARV de 1987 até 2015. Outros fármacos surgiram posteriormente e a pesquisa e produção de novos antirretrovirais está em constante crescimento.



Figura 3. Linha do tempo apresentando os novos fármacos antirretrovirais e a criação de novas classes terapêuticas até o ano de 2015. Fonte: adaptado de Pavlos e Phillips (2012) com atualizações (TOLEDO et al., 2019).

Os ARV são agrupados em classes medicamentosas de acordo com seu mecanismo de ação (PAVLOS e PHILLIPS, 2012). A principal diferença entre os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR) e os inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR) é que os INTR inibem a transcriptase reversa por um mecanismo competitivo com os nucleosídeos e os INNTR inibem por um mecanismo não competitivo, se ligando de forma direta e reversível à proteína (SILVA, 2011).

Os inibidores da protease (IP) impedem a clivagem das proteínas virais, inibindo de forma potente a replicação viral. O uso de doses baixas do IP ritonavir potencializa outros IP, aumentando as suas concentrações plasmáticas e a eficiência dessa classe de medicamentos (SILVA, 2011).

Os inibidores de fusão bloqueiam fusão do envelope viral do HIV com a membrana celular das células do sistema imune, impedindo a entrada

do conteúdo viral nessas células. Há ainda os antagonistas dos correceptores CCR5 (C-C receptor quimiocina tipo 5), como o maraviroque que também impedem a entrada do HIV nas células humanas. Por último, existem os inibidores da integrase (INI), que evitam a integração do material genético do vírus no DNA celular (SILVA, 2011).

Existem ARV muito potentes que conseguem isoladamente interromper a replicação do HIV *in vitro*. Mas, *in vivo*, a monoterapia leva a falha no tratamento com desfechos que podem causar o desenvolvimento de resistência do HIV (SANCHE et al., 2017). Para resolução deste problema, foi introduzido o tratamento com terapia combinada de vários fármacos que devem atuar em múltiplos alvos virais, a terapia antirretroviral (TARV).

Atualmente, as recomendações dos principais esquemas de TARV incluem três fármacos (geralmente dois inibidores núcleos(t)ídeos da transcriptase reversa (INTR/INTTR) associados a uma outra classe (INNTR, IP ou INI) utilizados em dose única diária (SANCHE et al., 2017).

A TARV reduziu muito as mortes relacionadas à aids e às doenças oportunistas que podem surgir devido à baixa imunidade, aumentando a expectativa de vida das PVHIV. No entanto, essa melhoria veio acompanhada de outras complicações que podem ocorrer devido ao uso contínuo da TARV e o estado constante de inflamação, característica das PVHIV (NISHIJIMA et al., 2015).

A primeira diretriz brasileira para o tratamento do HIV (1996) indicava o uso da TARV só após o declínio da contagem de células T CD4+ para menos de 200 células por mililitro de sangue (BRASIL, 1997). Esse número subiu para 350 nas recomendações de tratamento publicadas em 2008 (BRASIL, 2008). Desde as diretrizes de 2014, a TARV é recomendada logo após o diagnóstico, independente de qualquer outro fator que antes era limitante, como o estado clínico ou imunológico do paciente (BRASIL, 2018).

Em 2014, o esquema inicial da TARV adotado no Brasil estava em consonância com a diretriz da OMS à época (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina + efavirenz). Essa associação, além de apresentar perfil de toxicidade favorável quando comparada à terapia anterior, que

usava zidovudina no lugar do fumarato de tenofovir desoproxila, permitiu a tomada diária de um único comprimido (Brasil, 2013).

Em 2017, o tratamento de primeira linha foi modificado para a associação de dois INTR/INTTR (lamivudina e o fumarato de tenofovir desoproxila) combinado com o INI dolutegravir sódico (Brasil, 2018). O dolutegravir foi incorporado ao esquema por apresentar menos efeitos adverso e consequentemente maior tolerabilidade que o efavirenz, e por possuir elevada barreira genética, o que dificulta a resistência do vírus (BRASIL, 2017b). O dolutegravir apresenta maior comodidade posológica (dose única diária) em relação ao raltegravir, que é o primeiro INI com mais tempo de uso em diversos países (BRASIL, 2017a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendava até recentemente como esquema de TARV de primeira linha para adultos a associação de três fármacos: fumarato de tenofovir desoproxila, emtricitabina ou lamivudina e efavirenz (OMS, 2016). Essa recomendação foi alterada em 2019 com a substituição do efavirenz pelo dolutegravir sódico (OMS, 2019).

Há recomendações, além do tratamento para inibir a replicação do HIV, de dois tipos de profilaxia para evitar a infecção pelo HIV: a profilaxia pós-exposição (PeP) e a profilaxia pré-exposição (PrEP).

No Brasil, a PeP é indicada nas primeiras 72h após a exposição ao HIV ou a algum ato de risco que pode ter a probabilidade de que tenha acontecido essa exposição. Para essas pessoas, é recomendado o uso do mesmo esquema terapêutico usado na TARV de primeira linha (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico), com exceção das mulheres grávidas ou com possibilidade de engravidar, quando se substitui dolutegravir sódico por atazanavir/ritonavir ou raltegravir. Em todos os casos o tratamento deve ser feito por um período de 28 dias (BRASIL, 2019).

Em 2012, o FDA (*Food and Drug Administration* dos Estados Unidos) aprovou a combinação de dois INTR, o fumarato de tenofovir desoproxila e a emtricitabina para uso na PrEP, em dose única diária, que reduz de risco do contágio em mais de 70%. Essa combinação foi

posteriormente aprovada em outros países, inclusive no Brasil, e é recomendada pela OMS (WAHL et al., 2017). Essa profilaxia é recomendada para pessoas com risco alto de infecção pelo HIV, e precisa de boa adesão para que seja eficaz (Cressey et al., 2017).

2. Fumarato de tenofovir desoproxila: metabolismo e farmacocinética

O fumarato de tenofovir desoproxila, um pró-fármaco do tenofovir em sua forma salina, é um dos INTR aprovados para o tratamento contínuo de infecções crônicas da hepatite B e do HIV, em combinação com outros ARV (NISHIJIMA et al., 2015). Antes de ser inserido como primeira escolha para o tratamento do HIV, esse medicamento já era usado em terapias alternativas para o HIV ou para tratamento da hepatite B em alguns países (COOPER et al., 2010). Atualmente ele é um dos INTR mais usados, e muitos países, inclusive o Brasil, o adotam como componente da TARV de primeira escolha para o tratamento do HIV e para a PreP (HAVENS et al., 2013). Os fatores que justificam essa escolha incluem o regime de uma dose diária e menor número de reações adversas e interações medicamentosas quando comparado a alternativas da mesma classe (RUNGTIVASUWAN et al., 2017).

Nos últimos anos o uso do fumarato de tenofovir desoproxila foi ampliado para o tratamento da hepatite B em locais com poucos recursos, como a África, sendo usado até em pediatria, embora não como tratamento de primeira linha (HALL, 2013; OMS, 2019). Nesse caso, assim como em pacientes idosos, o risco de efeitos adversos pode ser aumentado pela relação entre peso corporal, dose administrada e concentração plasmática que pode alcançar concentrações tóxicas (HALL, 2013).). No Brasil, esse medicamento está disponível apenas em comprimidos revestidos de 300 mg, que é a dose diária recomendada para adultos (Brasil, 2017b).

Em pH fisiológico, o tenofovir recebe dois elétrons formando um diânion que é muito polar, consequentemente levando a baixa biodisponibilidade do fármaco (cerca de 13%). Por esse motivo é

administrado na forma de tenofovir desoproxila, assim removendo as regiões carregadas eletronicamente e aumentando a lipofilicidade do fármaco. Para aumentar a solubilidade desse pró-fármaco no organismo este deve ser administrado em forma de sal, sendo o fumarato de tenofovir desoproxila o mais usado (KIM et al., 2017; MOSS et al., 2017).

O fumarato de tenofovir desoproxila tem uma biodisponibilidade de até 25% quando administrado em jejum e o tempo para atingir a concentração plasmática máxima de tenofovir varia entre 0,5 e 2h, tendo como média 0,79h e concentração máxima de $284,2 \pm 74,0$ ng/mL, dependendo da genética de cada indivíduo. Essa biodisponibilidade pode variar também devido a interações entre alguns fármacos com o tenofovir ou com proteínas (KIM et al., 2017).

O tenofovir (massa de 287 g/mol) tem caráter ácido com dois pKa de 3,8 e 6,7, o que é importante para definir o nível de protonação do fármaco no organismo (AGRAHARI e YOUAN, 2012). A biodisponibilidade oral do tenofovir tem dois limitantes: a glicoproteína P, que faz o transporte entre o lúmen intestinal e a corrente sanguínea, e a carboxilesterase que faz a degradação intestinal do fármaco. A maior parte da absorção acontece no duodeno e jejuno (MOSS et al., 2017).

Após a administração por via oral, o pró-fármaco é absorvido e sofre rapidamente hidrólise por esterase para formar o tenofovir, que está presente no plasma na forma livre ou ligado às proteínas plasmáticas. Depois de transportado para dentro da célula T CD4+, o tenofovir é difosforilado para difosfato de tenofovir que corresponde à sua forma ativa antiviral (HAVENS et al., 2013; WANGA et al., 2015). A Figura 4 mostra o comportamento e o metabolismo do tenofovir no organismo humano.

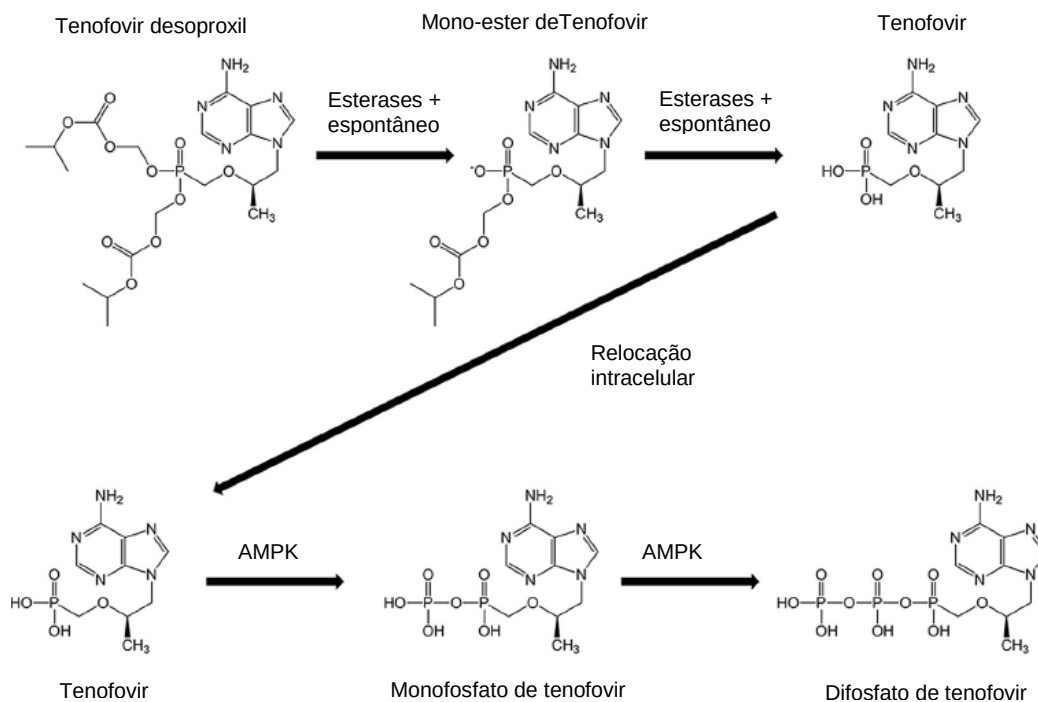


Figura 4. Estrutura química e processos bioquímicos até a formação da molécula ativa de tenofovir em humanos. AMPK = Quinase ativada pelo monofosfato de adenosina. Traduzido de MOSS et al, 2017.

O tempo de meia-vida de eliminação do tenofovir plasmático é de 17h e o difosfato de tenofovir tem meia-vida em torno de 90 horas nas células mononucleares do sangue periférico (BAHETI et al., 2011; CRESSEY et al., 2017). É essa longa meia-vida da forma ativa do tenofovir que permite a ingestão de apenas uma dose diária do medicamento (BARKIL et al., 2007). As técnicas de quantificação de difosfato de tenofovir foram aperfeiçoadas após a descoberta destes metabólitos nos eritrócitos permitindo quantificá-las em manchas de sangue seco (SCHAUER et al., 2018). A principal via de eliminação do tenofovir é a renal, com 70 a 80% do fármaco excretado de forma inalterada na urina, e de 20 a 30% eliminados pela via hepática pela bile. Alguns pacientes podem ter pequenos picos secundários de concentração de tenofovir no intervalo de 6 a 10h devido a reabsorção entero-hepática (KIM et al., 2017).

A eliminação renal acontece por uma combinação de dois mecanismos: filtração glomerular e secreção tubular ativa (POIZOT-MARTIN

et al., 2013), que se inicia com a entrada do seu metabólito nas células do túbulo proximal. Essa etapa é mediada por dois transportadores de ânions inorgânicos (OAT1 e OAT2) e a secreção tubular desse fármaco para o lúmen acontece principalmente por proteínas resistentes a multidrogas (MRP2 e 4), e a competição pelo sítio desse transportador diminui a excreção do tenofovir (WANGA et al., 2015). Goicoechea et al. (2010) afirmaram que variações genéticas nesses transportadores podem ser associados à diminuição da depuração de creatinina (ClCr) de pacientes tratados com fumarato de tenofovir desoproxila, embora Sirirungsi et al. (2015) não tenham confirmado esses achados. A depuração de tenofovir pode ser estimada a partir da creatinina sérica, usando outras características, como idade, sexo, peso e etnia (BAHETI, et al., 2011).

O mecanismo de ação do tenofovir consiste em inibir polimerases do DNA viral, a transcriptase reversa viral, impedindo o vírus de alongar e replicar o seu material genético e, conseqüentemente, interrompe a replicação viral (KIM et al., 2017). Essa inibição acontece em macrófagos e células T CD4+ que não estejam em processo de divisão celular. Para que possa produzir esse efeito, o tenofovir deve estar na sua forma ativa, que é a difosforilada. Isto pode ser considerado uma vantagem em comparação com outros fármacos ARV com o mesmo mecanismo, que são trifosforilados, e a fosforilação é fator limitante da sua atuação (BAHETI, et al., 2011).

O uso concomitante de outros medicamentos, inclusive os outros componentes da TARV, pode afetar de maneira substancial a farmacocinética do tenofovir, levando a mudança no perfil de concentração plasmática. Uma classe de medicamentos conhecida por aumentar as concentrações de tenofovir são os IPs, como o atazanavir, darunavir e lopinavir, provavelmente devido à inibição da glicoproteína P, que tem como substrato o fumarato de tenofovir desoproxila (BAHETI et al, 2011). Outros fármacos que podem aumentar as concentrações plasmáticas do tenofovir são moduladores da atividade das OATs, resultando em menor excreção do tenofovir. A lamivudina e o dolutegravir sódico não afetam nenhuma das

duas vias citadas acima para modular e aumentar as concentrações plasmáticas de tenofovir (BEGLEY et al., 2018).

Outros medicamentos que não fazem parte da TARV também podem interagir com o tenofovir, alterando as suas concentrações plasmáticas ou potencializando algum efeito adverso do fármaco. Fenitoína, fenobarbital, modafinila e carbamazepina podem reduzir os níveis sanguíneos de tenofovir por meio da indução da glicoproteína P, diminuindo a sua biodisponibilidade oral (DRUGS, 2019).

Vancomicina, aciclovir e seus derivados, tobramicina, tacrolimus, estreptomicina, polimixina B, neomicina, anti-inflamatórios, metotrexato, lítio, ganciclovir, gentamicina, ciclosporina, ciclofosfamida, cisplatina, e anfotericina B podem aumentar o risco de problemas renais relacionados ao uso de tenofovir (DRUGS, 2019).

3. Alterações renais associadas ao uso de tenofovir

Alguns medicamentos usados para tratar a infecção pelo HIV podem estar associados ao risco aumentado de doença renal crônica ou ao declínio na taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) (MOCROFT et al., 2016). Já foi mostrado que alguns INTRs, como o fumarato de tenofovir desoproxila e IPs podem induzir a diminuição da função renal. Exemplo disso é o indinavir, um IP, que provocava cálculos cristalinos renais, e foi substituído por medicamentos mais seguros e o atazanavir, que pode causar nefrite intersticial aguda (ANDO & YANAGISAWA, 2015).

Embora ensaios clínicos de fase III tenham comprovado que o fumarato de tenofovir desoproxila é altamente eficaz, seguro e bem tolerado, seu uso em pequena parcela da população pode estar associado à toxicidade óssea, endócrina e renal. Esses efeitos adversos podem limitar a sua utilização ou exigir a monitorização clínica constante dos usuários (HALL, 2013 e COOPER et al., 2010). O declínio da função renal pelo uso contínuo por pacientes mais sensíveis pode não ser revertido após interrupção do tratamento (HALL, 2013).

Em ensaios clínicos com PVHIV os critérios de seleção da população muitas vezes podem excluir pessoas com idade avançada, com estágios mais avançados da aids e pacientes que já tenham alguma, mesmo que pequena, disfunção renal. Alguns estudos usam um grupo de pessoas relativamente saudáveis, com risco de disfunção renal menor quando comparado à população como um todo (COOPER et al., 2010). Nos ensaios de eficácia controlados com placebo, os participantes geralmente são jovens (25-35 anos) e pessoas com diferentes riscos de declínio renal não são incluídos (GANDHI et al., 2016).

Nos Estados Unidos, o FDA liberou o uso de fumarato de tenofovir desoproxila para pacientes entre 12 e 18 anos com mais de 35 kg. Um dos fatores de risco para o uso desse medicamento é o baixo peso corporal, pois o índice terapêutico menor aumenta o risco de efeitos adversos nesses pacientes (HALL, 2013).

Nishijima et al. (2015) e Hall (2013) mostraram que o uso do fumarato de tenofovir desoproxila está associado a pequenos declínios na taxa da filtração glomerular, possivelmente por uma disfunção no túbulo proximal relacionado à toxicidade mitocondrial, em alguns casos podendo levar a síndrome de Fanconi ou uma lesão renal aguda. Embora o mecanismo exato da nefrotoxicidade induzida pelo tenofovir não seja totalmente compreendido, essa toxicidade mitocondrial nas células tubulares renais proximais tem sido considerada a principal causa do decréscimo da função renal relacionado a esse medicamento (NISHIJIMA et al., 2015 & HALL, 2013). O adefovir e cidofovir, de estruturas químicas similares, também são conhecidos pela sua nefrotoxicidade (HALL, 2013 & COOPER et al., 2010).

Vários fatores tornam os rins particularmente vulneráveis a efeitos adversos de xenobióticos, incluindo os fármacos. O alto fluxo sanguíneo renal (20% do rendimento cardíaco) leva à bioconcentração dessas substâncias no ultrafiltrado pela absorção de água e de solutos, que pode permitir a cristalização. Adicionalmente, a reabsorção ou secreção de xenobióticos permite altas concentrações no interior das células epiteliais

tubulares o que pode causar injúrias a essas células. Desta forma, pode-se pressupor que é provável que ocorra toxicidade renal como resultado da exposição prolongada a ARV. O Quadro 1 mostra algumas alterações renais potenciais com o uso prolongado da TARV (FINE & GALLANT, 2013).

Quadro 1 - Terapia antirretroviral e possíveis efeitos adversos renais em pessoas vivendo com HIV.

Tratamento	Doenças renais agudas associadas
Tratamento antirretroviral combinado	Nefrotoxicidade
Inibidor de integrase	Rabdomiólise / nefropatia pigmentosa
Nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa	Nefrolitíase; nefrite intersticial; rabdomiólise
Não nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa	Nefrolitíase
Inibidor de protease	Nefropatia induzida por cristais
Fumarato de tenofovir desoproxila	Necrose tubular aguda; Síndrome de Fanconi; diabetes <i>insipidus</i> nefrogênica

Adaptado de LUM et al. (2015)

Os dados epidemiológicos sobre os efeitos renais do fumarato de tenofovir desoproxila são controversos, tanto quanto ao declínio da função renal quanto ao tempo de exposição em relação ao aparecimento de efeitos renais (HALL et al., 2013). Cooper et al. (2010) relataram que embora os efeitos do tenofovir nos valores de filtração glomerular sejam pouco significativos quando observado em grandes populações, alterações importantes foram observadas em alguns indivíduos que têm risco aumentado de lesão renal aguda e aumento significativo da incidência de insuficiência renal crônica com necessidade de diálise (COOPER et al., 2010). Um estudo com quase 50.000 participantes nos Estados Unidos,

encontrou associação entre o fumarato de tenofovir desoproxila e problemas renais, incluindo proteinúria, doença renal crônica e declínio rápido da taxa de filtração glomerular (RYOM, et al. 2013).

Alguns estudos clínicos com o fumarato de tenofovir desoproxila mostram que o maior declínio da razão entre ClCr e a taxa de filtração glomerular estimada (ClCr/TFGe) ocorre no início da terapia, entre o segundo e o terceiro mês (HALL, 2013). Mas esses estudos são de curta duração e não acompanharam os participantes por tempo suficiente para registrar a ocorrência de doença renal crônica. Além disso, apresentam critérios de exclusão bem rigorosos que podem excluir pessoas com alto risco de doença renal crônica (HALL, 2013; MOCROFT et al., 2016).

Outros estudos, principalmente observacionais, confrontam esta verificação mostrando que pacientes com tempo maior de uso de fumarato de tenofovir desoproxila tem perda de função renal de maior grau quando comparados a pacientes com tempo curto de tratamento (COOPER et al., 2010; MOCROFT et al., 2016). Gandhi et al. (2016) também observaram um declínio da função renal associado ao tempo de uso de fumarato de tenofovir desoproxila, relacionado a aumento da idade ou à função renal basal diminuída.

Vários modelos preditores do risco de dano renal devido ao uso de fumarato de tenofovir desoproxila são ajustados, pois diversos fatores podem fazer com que a TFGe fique abaixo de 70 mL/min, como a idade, sexo, diabetes, modo de transmissão, primeira doença definidora de aids, contagem atual de células T CD4+, hipertensão, exames positivos para hepatite viral B ou C, carga viral, alto nível de base da creatinina sérica, fatores de risco cardiovascular, e uso de outros medicamentos nefrotóxicos (RYOM, et al. 2013; NISHIJIMA, et al. 2011). Foi demonstrado também que depuração de creatinina abaixo de 50 mL/min causa aumento significativo da concentração de tenofovir o que pode desencadear muitos efeitos adversos não apenas renais, e exigir ajuste de dose nessa subpopulação que é predominantemente constituída de pessoas idosas (JULLIEN et al., 2005).

Vários estudos apresentados por Hall (2013) em revisão sistemática mostraram que após a interrupção do uso do tenofovir, a maioria das PVHIV teve uma melhora substancial, no entanto nem todos recuperaram a função renal o que pode aumentar a taxa de mortalidade cardiovascular em pacientes portadores do HIV (HALL, 2013).

Ando & Yanagisawa (2015) desenvolveram algoritmo de rastreamento para detectar e manejar de forma rápida e prática PVHIV com potencial para desenvolver doença renal crônica. O algoritmo faz primeiramente triagem dos fatores que indicam risco maior de algum problema renal, em seguida apresenta os fatores para analisar se a função renal está realmente diminuída e a partir daí direciona as medidas cabíveis de tratamento (Figura 5).

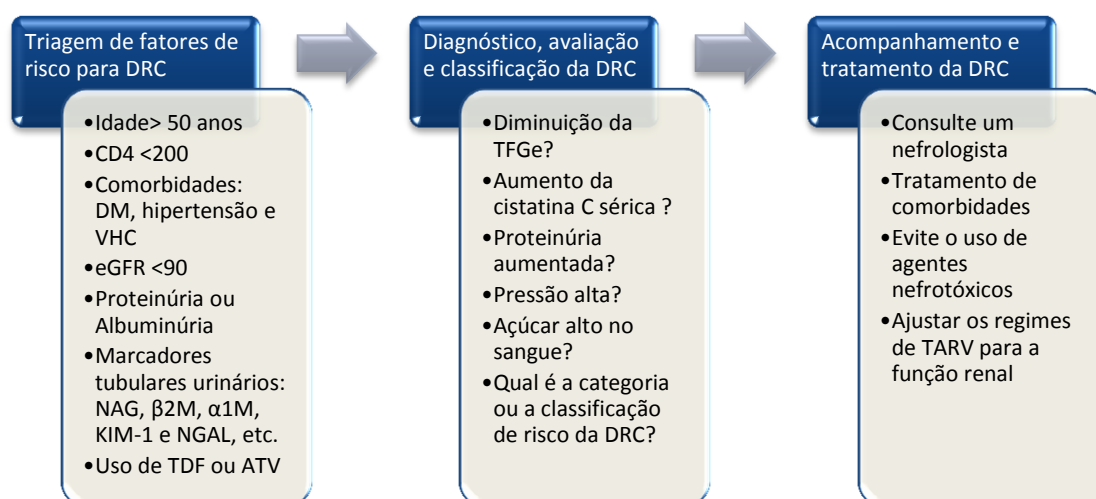


Figura 5. Fluxograma para manejo da doença renal crônica em PVHIV. Adaptado de Ando & Yanagisawa, 2015.

4. Monitoramento da função renal

A Associação Médica da Sociedade das Doenças Infecciosas dos Estados Unidos recomenda que os pacientes em uso de tenofovir devam ter a função renal avaliada a cada seis meses, incluindo a taxa de filtração glomerular e o fosfato sérico (HALL, 2013). Também é recomendada a realização de urinálise e avaliação da função glomerular quando ocorrer o diagnóstico da infecção pelo HIV (ANDO & YANAGISAWA, 2015). Esses exames tem um custo importante e nem sempre podem ser usados em países de menor renda, sendo substituído por exames mais baratos, como a creatinina sérica.

A dosagem de creatinina sérica é usada para o cálculo da ClCr e taxa estimada de filtração glomerular (TFGe), sendo o exame mais empregado para medir a função renal (HALL, 2013). A depuração de creatinina, parâmetro recomendado para o monitoramento de segurança pelas diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), pode ser estimado usando a equação de Cockcroft-Gault, e a TFGe pode ser calculada com a equação de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD) (GANDHI et al., 2016). Medidas de creatinina, excreção fracionada de fosfato e glicose são testes menos sensíveis para detecção de problemas renais, mas são relativamente baratos, amplamente disponíveis e muitas vezes usados como substitutos (HALL, 2013). Mesmo a hipofosfatemia, que ocorre em 100% das disfunções tubulares ocasionadas pelo tenofovir, é de baixa especificidade (JULLIEN et al., 2005).

A albumina é um biomarcador simples e confiável de injúria renal quando aparece como excreção persistente na urina, e a albuminúria pode ser um fator de risco independente para mau prognóstico para PVHIV, mas o custo limita seu uso (ANDO & YANAGISAWA, 2015). A medição de proteínas urinárias de baixo peso molecular pode ser útil para a detecção precoce de PVHIV com alto risco de doença renal crônica, pois, aproximadamente um quarto dessas pessoas pode apresentar lesão tubular renal leve ou moderada sem a presença de disfunção renal, mas que pode

progredir para diminuição da filtração glomerular (ANDO & YANAGISAWA, 2015).

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos do Brasil (2017) recomenda medir a creatinina sérica, calcular a TFG_e e realizar exames básicos de urina para avaliar a função renal com periodicidade de três a seis meses para pessoas em uso de fumarato de tenofovir desoproxila (BRASIL, 2017a).

5. Quantificação plasmática de fármacos

Estudos em humanos apontaram que a nefrotoxicidade devido ao uso do pró-fármaco de tenofovir pode ser dependente da concentração do fármaco no plasma sanguíneo, que é determinado principalmente pela dose ingerida, o volume de distribuição e a taxa de excreção renal. Por exemplo, baixo peso corporal está relacionado à menor volume de distribuição com consequente aumento do risco de toxicidade; assim como indivíduos com problemas renais, ou com idade mais avançada também podem ter maior risco (HALL, 2013).

A concentração plasmática do tenofovir pode ser elevada em mais de 30% em combinação com outros medicamentos, entre eles os presentes na TARV. Uma vez que os regimes terapêuticos estão amplamente utilizados, há dificuldade para separar esses efeitos e descobrir sinergismos (FINE & GALLANT, 2013).

Uma dúvida que pode surgir é a de qual dos metabólitos ou o próprio pró-fármaco do tenofovir deve ser quantificado no plasma humano, mas como o seu pró-fármaco é hidrolisado logo que é absorvido, inviabilizando a sua dosagem no plasma e a sua forma ativa difosfato fica predominantemente no interior celular, o tenofovir é a forma ideal para quantificação no plasma (DELAHUNTY et al., 2009)

A quantificação de fármacos e seus metabólitos pode ser feita em vários tipos de amostras biológicas, como plasma, soro, cabelo, urina e

saliva (SEIFERT et al., 2018). Essa quantificação desempenha papel importante na avaliação e interpretação da biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética e possíveis efeitos tóxicos. O biomonitoramento de fármacos e seus metabólitos também são de interesse crescente para o campo de monitoramento da adesão, dadas as limitações da adesão autorreferida (GANDHI et al., 2016). Os métodos de análise devem ser validados para que os resultados produzidos sejam confiáveis e possam ser interpretados e reproduzidos em qualquer laboratório, apresentando especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, exatidão e limite de quantificação adequado (MAINARDES & GREMIÃO, 2009).

Uma etapa crucial para quantificação do analito é o preparo da amostra, que tem como objetivo o isolamento seletivo do analito da matriz, retirando o máximo possível de interferentes (KOLE et al., 2010). A precipitação de proteínas é um dos métodos mais usados na extração do analito devido ao seu baixo custo e simplicidade. Esse método consiste basicamente na adição à amostra de um solvente orgânico que seja miscível na matriz, geralmente acetonitrila ou metanol e centrifugação para separar as proteínas. Geralmente esse processo de limpeza é suficiente para ser usado em LC-MS ou LC-MS/MS (MA et al., 2007).

A extração líquido-líquido consiste no uso de dois líquidos imiscíveis para separação do analito das impurezas presentes na matriz. Uma limitação dessa técnica é a co-extração de outros componentes da matriz que pode interferir na quantificação do analito (KOLE et al., 2010).

A extração em fase sólida (SPE) consiste na separação do analito de interesse num cartucho contendo uma fase normal ou reversa, baseado nas propriedades físico-químicas de cada composto. Uma limitação desse método seria para compostos polares que geralmente são co-eluídos com a maioria dos outros componentes da matriz (KOLE et al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou LC) é o método mais empregado para quantificação de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas, normalmente utilizando colunas de fase reversa (C18). Os métodos mais antigos empregavam detectores de ultravioleta (HPLC-UV),

mas os mais recentes utilizam detectores de espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS). Na técnica LC-MS/MS é possível usar um método de reações múltiplas, que proporciona alta seletividade e sensibilidade mesmo nas análises de matrizes complexas em que interferentes podem estar em concentrações elevadas, sendo possível técnicas de extração simples (ENEAS, 2014).

Bezy et al. (2005) desenvolveram um método para quantificação simultânea de fármacos, inclusive o tenofovir, componentes de diversas TARV usando HPLC-UV, após o preparo da amostra por extração em fase sólida para esse método. Eneas (2014) validou um método em LC-MS/MS para quantificação em plasma de tenofovir e dois outros constituintes da TARV após precipitação de proteínas com acetonitrila. O mesmo método de precipitação foi utilizado por Takahashi et al. (2007) para quantificação de tenofovir por LC-MS, utilizando fase móvel com gradiente, o que torna o método mais dispendioso e demorado se comparado à fase móvel isocrática.

Outros métodos para quantificação de tenofovir isolado ou em conjunto com os outros fármacos da TARV estão resumidos na Tabela 1. Na maioria deles, as curvas analíticas são construídas a partir de uma concentração de 10-30 ng/mL de tenofovir.

Tabela 1 – Características de métodos utilizando cromatografia líquida de determinação de medicamentos da TARV contendo tenofovir.

Referência	Fármacos	Matriz	Método de preparação da amostra	Fase móvel	Coluna cromatográfica	Vazão (mL/min)	Eluição	Deteção	Padrão interno	Curva analítica (ng/mL)
Bezy et al. (2005)	ddC, 3TC, ddl, d4T, CBV, AZT e tenofovir	Plasma de ratos	SPE	Tampão de ácido acético/ hidroxialanina	Atlantis®-dC-18	0,2	NI	UV (260 nm) e LC - MS/MS	NI	30-10000
Sentenac et al. (2003)	Tenofovir	Plasma humano	SPE	Tampão de Na ₂ HPO ₄ 15mM 10 mM TBA / ACN	Coluna de fase reversa Symmetry Shield RP ₁₈ Waters®	1,0 - 1,3	gradiente	UV (259 nm)	NA	10-4000
Barkil et al. (2007)	Tenofovir	Plasma humano	SPE	Acetato de amônio / metanol (pH 2,5) (98,5: 1,5 v/v)	Atlantis®-dC-18	0,6	isocrática	UV (260 nm) e MS	3-metilciticidina	10-1000
Kou et al. (2012)	Tenovofir	Plasma humano	SPE	Tampão de fosfato de sódio / ACN / solução de TBA (90:10:0,3)	SHIMADZU Shim-pack CLC-ODS C18	1,0	isocrática	UV (262 nm)	tegafur	20-2000
Takahashi et al. (2007)	Tenofovir	Plasma humano	Precipitação de proteínas com ACN	TFA 0,3% / ACN / Tampão de acetato de amônio	Sunfire C18 (Waters®)	0,2	gradiente	LC-MS	atenolol	19-1567
Gomes et al. (2008)	Tenofovir e emtricitabina	Plasma humano	SPE	Tampão de acetato de amônio / ACN	Chromolith Speed Rod C18	0,7	isocrática	LC-MS/MS	lamivudina	10-600
Delahunty et al. (2009)	Tenofovir e FTC	Plasma humano	Precipitação de proteínas com TFA	3% acetonitrila / 1% ácido acético aquoso	Synergi Polar-RP, de fase reversa de 2,0 x 150 mm	0,5	isocrática	LC-MS/MS	Isótopos marcados	10 - 1500
Zheng, et al. (2013)	Tenofovir e emtricitabina	Manchas de sangue seco	Precipitação de proteínas com etanol	0,1% ácido fórmico em 0,5% ACN E 99,5% água milli-Q	Synergi Polar RP 2,5µM, Phenomenex®	0,25	isocrática	LC-MS/MS	Isótopos estáveis	2,5-1000
Eneas (2014)	Tenofovir, 3TC, EFV	Plasma humano	Precipitação de proteínas com ACN	Ácido fórmico 0,05%:MeOH	Ciano Zorbax SB-CN	1,0	gradiente	LC-MS/MS	aciclovir	100 - 1000

NI = Não informado; NA = Não aplicável; TBA = tetrabutilamônio; SPE = extração em fase sólida; 3TC = Lamivudina; EFV = Efavirenz; FTC = Emtricitabina; TFA = ácido trifluoracético; UV = Ultravioleta; MS = espectrometria de massas; ddC= zalcitabina; ddl = Didanosina; d4T = estavudina; CBV = Carbovir; AZT = Zidovudina; ACN = Acetonitrila

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Determinar as concentrações plasmáticas de tenofovir e possíveis alterações da função renal em pessoas vivendo com HIV que utilizam fumarato de tenofovir desoproxila e são atendidas no Hospital Universitário da Universidade de Brasília.

2. Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar e validar o método para quantificação de tenofovir no plasma humano.
- ✓ Descrever as características sociodemográficas e clínicas da população do estudo
- ✓ Avaliar os dados de dosagem de creatinina sérica da população antes e após o uso de fumarato de tenofovir desoproxila.
- ✓ Determinar a concentração plasmática de tenofovir na população do estudo e investigar possíveis correlações

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Local, período de estudo, desenho do estudo, população alvo

O estudo foi realizado no Hospital Universitário de Brasília (HUB/UNB), uma das unidades de referência no Distrito Federal para atendimento de PVHIV, que oferece atendimento, ambulatorial e na internação, integral e multiprofissional, com consultas médicas e exames de diagnóstico, consulta de enfermagem, psicologia, serviço social e farmacêutica. O atendimento farmacêutico é realizado na Farmácia Escola, que também dispensa os medicamentos da TARV.

Este estudo é do tipo transversal e experimental com PVHIV adultas em uso da TARV de primeira linha de tratamento (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico).

Foram considerados critérios de inclusão adultos com sorologia positiva para HIV que são atendidos no ambulatório do HUB (consulta médica e dispensação de medicamentos) em uso da TARV por pelo menos sete semanas. Esse período foi escolhido porque o tempo mínimo necessário para garantir concentrações seguras e estáveis de tenofovir é de seis semanas (CRESSEY et al., 2017). Aqueles que concordaram em participar da etapa de coleta de sangue assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

A adesão dos participantes à TARV foi avaliada por meio do acompanhamento farmacoterapêutico realizado pela Farmácia Escola nos seis primeiros meses de tratamento, ou por meio de questionário para participantes com tempo de uso maior que esse.

Os critérios de exclusão foram pessoas que tiveram mudança da TARV para outro esquema que não fosse o de primeira linha adotado no Brasil, pessoas que abandonaram o tratamento e pessoas cujos dados clínicos não estavam disponíveis e/ou que não realizaram os exames de controle preconizados pelo protocolo de tratamento.

2. Recrutamento dos participantes e coleta dos dados clínicos e sociodemográficos

A Farmácia Escola do HUB/UNB realiza cerca de 700 atendimentos de PVHIV por mês, e no período de maio a julho de 2018 foram atendidas 1087 pessoas diferentes, sendo que dessas, aproximadamente 500 usavam a TARV de primeira linha. Em média, dez pessoas iniciavam o tratamento para HIV nessa unidade por mês. Esses dados foram utilizados para estimar o número de aproximadamente 60 PVHIV em início de tratamento durante os seis meses de recrutamento. No entanto, após os primeiros cinco meses do estudo foram incluídas PVHIV que já usavam essa TARV há mais tempo ou que eram experimentadas com outros esquemas.

Considerando esses critérios foi realizada amostragem de conveniência em que os participantes elegíveis foram identificados a partir de consulta ao Siclom (Sistema de Controle Logístico de Medicamentos) da Farmácia Escola do HUB e foram recrutados entre os meses de agosto de 2018 a abril de 2019, na mesma ocasião da consulta farmacêutica ou consulta médica. Nesse último caso, foram consultadas as agendas do sistema AGHU (Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários) para identificar as datas de consulta.

Os pesquisadores esclareceram os participantes quanto aos objetivos do estudo e os convidaram a participar. Aqueles que aceitaram, assinaram o TCLE e receberam informações escritas sobre o local e procedimentos necessários para a coleta de sangue, além de pedido de exame para determinação plasmática de tenofovir (emitido por médico do serviço). A coleta de sangue foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do HUB/UNB por técnicos do serviço.

Foram coletados dados dos participantes relativos ao tratamento durante a etapa de recrutamento (horário de tomada da TARV e horário da última dose). Dados sociodemográfico (sexo, procedência, idade, altura e peso) e local de dispensação da TARV foram obtidos do prontuário do paciente ou do Siclom. A procedência dos participantes foi classificada de

acordo com as regiões de saúde do DF, mostradas na Figura 6, sendo importante ressaltar que o HUB/UNB é hospital de referência para região leste de saúde. Data de início e esquema de TARV inicial e em uso, resultados de contagem de T-CD4+, carga viral (CVir) foram obtidos do Siclom, e dados de creatinina foram obtidos do Complab (sistema usado pelo Laboratório de Análises Clínicas do HUB/UNB). As fichas de acompanhamento farmacoterapêutico da Farmácia Escola também foram consultadas para obter dados de adesão e outras informações sobre o tratamento.



Figura 6. Regiões de saúde do DF com suas respectivas regiões administrativas. Fonte: Brasília, 2018

A depuração ou *clearence* de creatinina (ClCr) foi estimada por meio da fórmula de Crockroft & Gault. Observa-se que a fórmula é diferente para homens e mulheres, para as quais o resultado é multiplicado por 0,85, conforme mostra a Equação 1.

$$ClCr \left(\frac{mL}{min} \right) = \frac{(140 - idade) \times peso}{72 \times creatinina\ sérica} \times (0,85 \text{ para mulher})$$

Equação 1

A Figura 7 resume o processo de recrutamento dos participantes do estudo.

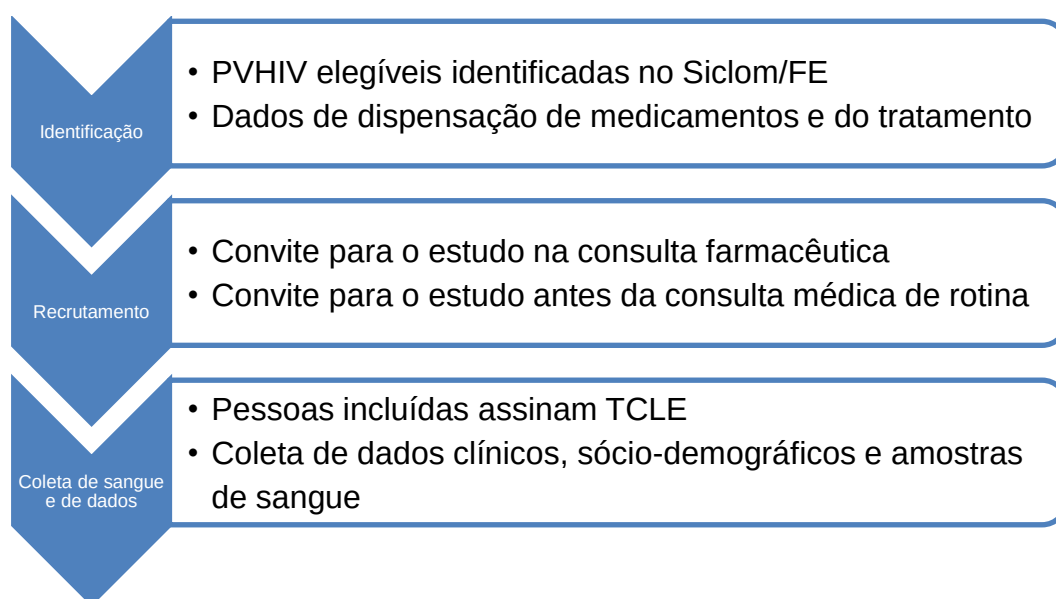


Figura 7. Resumo esquemático do processo de recrutamento das PVHIV.

3. Coleta do material biológico e processamento das amostras

Aproximadamente 3,5 mL de sangue foram coletados dos participantes por punção venosa após assepsia em tubos contendo heparina de lítio e transportado para o LabTox (Laboratório de Toxicologia da UnB) para determinação de tenofovir. O sangue foi centrifugado em 5870 g por 15 min e o plasma obtido foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

A otimização e validação do método analítico para determinação de tenofovir em plasma foi realizada com um *pool* de plasma de seis voluntários saudáveis que não usavam o medicamento ou outros medicamentos para tratar o HIV, sendo dois homens e quatro mulheres (uma grávida). Foi retirado em torno de 10 mL de sangue de cada voluntário. Nesse estudo, esse material foi denominado como plasma branco.

4. Determinação de tenofovir em plasma

4.1 Preparo das soluções para curva de calibração

O padrão de tenofovir monoidratado foi adquirido da Farmacopeia Americana (USP), grau de pureza 100%, lote R044C0. Para o preparo da solução-mãe, o padrão (14,11 mg) foi diluído em 10 mL de solução aquosa de acetonitrila a 0,5% utilizando balão analítico calibrado (Laborglass®). A solução (1,41 mg/mL) foi armazenada em frasco de vidro a -20°C.

A partir da solução-mãe, foi preparada uma solução estoque (141 µg/mL) e a partir dessa, soluções de trabalho com concentrações de 1 e 5 ng/mL, utilizando pipetas Hamilton calibradas de volume máximo 200 µL. Todas as soluções de trabalho e estoque foram armazenadas em frascos de vidro a -20°C.

4.2 Determinação de tenofovir por HPLC-UV

As análises por HPLC-UV foram feitas em um sistema Shimadzu® (Japão) com injetor automático SIL-20SA, sistema degaseificador DGU-20A, sistema de bomba quaternária LC-20AT, forno CTO-20SAC, detector SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e software LC solution® em comprimento de onda de 257 nm. A coluna usada de fase reversa (C18) foi da marca Phenomenex Gemini 5 µm, com tamanho 150 x 4,60 mm.

4.2.1 Preparo da fase móvel

O tenofovir é uma molécula com característica polar bem acentuada e pKa 3,74. Como a coluna C18 tem característica apolar, é necessário que o pH da fase móvel seja menor que 3,7 para que a maior parte do analito possa interagir com a coluna, possibilitando a separação cromatográfica. A acidificação da fase móvel polar (H₂O MilliQ, Millipore®) foi feita com ácido acético glacial (2,5 - 3%) (J.T. Baker®), e o pH medido em pHmetro AJX-512 (AJMicronal®) foi menor que 2,5.

A fase orgânica foi acetonitrila (Sigma-Aldrich®), sendo testadas as concentrações de 3%, 5%, 7,5% e 10%. As fases foram filtradas a vácuo em

membrana de 0,45 µm (Millipore®) e degaseificados no ultrassom antes do uso.

4.2.2 Desenvolvimento do método de extração

O método de extração do tenofovir utilizado foi adaptado do descrito por Éneas et al. (2014) para determinação de fármacos utilizados no tratamento de HIV em plasma humano, que se baseia numa etapa única de precipitação das proteínas plasmáticas com acetonitrila.

Primeiramente, foi adicionado 300µL de acetonitrila a 150µL de plasma sanguíneo em tubo Eppendorf. A mistura foi agitada em agitador de tubos modelo VX-200 (Labnet®) por 1 min e o tubo levado à centrífuga Rotina 380R (Hettich®) por 20 min em 5870 g; 300µL do sobrenadante foram filtrados em filtro de seringa MILLEX® (0,45µm) e 20µL injetado no HPLC-UV. Foi realizada ainda uma modificação desse método, quando o sobrenadante foi seco em fluxo de nitrogênio e ressuspendido em água antes da injeção no HPLC-UV.

Foram feitos testes também de extração em fase sólida (SPE C18, Applied separations®) baseado no método descrito por Barkil et al. (2007). O cartucho de SPE foi primeiramente lavado com 3 mL de metanol (J.T.Barker®) e 3 mL de uma solução de 0,6% de ácido trifluoroacético (TFA, Riedel-deHaën®) em água. Após o condicionamento do cartucho foi acrescentado 1 mL de plasma humano (nesse processo deve se aplicar vácuo acima de 10 mmHg para que o plasma passe pelo cartucho). O cartucho foi lavado duas vezes com 2 mL da solução de 0,6% de TFA, e o analito eluído em 1 mL de metanol. O metanol foi evaporado em fluxo de nitrogênio, ressuspenso em 1 mL de água e 20 µL injetado no HPLC-UV.

Com objetivo de avaliar a seletividade do método, ou seja, se outros medicamentos da TARV não tinham mesmo tempo de retenção do tenofovir, foram feitas injeções com soluções preparadas com comprimidos contendo lamivudina e dolutegravir sódico. Esses comprimidos foram doados pela Farmácia Escola do HUB/UNB, obtidos de caixas devolvidas pelos usuários por troca de esquema terapêutico.

Curvas analíticas de tenofovir foram preparadas em água e plasma branco nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL.

4.3 Determinação de tenofovir por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS foram realizadas em um sistema Shimadzu®, equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e módulo comunicador CBM-S0A acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo 4000QTRAP, AB SCIEX (EUA) com fonte Turbo Ion Spray® e software Analyst®. A coluna usada foi a mesma descrita anteriormente (Phenomenex Gemini® 5µm, 150 x 4.60 mm).

Nesse método, o aciclovir foi utilizado como padrão interno (PI) por ter estrutura semelhante ao do analito tenofovir (Figura 8), e que também foi utilizado por Éneas et al. (2014).

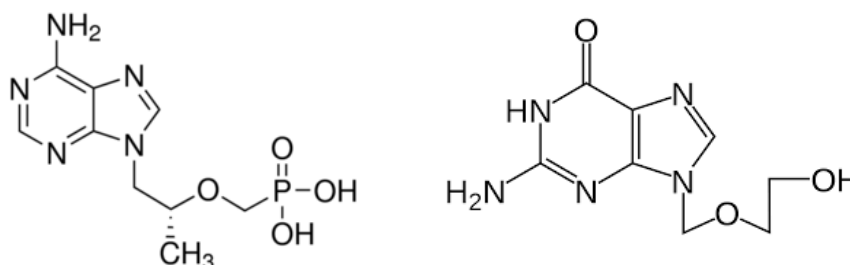


Figura 8. Estrutura química de tenofovir (esquerda) e de aciclovir.

O padrão de aciclovir foi doado pelo Instituto de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), sendo uma substância química de referência da Farmacopeia Brasileira (Lote 1021, grau de pureza 100%).

4.3.1 Preparo da fase móvel e das soluções padrão

A acidificação da fase móvel polar (H₂O MilliQ ultrapura sistema MilliQ gradiente CR, Millipore®) foi feita com ácido fórmico (0,1%) (Sigma-Aldrich®). A fase orgânica foi acetonitrila (J.T.Baker®), com concentração de

3%, a mesma que obteve melhor desempenho no HPLC-UV. As fases foram filtradas a vácuo em membrana de 0,45 µm (Millipore®) e degaseificados no ultrassom antes do uso.

As soluções de tenofovir foram preparadas como descrito anteriormente (4.1). A solução estoque de aciclovir foi preparada pesando-se 10,68 mg em balança analítica Shimadzu® AUW220D e diluindo-se em 10 mL de solução aquosa de acetonitrila a 0,5% utilizando balão analítico calibrado (Laborglass®). Essa solução foi usada para preparar a solução de trabalho na concentração de 5 ng/mL. Todas as soluções de trabalho e estoque preparadas foram armazenadas em frascos de vidro a -20°C.

4.3.2 Otimização dos parâmetros no LC-MS/MS

Primeiramente, foi gerado um método MRMs (*multiple reaction monitoring*) para os analitos tenofovir e aciclovir para identificar os íon precursores e seus fragmentos mais abundantes. Foram selecionados três íons-produto para a detecção de cada analito, sendo o de maior intensidade usado para quantificação e os outros dois usados para confirmação da identidade. Esse método foi otimizado usando uma solução de 50 ng/mL de tenofovir ou aciclovir em acetonitrila: água (50:50) com adição de 0,1 % de ácido fórmico (Sigma-Aldrich®). Os parâmetros da fonte de íons para cada analito foram otimizados utilizando uma solução 5 ng/mL de cada analito. Os parâmetros otimizados foram: *collision gas*, *curtain gas*, *gas 1/ nebulizer*, *gas 2/ turbo gas*, *ionspray voltage* e temperatura.

Curvas analíticas de tenofovir foram preparadas em água e plasma branco nas concentrações 5, 10, 20, 50, 100 e 200 ng/mL.

4.3.3 Método de extração

O método de extração do tenofovir utilizado foi o mesmo descrito anteriormente para análise por HPLC-UV (4.2.2), com precipitação das proteínas com acetonitrila; após centrifugação, 300µL do sobrenadante foram filtrados em filtro de seringa, seco em fluxo de nitrogênio, ressuspendido em água e 20µL injetado no LC-MS/MS.

5. Validação do método analítico LC-MS/MS otimizado

O Limite de quantificação (LOQ) do equipamento foi determinado pela menor concentração testada (em plasma branco) que apresentou resposta (área do pico) dez vezes maior que o ruído, segundo preconiza a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

A seletividade do método foi testada a partir da comparação de cromatogramas obtidos a partir da leitura do plasma branco sem adição do analito de interesse e o plasma branco fortificado com o analito de interesse em seis concentrações distintas. Para que o método seja considerado seletivo, o plasma branco não deve ter nenhuma resposta do equipamento no tempo de retenção que é observado resposta para o analito na matriz fortificada para as diferentes concentrações.

O efeito matriz no sistema LC-MS/MS foi avaliado comparando as razões de áreas obtidas para o tenofovir quando presente na matriz plasma e quando presente em água (Eq. 2). O experimento foi feito em triplicata nos níveis de concentração usados para mensurar a linearidade.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{\text{área obtida do analito na matriz} \times 100}{\text{área obtida com o analito em água}} - 100$$

Eq. 2

A linearidade foi testada a partir da produção de uma curva analítica de 6 pontos construída em plasma branco com concentrações diferentes de tenofovir (5, 10, 20, 50, 100 e 200 ng/mL), contendo o padrão interno (aciclovir) na concentração de 50 ng/mL. Cinco replicatas de cada concentração foram analisadas no LC-MS/MS. Os resultados foram expressos em área do analito/área do padrão interno. Segundo a RDC 166, o coeficiente de correlação (r) da reta deve estar acima de 0,990 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.

A homocedasticidade da curva analítica ajustada pelo método dos mínimos quadrados foi avaliada a partir do teste de Bartlett, observando se

as variâncias dos resíduos não diferem significativamente ($p > 0,05$). Foi construído também um gráfico de dispersão dos resíduos normalizados.

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária usando os níveis de concentração selecionados para o teste de linearidade. A repetibilidade foi feita a partir da análise em quintuplicata de cada um dos pontos da curva da linearidade em um único dia (do teste de linearidade), sendo aceitos resultados em que o coeficiente de variação (CV) foi menor que 20% entre as replicatas. A precisão intermediária foi analisada a partir de oito replicatas de cada um dos níveis de concentração, sendo elas analisadas em dois dias diferentes (cinco replicatas em um dia e três em outro), os resultados foram considerados satisfatórios quando apresentavam CV menor que 20%.

A exatidão do método foi avaliada por meio de comparação entre as concentrações calculadas pela equação de reta formada no ensaio de linearidade e a concentração que teoricamente deveria ser encontrada para cada uma das cinco replicatas dos diferentes níveis de concentração usados.

6. Quantificação plasmática de tenofovir

Os participantes que coletaram sangue foram distribuídos em três grupos de acordo com o tempo entre a coleta de sangue e o horário da ingestão da última dose TARV, sendo este informado pelos participantes no momento da coleta de sangue. No grupo 1 foram agrupados os participantes que coletaram o sangue após 4 a 7h da ingestão, no grupo 2 entre 7,1 a 11h e no grupo 3 de 15 a 28h.

As amostras de plasma foram quantificadas em triplicata a partir da curva analítica sendo considerado aceitável um coeficiente de variação menor que 20%. O valor obtido foi multiplicado por três devido ao fator de diluição da amostra na etapa de extração. Essas médias foram plotadas num gráfico de dispersão (concentração x tempo) para analisar o perfil farmacocinético do tenofovir.

7. Análise estatística dos dados

A fim de verificar se as pessoas que coletaram amostras para estudo das concentrações de tenofovir eram representativas das pessoas elegíveis, os dados clínicos e sociodemográficos dos grupos foram comparados. Para variáveis dicotômicas foi usado o teste de Fisher e para variáveis categóricas o teste qui-quadrado. Para variáveis numéricas foi usado o teste t para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para não paramétricos. Os valores de creatinina e T CD4+ também foram analisados conforme o tempo de uso de tenofovir (basal, aproximadamente três meses) por meio do teste Teste de Wilcoxon pareado. Nos testes de correlação foi aplicado o teste de Pearson para variáveis paramétricas e o teste de Spearman para variáveis não paramétricas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5® e foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

8. Aspectos éticos

Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa “Cuidado Farmacêutico para pessoas que vivem com HIV (PVHIV) na Farmácia Escola UNB” sob coordenação da pesquisadora Noêmia Urruth Leão Tavares. Esta pesquisa foi elaborada de acordo com os critérios éticos estabelecidos pela Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), de 12 de dezembro de 2012, que aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (número do parecer 2.740.162) (ANEXO 1). Os dados de identificação dos usuários do serviço e dos prescritores foram mantidos em sigilo.

V. RESULTADOS

1. Determinação de tenofovir em plasma humano por HPLC-UV

1.1 Testes iniciais realizados em água milli-Q

Testes iniciais de tenofovir diluído em água milli-Q mostraram que, por ser muito polar, o tenofovir interagia pouco com a coluna C18 e o seu tempo de retenção se aproximava muito do volume morto. Uma estratégia para solução desse problema foi diminuir a concentração da fase orgânica (acetonitrila) para retardar a eluição do tenofovir. A concentração que se mostrou mais adequada foi a de 3%, com tempo de retenção para o tenofovir de 2,8 - 2,9 min. A Figura 9 mostra a diferença entre o cromatograma para duas concentrações de acetonitrila na fase móvel (3 e 5%).

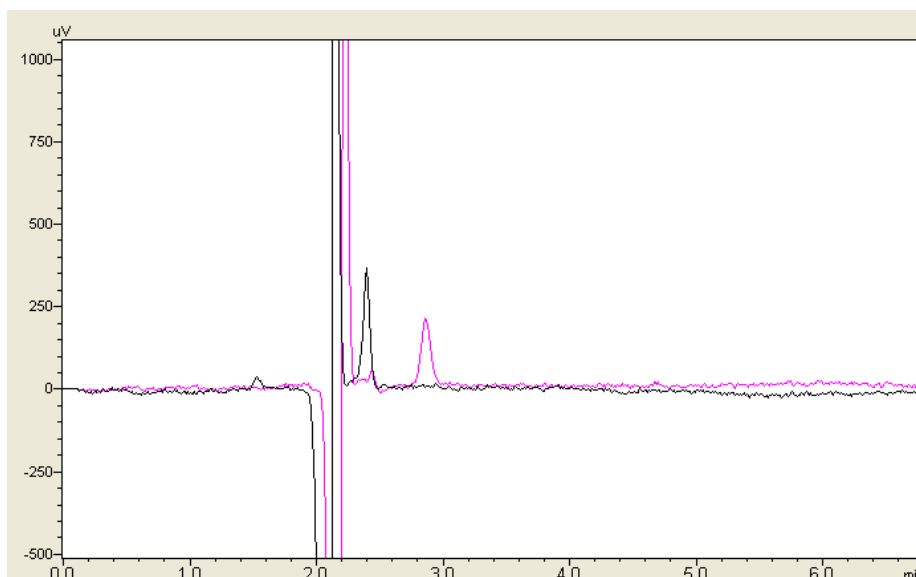


Figura 9. Tempos de retenção do tenofovir (10 ng/mL) no HPLC-UV eluídos em duas diferentes concentrações da fase orgânica- preto: acetonitrila 5% rosa: acetonitrila 3%.

O segundo teste feito foi para avaliar a seletividade do método quanto à possível co-eluição do tenofovir e outros fármacos do esquema

antirretroviral das PVHIV. O dolutegravir sódico não apresentou nenhum sinal cromatográfico com o método de quantificação usado e a lamivudina apresentou um sinal cromatográfico antes do volume morto com tempo de retenção de 1,6 min, diferente do tempo de retenção do tenofovir, mostrando que o método cromatográfico é seletivo para tenofovir para PVHIV na TARV atual preconizada no Brasil.

1.2 Análises para otimização do método utilizando plasma humano

O método por HPLC-UV não apresentou seletividade, já que a matriz plasma branca continha um interferente que co-eluiu com o tenofovir ($T_r=2.8$ min). A Figura 10 ilustra melhor o problema.

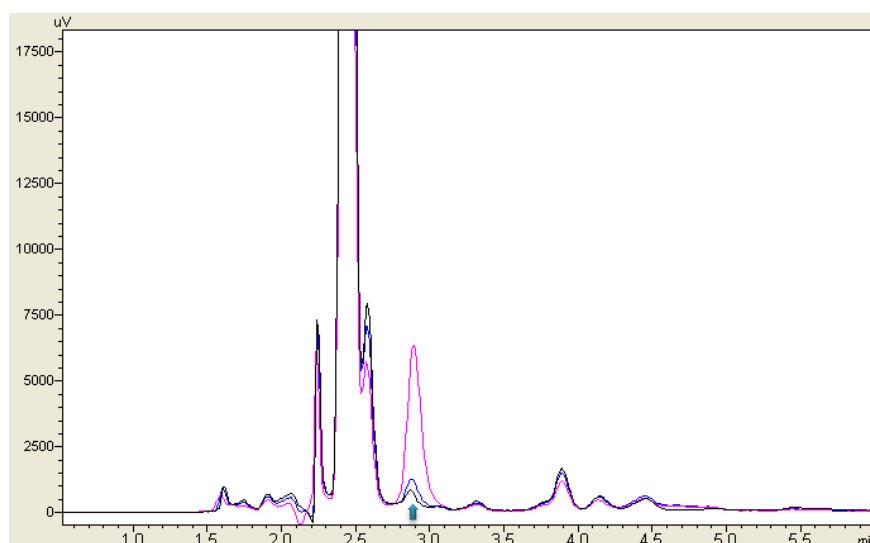


Figura 10. Cromatograma no HPLC-UV do plasma branco (preto) e plasma branco fortificado 50 ng/mL de tenofovir (azul) e plasma branco fortificado 500 ng/mL (rosa). A seta mostra o sinal cromatográfico referente ao tenofovir e seus possíveis interferentes.

Como estratégia para retirada deste interferente a extração com acetonitrila foi modificada para extração com SPE. No teste inicial com o plasma branco, o interferente que aparecia no mesmo tempo de retenção (2,8 min) do sinal cromatográfico do tenofovir foi eliminado. Mas, quando foi

injetado no aparelho o plasma branco fortificando utilizando o processo de extração SPE, o sinal cromatográfico do tenofovir também não apareceu, indicando uma perda do analito durante o processo de extração. A Figura 11 apresenta de forma visual o problema.

Para investigar se o tenofovir tinha ficado retido na coluna ou eluído no processo de lavagem da coluna, cada um dos solventes que passavam pela coluna SPE foram coletados em frascos separados para posterior análise no HPLC-UV. A análise não apresentou mais o sinal cromatográfico do tenofovir, encerrando os esforços no HPLC-UV e modificando o método para se adequar ao LC-MS/MS.

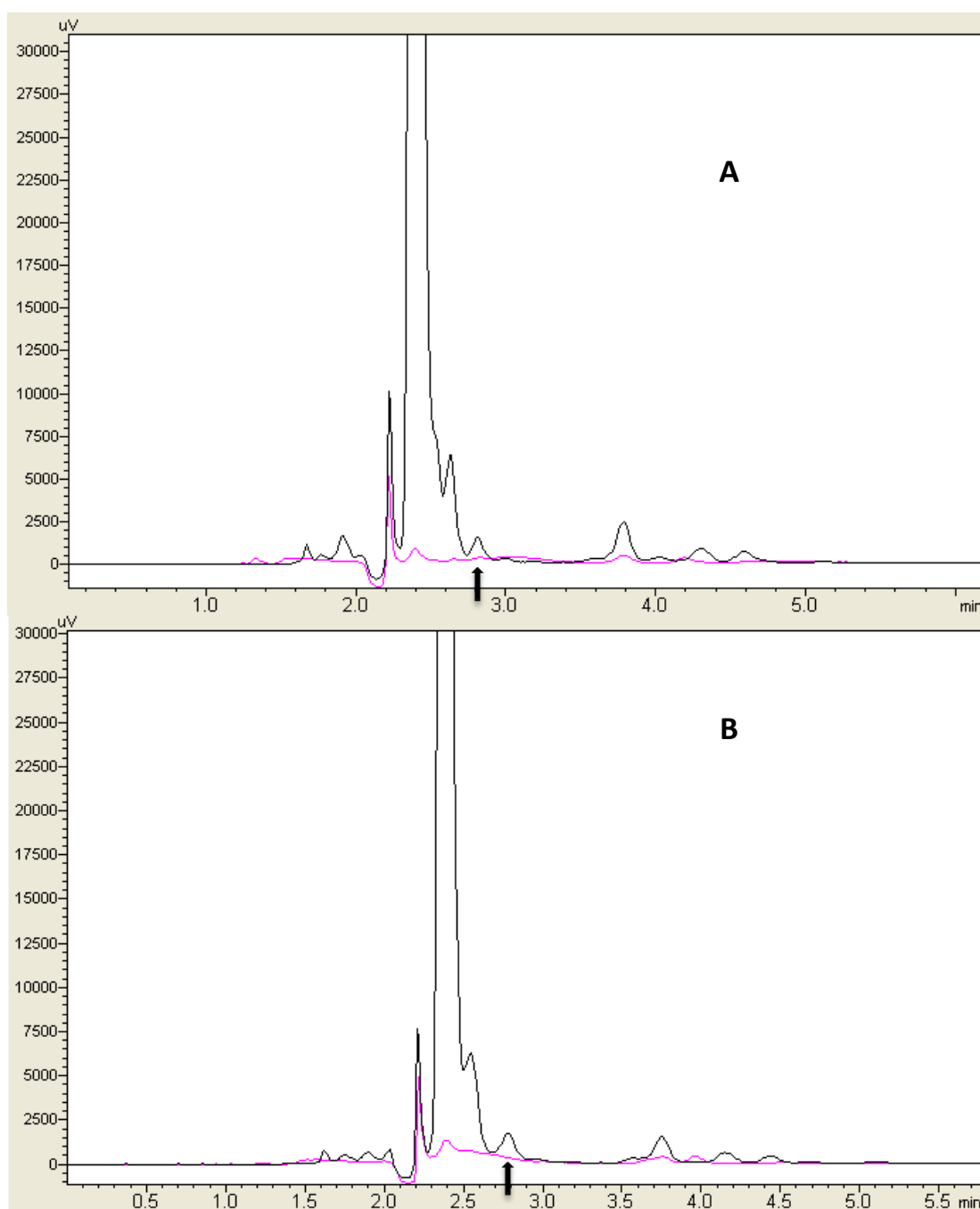


Figura 11. Cromatograma no HPLC-UV. Preto – extração com acetonitrila; rosa – extração SPE. A: plasma branco; B: plasma branco fortificado 50 ng/mL. Cromatógrafo A seta mostra o sinal cromatográfico referente ao tenofovir e seus possíveis interferentes.

2. Determinação de tenofovir em plasma humano por LC-MS/MS

2.1 Otimização dos parâmetros experimentais

A massa da molécula protonada tenofovir é m/z 287,9, que é fragmentada no espectrômetro de massas. O íon de transição de maior intensidade foi usado para quantificação do tenofovir (m/z 176,1), que também foi reportado por outros autores (Bezy et al., 2005). Mais dois íons de transição foram selecionados como íons de confirmação da molécula de estudo (m/z 270,1 e 159,1). Para o aciclovir, o íon precursor protonado (m/z 225,9), e o íon de transição de maior intensidade (m/z 152,1) foi usado na quantificação e mais dois íons de transição (m/z 135,1 e 110,1) foram usados para confirmação da molécula. Os perfis de fragmentação dessas duas moléculas são mostrados na Figura 12.

Os parâmetros da fonte de íons, otimizados no FIA estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da fonte de íons após otimização da FIA

Parâmetros da fonte	Valor
Collision Gas	Alto
Curtain Gas	15 psi
Gas 1/ Nebulizer	40 psi
Gas 2/ Turbo Gas	45 psi
IonSpray Voltage	5000 V
Temperatura	700 °C
Entrace Potencial	10 V

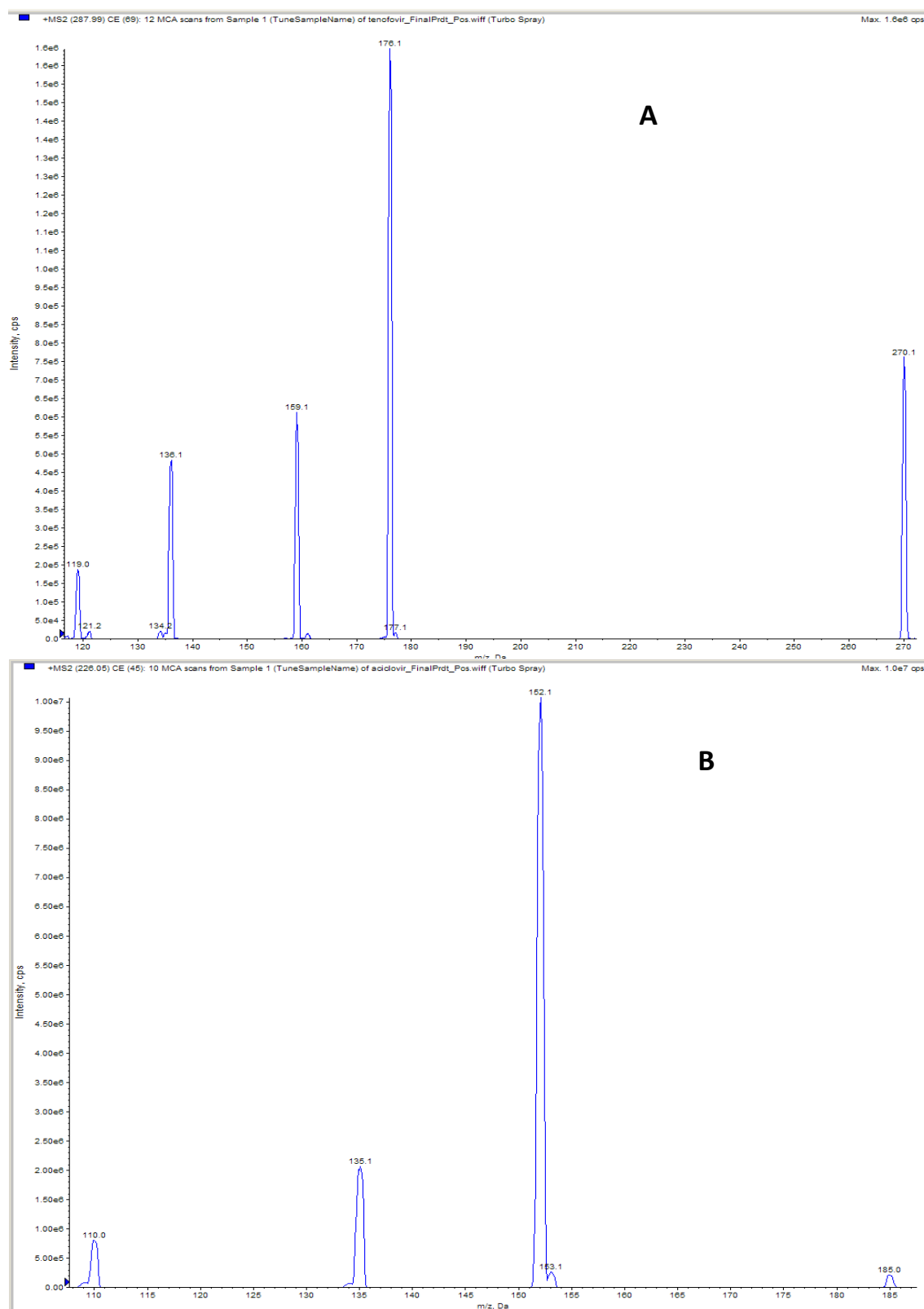


Figura 12. Espectro de fragmentação para os íons precursores de tenofovir (A) e seu padrão interno, aciclovir (B) no LC-MS/MS.

2.2 Limite de quantificação (LOQ) do tenofovir no equipamento LC-MS/MS

O LOQ para o tenofovir foi estabelecido em 5 ng/mL. O nível de 2 ng/mL, com S/N de 6,7, é compatível com as concentrações plasmáticas do pacientes na fase de vale do tratamento até após 24 horas de uso do medicamento, determinado a partir de estudos de farmacocinética (BAHETI et al., 2011; JULLIEN et al., 2005). A Figura 13 mostra a relação sinal/ruído do tenofovir (em plasma branco) calculada pelo software Analyst®.

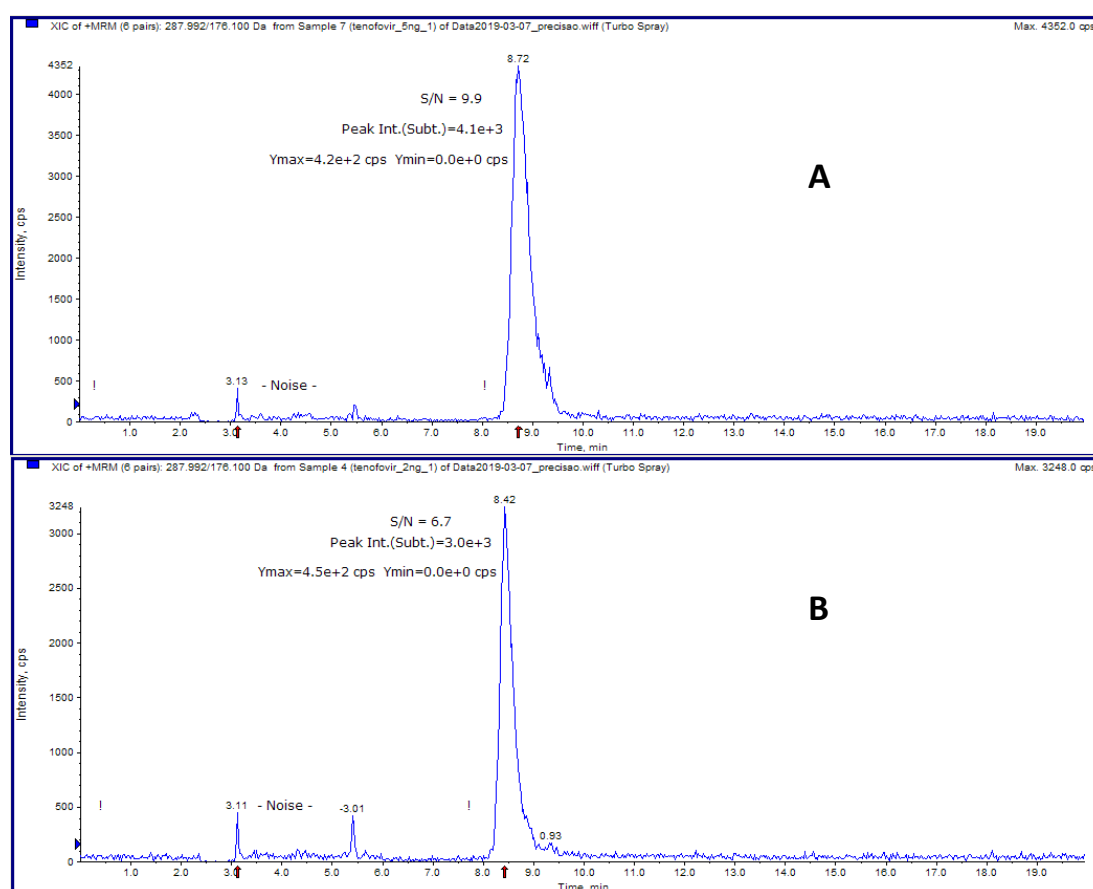


Figura 13. Relação sinal/ruído para o tenofovir de concentração de 5 ng/mL (LOQ, A) e de concentração de 2 ng/mL (B). Monitoramento da transição m/z 279,1 $\rightarrow$ m/z 176,1 no LC-MS/MS.

2.3 Seletividade

A Figura 14 mostra a resposta do LC-MS/MS na análise do plasma branco sem fortificação e fortificado (pós-extração) com 60 ng/mL tenofovir. Nenhum interferente foi detectado no tempo de retenção do tenofovir e do seu padrão interno, evidenciando a seletividade do método.

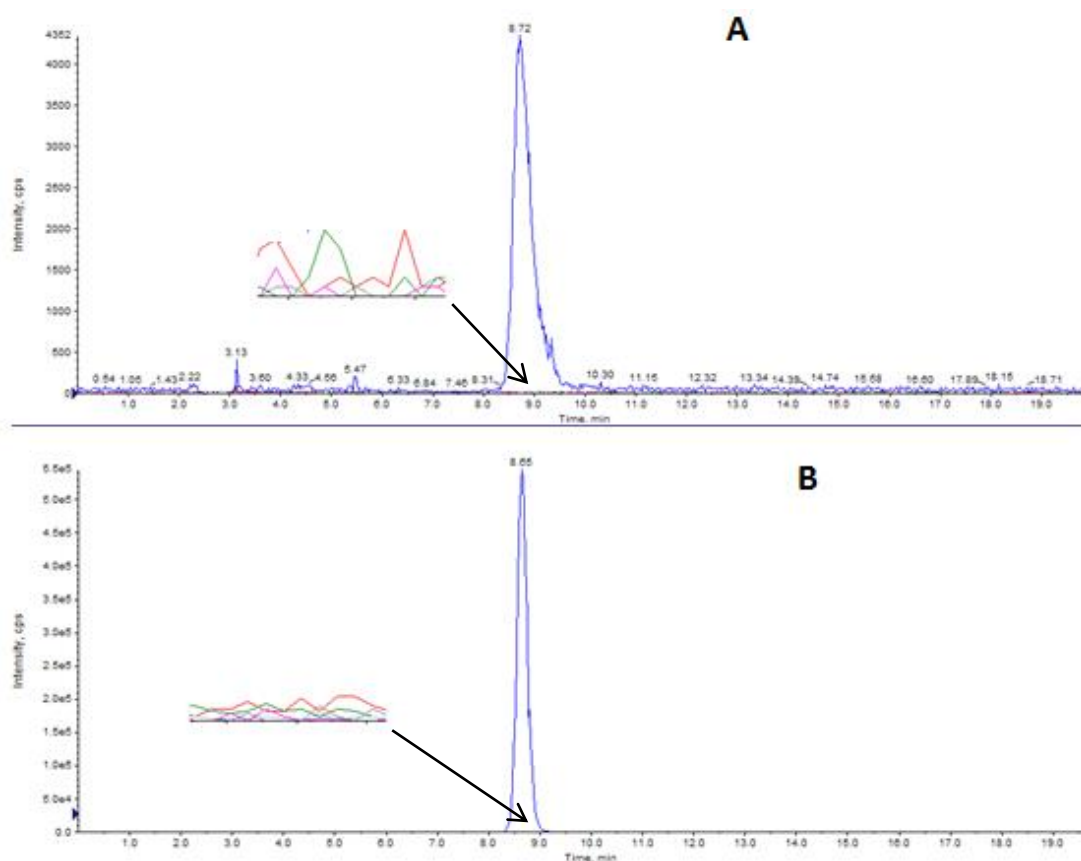


Figura 14. Cromatogramas obtido no LC-MS/MS de A: cinco plasmas brancos (zoom) e plasma branco fortificado com concentração de 5 ng/mL tenofovir (azul); monitoramento da transição m/z 278,9 $\rightarrow$ m/z 176,1 e B: cinco plasmas brancos (zoom) e plasma branco fortificado com aciclovir com concentração de 50 ng/mL (azul); monitoramento da transição m/z 226,0 $\rightarrow$ 151,1.

2.4 Efeito Matriz

A Tabela 3 e a Figura 15 mostram o efeito da presença da matriz plasma na resposta do espectrômetro de massas, indicando uma perda de sinal do tenofovir (em relação ao padrão interno aciclodir). Esse resultado mostra que a curva analítica para determinação quantitativa do tenofovir deve ser feita em matriz plasma. Como o procedimento de extração é relativamente simples, essa curva será feita numa curva em plasma branco fortificado antes do processo de extração, normalizando assim qualquer perda durante o processo.

Tabela 3 – Efeito matriz do analito em plasma quando comparado em água. (media $\pm$ desvio padrão)

Concentração (ng/mL)	Tenofovir / PI		Perda de sinal (%)
	Água	Plasma	
5	0,045 $\pm$ 0,003	0,011 $\pm$ 0,001	76,4
10	0,088 $\pm$ 0,007	0,023 $\pm$ 0,003	74,4
50	0,422 $\pm$ 0,008	0,125 $\pm$ 0,025	70,3
100	0,84 $\pm$ 0,05	0,256 $\pm$ 0,068	69,5
200	1,65 $\pm$ 0,03	0,552 $\pm$ 0,048	66,6

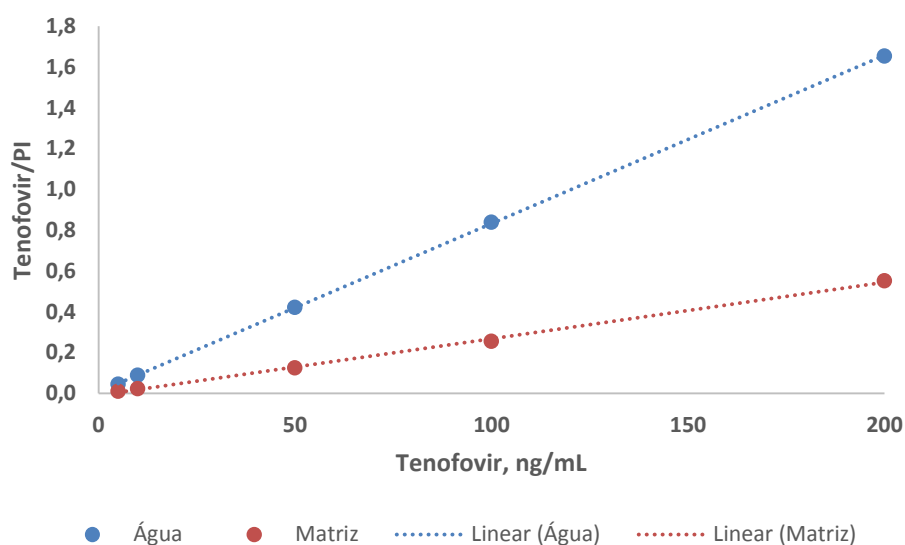


Figura 15. Curvas analíticas do tenofovir em água e no plasma branco para teste de efeito matriz, mostrando a supressão do sinal. PI= padrão interno aciclovir.

2.5 Linearidade

A Figura 16 mostra a curva analítica construída em matriz plasma ($n=5$) com equação da reta e seu coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação (método dos mínimos quadrados) foi maior que 0,99 e coeficiente angular diferente de zero, indicando uma boa linearidade da resposta do detector.

A homocedasticidade da curva analítica em matriz plasma foi confirmada pelo teste de Bartlett que mostrou que as variâncias dos resíduos não diferem significativamente ao longo da faixa de concentração ($p= 0,98$). Esse resultado pode ser visto na Figura 17 que mostra os resíduos normalizados, que estão dispersos ao longo da faixa de concentração (em log).

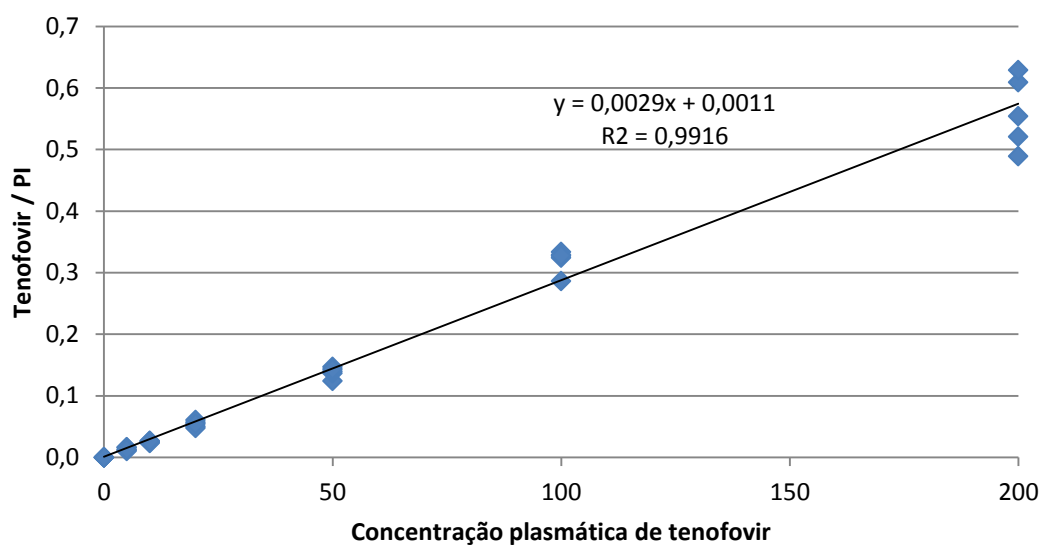


Figura 16. Curva analítica construída em plasma branco com seis concentrações (n=5 em cada concentração).

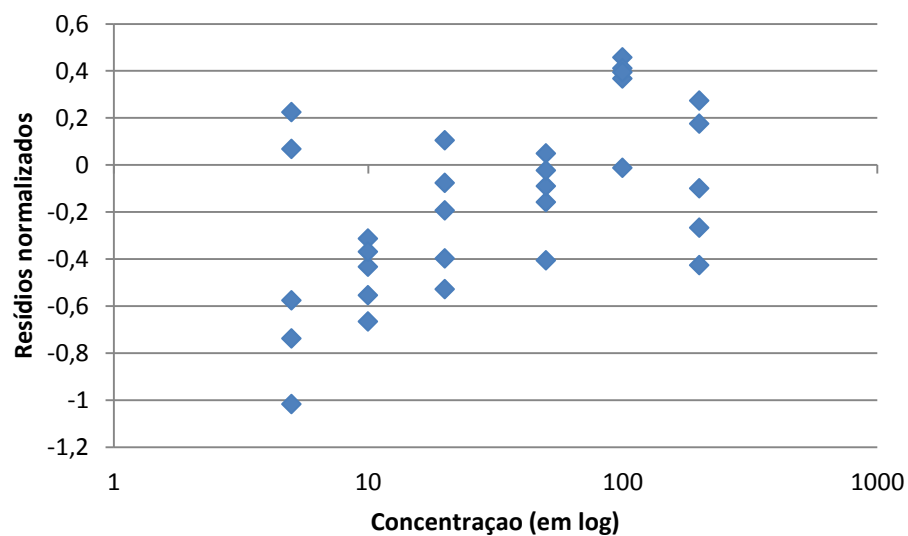


Figura 17. Dispersão dos resíduos normalizados da curva analítica de tenofovir na faixa de concentração de 5 a 200 ng/mL (em log).

2.6 Precisão

Os resultados de precisão avaliada por meio da repetibilidade, em um único dia, e da precisão intermediária em dois dias diferentes apresentaram valores de CV menor que 20% para repetibilidade e menores que 21% para precisão intermediária. O método apresentou precisão para as faixas de concentração de tenofovir estudada (Tabela 4).

Tabela 4. Repetibilidade e precisão intermediária da determinação de tenofovir em plasma. Média (desvio padrão) em área do pico do tenofovir/ PI.

Concentração (ng/mL)	Repetibilidade (n=5)		Precisão intermediária (n=8)	
	Média (DP)	CV (%)	Média (DP)	CV (%)
5	0,013 (0,003)	19,9	0,013 (0,003)	20,9
10	0,025 (0,001)	5,7	0,025 (0,004)	17,8
20	0,054(0,005)	9,3	0,054 (0,010)	17,5
50	0,138 (0,009)	6,3	0,138 (0,023)	16,7
100	0,32(0,019)	5,9	0,30 (0,04)	13,5
200	0,56 (0,059)	10,5	0,53 (0,088)	16,5

3. Caracterização dos participantes do estudo

No total, 89 PVHIV em uso da TARV (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico) por mais de sete semanas atendidas no HUB, portanto elegíveis, participaram do estudo. Dez (11,2%) eram pessoas que passaram por outros esquemas terapêuticos anteriores para o tratamento do HIV, e 24 participaram da coleta de sangue para quantificação do tenofovir, sendo que destas apenas duas pessoas eram experimentadas com outras TARV (Figura 18).

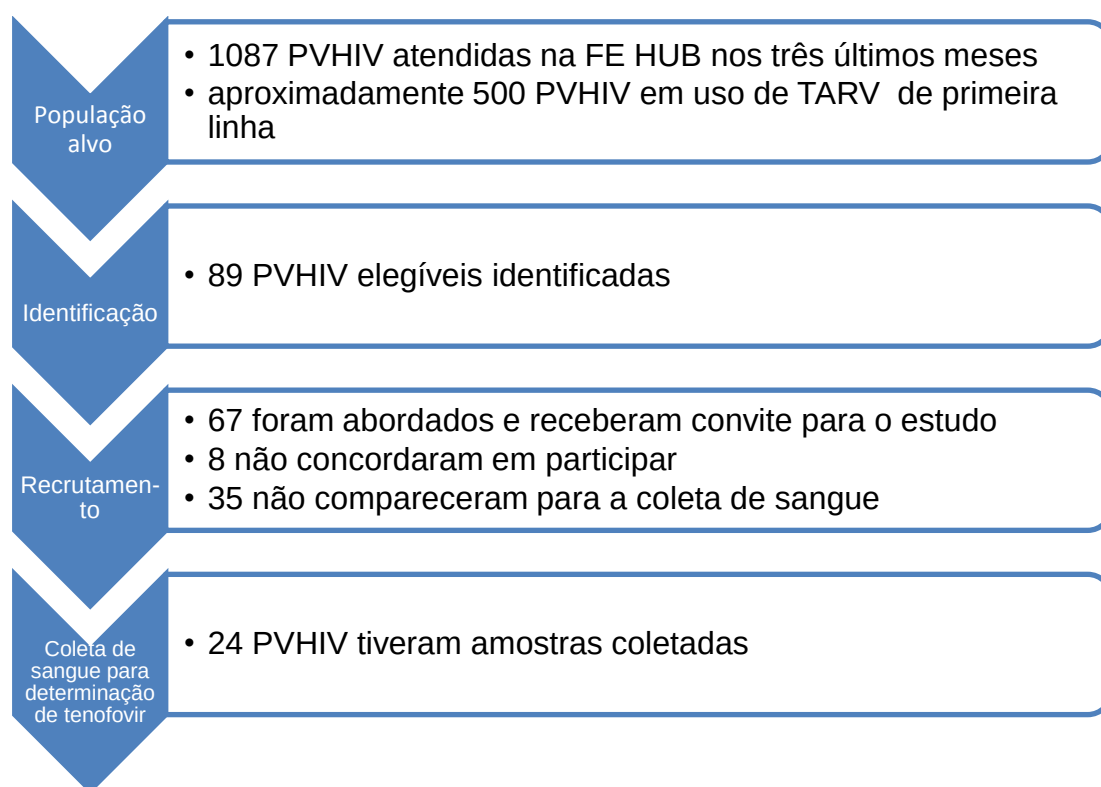


Figura 18. Fluxograma dos participantes da pesquisa.

As PVHIV tinham de 19 a 67 anos (mediana de 31,5 anos), a maioria homens (92,2%). Apenas quatro tinham mais que 50 anos, sendo dois com mais de 60 anos. Cerca de 30% residia na região leste do Distrito Federal e 13,5% residia no entorno (Tabela 5).

A informação sobre o peso das PVHIV só estava disponível em 61 prontuários, dos quais apenas 53 tinha informação sobre altura. A maioria dos 53 indivíduos apresentou índice de massa corporal (IMC) considerado normal (entre 18,5 e 24,9, segundo as Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010 (ABESO, 2019), embora 12 indivíduos tenham apresentado sobrepeso (IMC $\geq$ 25) e seis eram obesos (IMC $>$ 30). Não houve diferença entre os parâmetros sociodemográficos entre os indivíduos que coletaram amostras de sangue para determinação de tenofovir e o total dos indivíduos elegíveis (Tabela 5).

Tabela 5. Características sociodemográficas das PVHIV elegíveis para o estudo de avaliação da concentração plasmática de tenofovir atendidas no HUB/UNB.

Variáveis	Elegíveis (n=89)	Coletaram sangue ^a (n=24)	Não coletaram sangue (n=65)
Idade (anos)			
Média ± desvio padrão	32,8 ± 9,6	33,7 ± 8,7	32,5 ± 9,9
Mediana (faixa)	31,5 (19-67)	31,5 (23-55)	31,0 (19-67)
Sexo n (%)			
Masculino	82 (92,2)	23 (95,8)	59 (90,9)
Feminino	7 (7,8)	1 (4,2)	6 (9,1)
IMC, n= 53	24,6 ± 3,8	24,4 ± 3,6	24,1 ± 4,3
Procedência (DF) n (%)^b			
Norte	7 (8,0)	4 (16,7)	3 (4,7)
Centro-Norte	12 (13,6)	2 (8,3)	10 (15,6)
Sul	5 (5,7)	1 (4,2)	4 (6,3)
Centro-Sul	7 (8,0)	3 (12,5)	4 (6,3)
Sudoeste	12 (13,6)	3 (12,5)	9 (14,1)
Leste	24 (27,3)	9 (37,5)	15 (23,4)
Oeste	9 (10,2)	1 (4,2)	8 (12,5)
Entorno	12 (13,6)	1 (4,2)	11 (17,2)

^a Para determinação de tenofovir; ^b Faltava dados de procedência para um dos participantes
 IMC = Índice de massa corpórea. DF = Distrito Federal. Não houve diferença estatística entre os grupos de acordo com o teste de Fisher para variável sexo, teste qui-quadrado para procedência e teste de Mann Whitney para idade e IMC.

Quanto às variáveis clínicas, a carga viral no início do tratamento com a TARV era maior que 1000 cópias em cerca de 80% das PVHIV. As pessoas que apresentaram carga viral indetectável antes de iniciar o tratamento já haviam recebido tratamento com outro esquema antirretroviral. Após cerca de três meses de tratamento, mais de 90% das PVHIV apresentou carga viral indetectável. No grupo de PVHIV elegíveis que não coletou amostras de sangue, observa-se porcentagem de resposta inferior aos demais grupos, mas que não foi estatisticamente significativo (Tabela 6).

A maioria das PVHIV apresentou valores altos de T CD4+, com média acima do limite da normalidade (500 cópias/mL sangue) (Tabela 6). No grupo que coletou sangue para determinação de tenofovir, a média de T CD4+ antes do início do tratamento foi ligeiramente inferior aos valores de referência, mas não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto percebeu-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no grupo de pessoas elegíveis e no grupo de pessoas que participaram da coleta de sangue em relação ao início do tratamento, ou seja, em ambos os grupos houve aumento de T CD4+ após três meses de tratamento. No grupo de pessoas que não colheram sangue, observou-se também uma tendência ($p=0.0512$) para esse aumento (Tabela 6 e Figura 19).

Valores individuais de idade, sexo, peso, IMC, T CD4+, dosagem de creatinina sérica e depuração de creatinina estimada para cada PVHIV estão no Apêndice 1.

Tabela 6. Dados clínicos de controle do HIV antes do início do tratamento e após aproximadamente três meses. Carga viral em cópias/mL plasma; T CD4+ em células/mm³ sangue.

Variáveis	Elegíveis	Coletaram sangue ^a	Não coletaram sangue
CVir antes do tratamento n (%)			
>1000	62 (83,8)*	16 (84,2%)*	46 (83,6)*
Entre 40 e 1000	5 (6,8)	1 (5,3%)	4 (7,3%)
Indetectável <40	7 (9,5)*	2 (10,5%)*	5 (9,1%)*
CVir após início do tratamento ^b			
>1000	1 (1,5)*	0 (0)*	1 (2,2)*
Entre 40 e 1000	5 (7,5)	1 (4,8)	4 (8,7)
Indetectável/ <40	61 (91)*	20 (95,2)*	41 (89,1)*
T CD4+ antes do tratamento (média ± DP)	541,2 ± 408,6*	488,5 ± 404,6*	561,5 ± 412,2*
T CD4+ < 250 n (%)	18 (25,0)	7 (35)	11 (21,2)
T CD4+ entre 250 e 500 n (%)	19 (26,4)	4 (20)	15 (28,8)
T CD4+ >500 n (%)	35 (48,6)	9 (45)	26 (50,0)
T CD4+ após início de tratamento ^c (média ± DP)	638,0 ± 364,8*	681,3 ± 402,3*	615,7 ± 347,8*
T CD4+ < 250 n (%)	10 (17,9)	5 (26,3)	5 (13,5)
T CD4+ entre 250 e 500 n (%)	10 (17,9)	2 (10,5)	8 (21,6)
T CD4+ >500 n (%)	36 (64,3)	12 (63,2)	24 (64,9)

^a Para determinação de tenofovir; ^b 116,4 ± 111,9 dias após o início de uso da TARV, ^c 102,1 ± 69,9 dias após o início de uso da TARV.* Diferença estatisticamente significativa p<0,05 comparando os valores na mesma coluna ao decorrer do tempo por meio do teste de Wilcoxon pareado. Não houve diferença estatística entre os grupos de acordo com o teste de qui-quadrado para carga viral e T CD4+ estratificado e teste de Mann-Whitney para T CD4+

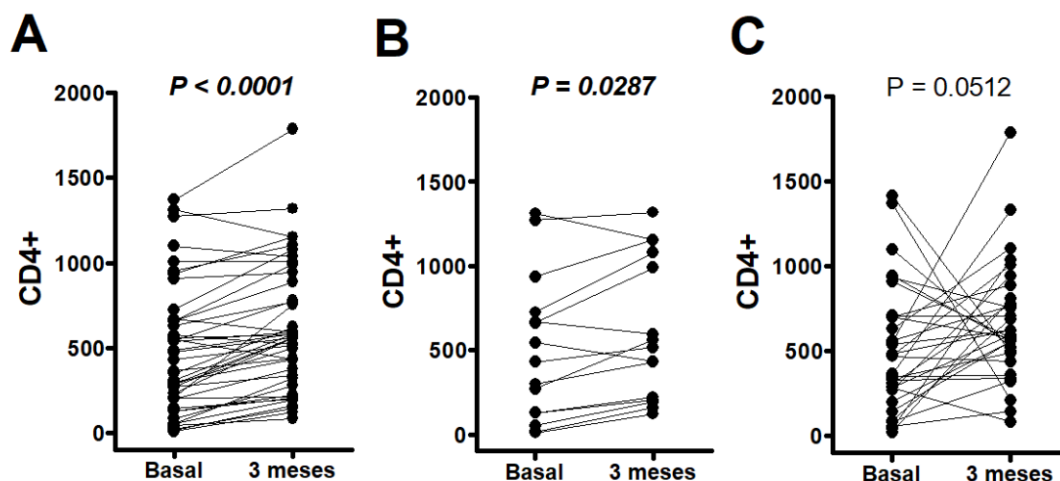


Figura 19. Comparação da contagem de leucócitos T CD4+ (CD4+) basal e após aproximadamente três meses em todas as pessoas elegíveis, em células/mm³ sangue (A), grupo que colheram sangue para determinar tenofovir (B) e grupo de pessoas que não colheram sangue (C). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Teste de Wilcoxon pareado).

Quanto à função renal, não houve diferença entre a creatinina sérica e depuração de creatinina estimada antes do início do tratamento entre os grupos elegíveis e os que coletaram amostras de sangue para determinação de tenofovir. Antes do início do tratamento, 2,6% das pessoas apresentavam creatinina sérica acima dos valores de referência (1,2 mg/dL). Esse número aumentou para 24% após três meses de tratamento e se manteve com seis meses de tratamento. Esse aumento é estatisticamente significativo em todos os grupos quando comparado a creatinina basal e após três meses de tratamento e após seis meses de tratamento, mas não houve diferença quando comparado os valores de três e seis meses de tratamento (Tabela 7 e Figura 20).

Tabela 7. Valores da média e desvio padrão de creatinina sérica (mg/dL) e depuração de creatinina (ClCr; mL/min/1,73m²) antes do início do tratamento e após aproximadamente três e seis meses de tratamento.

Variáveis	Elegíveis	Coletaram sangue	Não coletaram sangue
Creatinina basal (n=76)	0,97 ± 0,19*	0,96 ± 0,21*	0,97 ± 0,19*
Creatinina 1 ^a (n=78)	1,13 ± 0,2*	1,11 ± 0,23*	1,13 ± 0,19*
Creatinina 2 ^b (n=37)	1,14 ± 0,2	1,15 ± 0,17	1,13 ± 0,22
Valor de p	<0,0001	0,005	<0,0001
ClCr basal (n=53)	114,3 ± 31,7*	115,9 ± 37,4*	113,5 ± 29,0*
ClCr 1 ^a (n=54)	97,4 ± 27,6*	98,4 ± 38,9*	97,0 ± 21,9*
ClCr 2 ^b (n=27)	95,5 ± 22,0	99,1 ± 30,6	93,4 ± 15,8
Valor de p	0,0006	0,004	0,006

^a106,8 ± 85,9 dias de tratamento, ^b240,9 ± 139,4 de tratamento. *O valor de p corresponde ao teste estatístico de Wicoxon pareado comparando a creatinina basal e a creatinina 1 após início do tratamento.

Apenas 11% dos participantes elegíveis para o estudo apresentavam depuração de creatinina basal inferior aos valores de referência (homem: 85 mL/min/1,73m² e mulher: 75 mL/min/1,73m²). Esse valor aumentou para 31% dos participantes após três meses de tratamento e se manteve com seis meses. Esse aumento é estatisticamente significativo quando comparada a depuração de creatinina basal e após três meses de tratamento e após seis meses de tratamento no grupo com todos participantes elegíveis para o estudo e no grupo de pessoas que não coletaram sangue, mas não houve diferença quando comparado os valores de três e seis meses de tratamento e quando comparamos cada grupo no mesmo tempo de tratamento (creatinina basal, 1 e 2) (Tabela 7 e Figura 21).

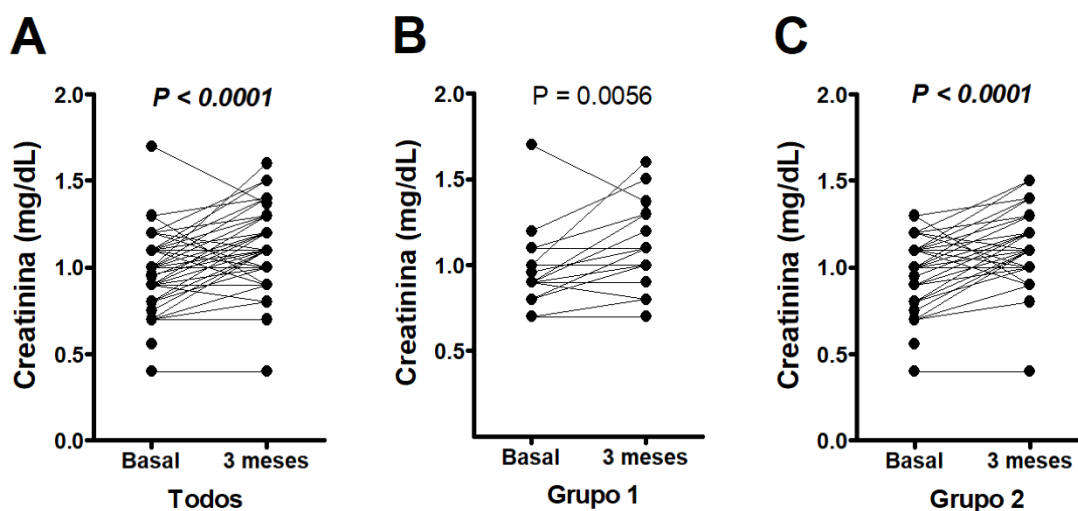


Figura 20. Comparação da creatinina basal e após aproximadamente três meses em todas as pessoas elegíveis (A), grupo que colheu sangue para determinar tenofovir (B) e grupo de pessoas que não colheram sangue (C). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Teste de Wilcoxon pareado).

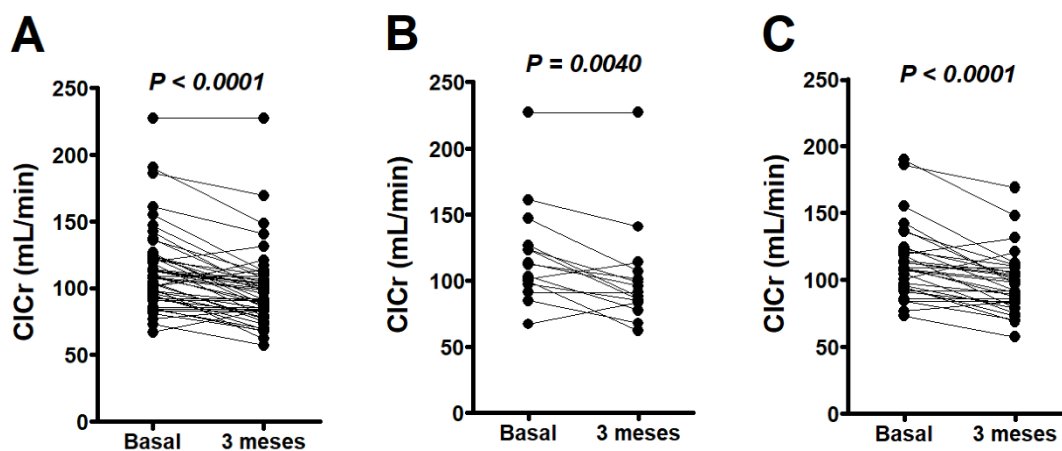


Figura 21. Comparação da depuração de creatinina (ClCr) basal e após aproximadamente três meses em todas as pessoas elegíveis (A), grupo que colheu sangue para determinar tenofovir (B) e grupo de pessoas que não colheram sangue (C). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (Teste de Wilcoxon pareado).

4. Quantificação plasmática de tenofovir

As concentrações médias de tenofovir diminuíram em função do intervalo entre a última dose e a coleta de sangue (Tabela 8 e Figura 22). Valores individuais de tenofovir plasmático estão no Apêndice 1.

Tabela 8. Valores de concentração plasmática de tenofovir conforme o tempo de ingestão do medicamento, média $\pm$ desvio padrão.

Variáveis	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=8)	Grupo 3 (n=10)
Concentração (ng/mL)	65,0 $\pm$ 11,7	51,6 $\pm$ 21,8	31,5 $\pm$ 22,5
Tempo após ingestão (h)	5,6 $\pm$ 1,1	9,0 $\pm$ 1,3	20,6 $\pm$ 4,2
Tempo de uso (dias)	239 $\pm$ 214	128 $\pm$ 93	221 $\pm$ 172

Grupo 1 = 4 a 7h após a última dose, Grupo 2 = 7,1 a 11h após a última dose, Grupo 3= 15 a 28h após a última dose

As variáveis testadas para correlações com as concentrações plasmáticas de tenofovir entre os grupos e total de pessoas são apresentadas na Tabela 9. A correlação entre a concentração plasmática de tenofovir e a depuração de creatinina da coleta 1 (após aproximadamente três meses de tratamento) do grupo 2 foi positiva e significativa ($r=0,79$; $p=0,036$). Também foi observada correlação positiva e significativa ($r=0,85$; $p=0,003$) entre valores de T CD4+ e concentração plasmática de tenofovir no grupo que coletou sangue entre 4 e 7 horas após a última dose. No entanto, correlação negativa entre concentração plasmática e T CD4+ foi observada para o grupo que coletou sangue após 15 a 28 horas após a última dose ($r=-0,54$; $p=0,03$) (Tabela 9). As demais correlações entre a concentração de tenofovir plasmática considerando os grupos e idade, peso, IMC, CD4 e CÍCr antes e após o início do tratamento não foram significativas.

Tabela 9. Dados clínicos e concentração plasmática de tenofovir em PVHIV atendidas no HUB conforme o tempo de ingestão do medicamento, médias $\pm$ desvio padrão.

Variáveis	Total (n=24)	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=8)	Grupo3 (n=10)
Idade (anos)	33,7 $\pm$ 8,7	31,5 $\pm$ 6,8	34,3 $\pm$ 9,5	34,6 $\pm$ 9,5
IMC (kg/m ²)	24,1 $\pm$ 4,3	25,3 $\pm$ 0,6	26,1 $\pm$ 5,7	24,1 $\pm$ 3,7
T CD4 ^a + basal	488,5 $\pm$ 404,6	625,8 $\pm$ 449,7	621,8 $\pm$ 437,0	238,1 $\pm$ 219,8
T CD4 ^a + Coleta 1 [#]	681,3 $\pm$ 402,3	786,2 $\pm$ 478,2	807,4 $\pm$ 418,3	552,9 $\pm$ 356,2
Creatinina ^b basal	0,96 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,11	0,96 $\pm$ 0,15	1,02 $\pm$ 0,28
Creatinina ^b 1*	1,11 $\pm$ 0,23	1,02 $\pm$ 0,19	1,11 $\pm$ 0,27	1,16 $\pm$ 0,22
Creatinina ^b 2**	1,15 $\pm$ 0,17	1,10 $\pm$ 0,17	1,10 $\pm$ 0,16	1,22 $\pm$ 0,18
ClCr ^c basal	115,9 $\pm$ 37,4	d	119,6 $\pm$ 49,1	105,6 $\pm$ 23,4
ClCr ^c 1*	98,4 $\pm$ 38,9	d	102,7 $\pm$ 55,9	91,0 $\pm$ 16,6
ClCr ^c 2**	99,1 $\pm$ 30,6	d	107,9 $\pm$ 46,1	85,5 $\pm$ 9,9

a. células/mm³ sangue; b. mg/dL; c. mL/min/1,73m²; d. dado disponível somente para dois indivíduos [#]102,1 $\pm$ 69,9 dias após o início de uso da TARV *106,8 $\pm$ 85,9 dias de tratamento, **240,9 $\pm$ 139,4 de tratamento. Grupo 1 = 4 a 7h após a última dose, Grupo 2 = 7,1 a 11h após a última dose, Grupo 3= 15 a 28h após a última dose

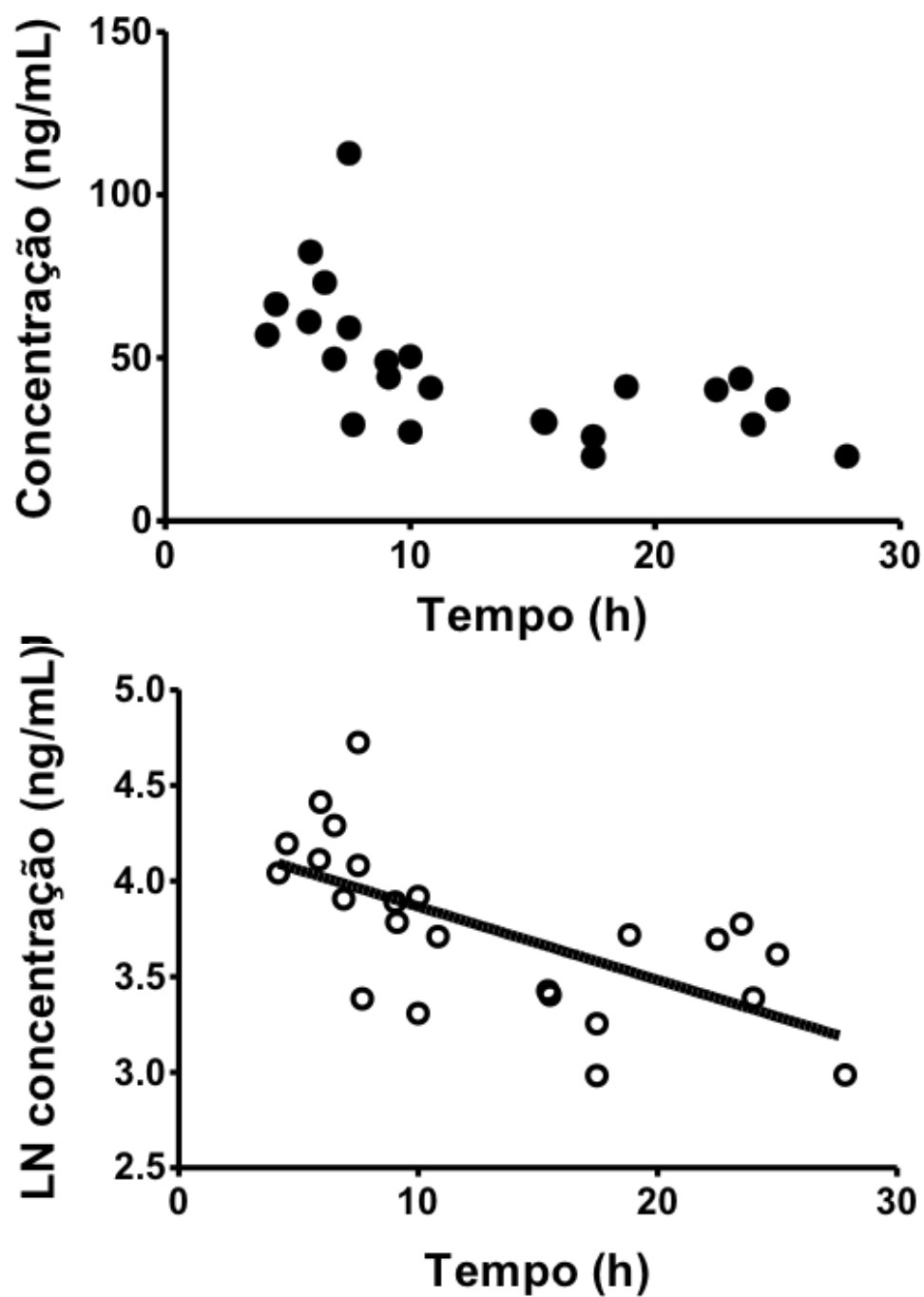


Figura 22. Análise de dispersão das concentrações de tenofovir em PVHIV atendidas no HUB-UNB. Cada ponto representa um indivíduo diferente. LN = logaritmo de base natural (e).

VI. Discussão

Neste estudo apresentamos informações sobre a concentração plasmática de tenofovir em PVHIV em uso da TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico e dados clínicos sobre a função renal. As principais contribuições deste trabalho foram a validação de método laboratorial para quantificar tenofovir em amostra biológica, os achados de diminuição da função renal após aproximadamente três meses de tratamento e os valores das concentrações plasmáticas de tenofovir em esquema de TARV contendo dolutegravir. De fato, há poucos estudos abordando o mesmo tema com a população brasileira sobre o esquema de TARV de primeira linha, tendo em vista o uso muito recente de dolutegravir.

O método para quantificação de tenofovir em plasma humano, usando LC-MS/MS foi validado obedecendo aos critérios da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. O método apresentou precisão, exatidão, seletividade, linearidade, efeito matriz, com LOQ aceitável para o fim proposto, menor que os descritos em outros estudos (Tabela 2), sendo aplicável para pessoas com baixa adesão ao tratamento. O método de extração com a precipitação de proteínas com acetonitrila é simples, e facilmente aplicável em qualquer laboratório, suficiente para dar seletividade a quantificação no LC-MS/MS, sendo também usado pela maioria dos outros autores. A eluição isocrática, também utilizada em outros estudos, diminui o tempo de corrida e consequentemente reduz gastos.

As características sociodemográficas dos usuários de TARV do presente estudo são semelhantes aos dados epidemiológicos já descritos para essa população, que é constituída majoritariamente de homens, adultos jovens e ainda sem sinais de comprometimento do sistema imune ou do peso corporal – características observadas nos casos mais avançados da doença. Esse perfil reflete as mudanças que ocorreram nos últimos anos

desde o advento da epidemia de HIV (RYOM, et al., 2013; NISHIJIMA et al., 2015; MOCROFT et al., 2016).

No total, 89 PVHIV foram elegíveis para o estudo, porém somente 24 forneceram amostras de sangue para análise de tenofovir. Além de dificuldades no contexto da assistência, uma vez que a pesquisa procurou não interferir no atendimento, outros motivos de recusa da coleta foram observados. No esclarecimento sobre o estudo, antes da explicação do TCLE, foi mencionado que a partir dos resultados seria possível inferir se os medicamentos estavam sendo tomados corretamente, o que pode ter inibido algumas PVHIV a fornecerem as amostras. Adicionalmente, pessoas que residiam mais distantes do hospital, como no entorno do DF, apresentaram menor taxa de comparecimento para a coleta de sangue para o estudo.

Os dados sociodemográficos e clínicos entre as pessoas que tiveram o sangue coletado e as que não o tiveram foram semelhantes, mas aqueles que não doaram o sangue tiveram um percentual de resposta ao tratamento ligeiramente menor (carga viral e T CD4+), porém não chegando a apresentar significância no teste estatístico ($p=0,0512$), o que pode indicar menor adesão ao tratamento.

No geral, foi observada resposta adequada à TARV, evidenciado pela diminuição da carga viral em torno de 90 dias de tratamento, chegando a mais de 90% dos participantes com carga viral indetectável. Também foi observado aumento estatisticamente significativo de T CD4+, com exceção do grupo que não participou da coleta de sangue ($p=0,0512$). Esses dados confirmam os ensaios clínicos que justificaram a inclusão de dolutegravir em combinação com fumarato de tenofovir desoproxila e lamivudina como esquema de primeira linha no Brasil, sendo mais eficaz e com menos efeitos adversos (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

Outro dado relevante deste trabalho se refere ao aumento dos níveis de creatinina sérica e consequente diminuição da depuração de creatinina, com diferença estatística após cerca de 90 dias de tratamento. Deve-se ressaltar que tendo em vista o desenho do estudo podem existir outros fatores fisiológicos, doenças ou sinergismo com outros medicamentos que

possam ter contribuído para diminuição da função renal. Gandhi et al. (2016) também observaram que a depuração de creatinina diminuiu com o início do uso de tenofovir. No entanto, levantamento anterior realizado com PVHIV atendidos no HUB-UNB que iniciaram a TARV vigente à época (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina + efavirenz) não observou diminuição significativa da depuração de creatinina no início do tratamento, embora alguns indivíduos tenham apresentado níveis de creatina sérica elevada após aproximadamente seis meses (FAGUNDES, 2016).

Gandhi et al. (2016) também mostraram uma relação entre o declínio da depuração de creatinina e a idade, o que não foi observado no presente estudo devido ao pequeno número de indivíduos mais velhos. Nishijima et al. (2015), em estudo com 703 PVHIV em Tóquio, observaram que a TFG_e teve diminuição de mais de 10 ml/min/1,73 m² após início do tratamento e que 89% das pessoas tiveram um delta negativo, ou seja, tiveram a TFG_e reduzida e destes, 126 (20,2%) apresentaram valores abaixo do limite da normalidade (60 ml/min/1,73 m²). Dados similares foram encontrados no presente estudo, embora usando depuração de creatinina em vez de filtração glomerular para avaliar a função renal. Cerca de 80% das PVHIV tiveram delta negativo de depuração de creatinina estimada, e 31% apresentaram valores abaixo dos valores de referência.

Em outro estudo semelhante, Wanga et al. (2015) analisaram os dados da depuração de creatinina durante os primeiros seis meses de TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila + emtricitabina e relatam discretas alterações da depuração renal quando comparada ao valor basal. Os valores variaram de -0,5 mL/min com intervalo variando de -10,7 a +10,8, sem diferença significativa. Ao contrário, nosso estudo encontrou como valor médio dessa mudança em menos tempo, cerca de 90 dias, de -16,24 mL/min/1,73m² tendo valores variando de -45,23 a +20,17 sendo estatisticamente significativa essa alteração.

Não foi observada neste estudo relação de concentração plasmática de tenofovir e depuração de creatinina quando considerados todas as PVHIV que coletaram sangue, mas a relação foi significativa para aqueles que

coletaram sangue 7,1 a 11 horas após a última dose. No entanto, essa análise não apresentou o resultado esperado, pois foi prejudicada pelo pequeno número de participantes e pela impossibilidade de padronizar o horário de coleta após a ingestão do medicamento.

Gandhi et al. (2016) relataram uma relação entre concentrações mais altas de tenofovir e emtricitabina em amostras de cabelo com maiores declínios da função renal. Esse achado foi corroborado por Havens et al. (2013) que também encontraram uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de tenofovir e a TFG_e ($r = -0,29$; $p = 0,002$).

Em um estudo de coorte conduzido na Europa, Estados Unidos e Austrália, Mocroft et al. (2016) mostraram que em dois anos, 0,11% das pessoas em uso de TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila tiveram doença renal crônica, percentual que aumentou para 0,49% pós cinco anos e para 1,46% após oito anos. No presente estudo, mais de 30% dos participantes já apresentavam depuração de creatinina estimada abaixo dos valores de referência após três meses, o que é preocupante.

De fato, já existem alternativas mais seguras para o uso de fumarato de tenofovir desoproxila. Mocroft et al. (2016) relatam que dados do novo pró-fármaco do tenofovir, o tenofovir alafenamida, tem risco menor de lesão renal que o fumarato de tenofovir desoproxila, mas ainda são necessários estudos com acompanhamento em longo prazo. Além disso, deve-se destacar o impacto sobre o custo do tratamento da inclusão de novo medicamento no país, tendo em vista que o programa brasileiro de tratamento do HIV é totalmente subsidiado pelo governo federal.

Poizot-Martin et al. (2013) analisaram tenofovir no vale de 163 PVHIV e mostraram que as concentrações apresentavam baixa variabilidade intrapessoal após *steady state*, sendo possível extrapolar a realidade cotidiana da concentração nesse período logo antes da ingestão de outra dose. Isso confirma que uma única quantificação é suficiente para medir de forma confiável a concentração de tenofovir, conforme utilizado neste estudo.

O trabalho de Poizot-Martin (2013) incluiu pessoas jovens (de 11,3 a 21,1 anos), onde a concentração esperada de tenofovir no plasma seria um pouco maior devido a aumento da dose relativa, e encontrou uma faixa de concentração de tenofovir no vale de 61-135 ng/mL. Estes autores concluíram que pessoas com concentração plasmática de tenofovir no vale maior que 90 ng/mL têm risco maior de ter insuficiência renal, principalmente mulheres e indivíduos mais velhos (POIZOT-MARTIN et al. 2013). No entanto, no nosso estudo encontramos concentrações de $31,5 \pm 22,5$ ng/mL no vale, abaixo desse valor.

Embora vários estudos estejam disponíveis na literatura avaliando a função renal dos participantes quando em uso de TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila, não foram encontrados estudos que avaliassem PVHIV com a TARV atual usada no Brasil (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico). Daar et al. (2011) observaram que diferentes TARV apresentam diferentes desfechos para a depuração de creatinina, sendo que a comparação de dois esquemas de TARV constituída de fumarato de tenofovir desoproxila, emtricitabina e atazanavir + ritonavir, e fumarato de tenofovir desoproxila + emtricitabina e efavirenz apresentou diferenças nas concentrações plasmáticas de tenofovir (DAAR et al., 2011).

Nossos resultados de concentrações de tenofovir no plasma apresentaram valores mais baixos quando comparados àqueles encontrados no estudo de farmacocinética de Baheti et al. (2011) envolvendo 55 pessoas (BAHETI et al., 2011). No entanto, nesse trabalho houve uso de lopinavir/ritonavir ou atazanavir/ritonavir, fármacos que podem aumentar as concentrações de tenofovir entre 22 e 32% (GOICOECHEA, 2008).

Tendo em vista os efeitos renais do tenofovir e a possível relação com as concentrações plasmáticas, o uso do método de determinação validado neste estudo poderá contribuir para identificar precocemente indivíduos que podem apresentar efeitos renais mais pronunciados. Outra aplicação do uso da concentração plasmática de fármacos se refere à adesão ao tratamento, já que as ferramentas mais usuais para monitorar a adesão, como autorrelato, contagem de comprimidos e visitas domiciliares,

apresentam limitações. Cressey et al. (2017) propôs um protocolo para validação de método de quantificação de tenofovir na pré-dose como alternativa para monitorar a adesão.

Este estudo tem algumas limitações que devem ser mencionadas. O uso de dados secundários retrospectivos, especialmente de parâmetros clínicos causou algumas lacunas, como falta de dados de peso corpóreo e dosagem de creatinina sérica, que limitaram as análises de alteração da creatinina sérica e da depuração de creatinina estimada. Como se trata de uma amostra de conveniência, o número de pessoas que concordaram com a coleta de sangue foi limitada (27% dos participantes), e não foi possível coletar o sangue de todos os participantes no momento ideal para essa análise, o vale da concentração plasmática de tenofovir logo antes da ingestão da próxima dose da TARV. Finalmente, o método foi validado para quantificação de apenas um dos três fármacos que constituem a TARV utilizada como primeira linha no Brasil, tendo em vista que não foi possível obter padrão de dolutegravir sódico.

VII. CONCLUSÃO

A população de PVHIV em uso de TARV incluída neste estudo era constituída predominantemente de homens, com mediana de idade de 31,5 (19-67) anos, com índice de massa corporal normal ou sobrepeso, provenientes da região leste do Distrito Federal com média de T CD4+ dentro dos valores de normalidade.

Os valores de creatinina sérica e da depuração de creatina estimada das PVHIV em uso de TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico indicaram diminuição da função renal após aproximadamente três e seis meses de tratamento, correspondendo a 24% de valores de creatinina acima dos valores de referência e 31% de valores de depuração de creatina estimada abaixo da normalidade.

O método desenvolvido e validado para quantificação de tenofovir mostrou-se simples, rápido e adequado para o estudo das concentrações plasmáticas em PVHIV.

As concentrações plasmáticas de tenofovir variaram em função do tempo entre a última dose e a coleta, e foi possível estabelecer valores de referência para utilização em estudos futuros considerando o esquema de TARV de primeira linha vigente no Brasil.

Apesar de todos os avanços no tratamento da infecção pelo HIV, ainda há muitos desafios a serem enfrentados para que tratamentos cada vez mais efetivos e seguros possam ser disponibilizados em larga escala para a população. Desta forma, os dados epidemiológicos sobre a função renal de PVIH em uso do esquema de primeira linha no Brasil devem ser cuidadosamente avaliados e o método de quantificação de tenofovir no plasma, desenvolvido neste trabalho, pode contribuir para tornar o uso desses medicamentos mais seguros.

VIII. REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2ed. Tradução – Bárbara de Alencar Leão Martins et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

AGRAHARI, V.; YOUAN, B.C.; Sensitive and rapid HPLC quantification of tenofovir from Hyaluronic acid-based nanomedicine. *AAPS Pharm SciTech*, v. 13, n. 1, pp. 202-210, 2012

ANDO, M.; YANAGISAWA, N.; Epidemiology, clinical characteristics, and management of chronic kidney disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *World Journal of Nephrology*, v. 4, n. 3, p. 388-395, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA- ABESO; Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO. 3. ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.

AUSTRALASIAN SOCIETY HIV MANAGEMENT IN AUSTRALASIA. A GUIDE FOR CLINICAL CARE 2016. Disponível em: <<http://hivmanagement.ashm.org.au/>>. Acessado em: 13 jun. 2019.

BAHETI, G.; KISER, J.J.; HAVENS, P.L.; FLETCHER, C.V. Plasma and intracellular population pharmacokinetic analysis of tenofovir in HIV-1-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 55, n. 11, pp. 5294-5299, 2011.

¹ De acordo com NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002.

BARKIL, M.; GAGNIEU, M-C.; GUITTON, J. Relevance of a combined UV and single mass spectrometry detection for the determination of tenofovir in human plasma by HPLC in therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, v. 864, n. 1-2, pp. 192-197, 2007.

BEGLEY, R.; DAS, M.; ZHONG, .; LING, J.; KEARNEY, B.P.; CUSTODIO, J.M. Pharmacokinetics of tenofovir alafenadime when coadministered with other HIV antiretrovirals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. V. 78, n. 4, pp. 465-472, 2018.

BEZY, V.; MORIN, P.; COUERBE, P.; LELEU, G.; AGROFOGLIO, L. Simultaneous analysis of several antiretroviral nucleosides in rat-plasm by high-performance liquid chromatography with UV using acetic acid/hydroxylamine buffer. Test of this new volatile medium-pH for HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 821, n. 2, pp. 132-143, 2005.

BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Último acesso em: 21/03/2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Aconselhamento em DST, HIV e Aids: diretrizes e procedimentos básicos. Brasília (DF): Coordenação Nacional de DST e Aids; 1997.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde, Departamento de atenção básica. HIV/aids, hepatites e outras DST. Cadernos de Atenção Básica - n. 18 Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV: manual de bolso. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. 244p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. 217pp.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 416pp. (A)

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Nota informativa Nº 007/2017 – DDAHV/SVS/MS, 2017. (B)

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Ministério da Saúde; 2018. 416pp.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fluxograma para profissionais de saúde – Primeiro atendimento da PEP. Brasília:Ministério da Saúde; 2019. Disponível em http://www.aids.gov.br/pt-br/centrais-de-conteudos/biblioteca_busca/pep Acessado em: 08/08/2019.

BRASÍLIA. Relatório anual de gestão. Secretaria de Estado de Saúde. Governo do Distrito Federal, junho de 2018. Disponível em: <http://www.saude.df.gov.br/wp-conteudo/uploads/2017/11/RAG-2017_CSDF_10.12.2018.pdf> - Acesso em: 20 de maio de 2019.

CARTER H. The Science of HIV & Aids in UK. The Naked Scientists. Posted in 30 June 2007. Disponível em: <<https://www.thenakedscientists.com/articles/features/science-hiv-aids-uk>>. Acessado em: 13 jun. 2019.

COLLINS, J.W.; HULL, J.H.; DUMOND, J.B. Comparison of tenofovir plasma and tissue exposure using a population pharmacokinetic model and bootstrap: a simulation study from observed data. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, v. 44, n. 6, pp. 631-640, 2017..

COOPER, R.D.; WIEBE, N.; SMITH, N.; KEISER, P.; NAICKER, S. TONELLI, M. Systematic review and meta-analysis: renal safety of Tenofovir Desoproxila Fumarate and HIV-infected patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 5, p. 496-505, 2010.

CRESSEY, T.R.; SIRIPRAKASIL, O.; KLINBUAYAEM, V.; QUAME-AMAGLO, J.; KUBIAK, R.W.; SUKRAKANCHANA, P.; THAN-IN-AT, K.; BAETEN J.; SIRIRUNGSI, W.; CRESSEY, R.; DRAIN, P.K. A randomized clinical pharmacokinetic trial of Tenofovir in blood, plasma and urine in adults with perfect, moderate and low PrEP adherence: the TARGET study. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, n. 496, pp. 1-6, 2017.

DAAR, E.S.; TIERNEY, C; FISCHL, M.A.; SAX, P.E.; MOLLAN, K.; BUDHATHOKI, C.; GODFREY, C.; JAHED, N.C.; MYERS, L.; KATZENSTEIN, D.; FARAJALLAH.; A.; ROONEY, J.F.; PAPPA, K.A.; WOODWARD, W.C.; PATTERSON, K.; BOLIVAR, H.; BENSON, C.A.; COLLIER, A.C.; Atazanavir plus ritonavir or efavirenz as part of a 3-drug regimen for initial treatment of HIV-1. *Annals of Internal Medicine*. V. 154, n.7, pp. 445–56, 2011.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; ROBBINS, B.; FLETCHER, C.V.; The simultaneous assay of tenofovir and emtricitabine in plasma using LC/MS/MS and isotopically labeled internal standards. *Journal of Chromatography B*. v. 877, n. 20-21, pp. 1907-1914, 2019.

DRUGS. Tenofovir Drug Interactions. Disponível em: <<https://www.drugs.com/drug-interactions/tenofovir-index.html>>. Acesso em: 05/08/2019.

ENÉAS, P.C.R. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de efavirenz, lamivudina e fumarato de tenofovir desoproxila em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, p. 256. 2014.

FAGUNDES, K.H. Uso de tenofovir e alteração da função renal. Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília – DF, p. 14. 2016.

FINE, D.M.; GALLANT, J.E. Nephrotoxicity of antiretroviral agents: Is the list getting longer? *The journal of infectious diseases*, V. 207, n. 13, p. 1349-51, 2013.

GANDHI, M.; GLIDDEN, D.V.; MAYER, K.; SCHECHTER, M.; BUCHBINDER, S.; GRINSZTEJN, B.; HOSEK, S.; CASAPIA, M.; GUANIRA, J.; BEKKER, L.G.; LOUIE, A.; HORNG, H.; BENET, L.Z.; LIU, A.; GRANT, R.M. Association of age, baseline kidney function, and medication exposure with declines in creatinine clearance on pre-exposure prophylaxis: an observational cohort study. *Lancet HIV* 2016, v. 3, n. 11, p. 521-528, 2016.

GOICOECHEA, M.; LIU, S.; BEST, B.; SUN, S.; JAIN, S.; KEMPER, C.; WITT, M.; DIAMOND, C.; HAUBRICH, R.; LOUIE, S. Greater tenofovir-associated renal function decline with protease inhibitor-based versus nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. V. 197, n. 1, pp. 102-108, 2008.

GOICOECHEA, M.; ZHENG, Y.; HUGHES, M. et al. Antiretroviral regimen and pharmacogenetic determinants of tenofovir-associated change in creatinine clearance in ACTG protocol A5142.. In. XVIII International AIDS Conference; July 18–32, 2010; Vienna, Austria. 2010. Abstract: WEAB0305. Citado por: SIRIRUNGSI, W.; SAIK, U.; HARRISON, L.; KAMKON, J.; TAWON, Y.; LUEKAMLUNG, N.; THONGPAEN S.; NILMANAT, A.; JOURDAIN, G.; LALLEMANT, M.; LE COEUR, S.; NGO-GIANG-HUONG, N.; OWEN, A.; CRESSEY, T.R. No relationship between drug transporter genetic variants and tenofovir plasma concentrations or changes in glomerular filtration rate in HIV-infected adults. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. V. 68, n. 4, pp. e56-e59, 2015.

GOMES, N.A.; VAIDYA, V.V.; PUDAGE, A.; JOSHI, S.S.; PAREKH, S.A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V. 48, n. 3, pp. 918-926, 2008.

HALL, A.M. Update on tenofovir toxicity in the kidney. *Pediatric Nephrology*, V. 28, n. 7, p. 1011-1023, jul. 2013

HAVENS, P.L.; KISER, J.J.; STEPHENSEN, C.B.; HAZRA, R.; FLYNN, P.M.; WILSON, C.M.; RUTLEDGE, B.; BETHEL, J.; PAN, C.G.; WOODHOUSE, L.R.; VAN LOAN, M.D.; LIU, N.; LUJAN-ZILBERMANN, J.; BAKER, A.; KAPOGIANNIS, B.G.; GORDON, C.M.; MULLIGAN, K. Association of higher plasma vitamin D binding protein and lower free calcitriol levels with tenofovir desopoxila fumarate use and plasma and intracellular tenofovir pharmacokinetics: cause of a functional vitamin D deficiency? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, V. 57, n. 11, p. 5619-5628, 2013.

JULLIEN, V.; TRÉLUYER, J-M.; REY, E.; JAFRAY, P.; KRIVINE, A.; MOACHON, L.; LOUET, A.L-L.; LESCOAT, A.; DUPIN, N.; SALMON, D.; PONS, G.; URIEN, S. Population pharmacokinetics of tenofovir in human immunodeficiency vírus-infected patients taking highly active antiretroviral therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 8, pp. 3361-3366, 2005.

KIM, Y.K.; CHOI, M.J.; OH, T.Y.; YU, K-S.; LEE, S. A comparative pharmacokinetic and tolerability analysis of the novel orotic acid salt form of tenofovir desopoxila and the fumaric acid salt form in healthy subjects. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, pp. 3171-3177, 2017.

KOLE, P.L.; VENKATESH, G.; KOTTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*. V. 25, pp. 199-217, 2010.

KOU, H.; DU, X.; LI, Y.; FU, Q.; ZHU, Z.; LI, T. Quantification of tenofovir in human plasma by solid-extraction and high-performance liquid chromatography coupled with UV detection. *Therapeutic Drug Monitoring*. V. 34, n. 5, pp. 593-598, 2012.

LUM E.L.; HUANG, S.; HUANG, J.; LASSMAN C. Acute kidney injury in a patient with well-controlled HIV infection. *American Journal of kidney diseases AJKD*, Vol 65, p. 22-25, 2015

MA, J.; SHI, J.; LE, H.; CHO, R.; HUANG, J.C.; MIAO, S.; WONG, B.K. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*. V. 862, n. 1-2, pp. 219-226, 2007

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.D.; Reversed phase HPLC determination of zidovudine in rat plasma and its pharmacokinetics after a single intranasal dose administration. *Biol Res*, V. 42, n. 3, p. 357-364, 2009.

MOCROFT, A.; LUNDGREN, J.D.; ROSS, M.; FUX, C.A.; REISS, P.; MORANNE, O.; MORLAT, P.; MONFORTE, A.A.; KIRK, O. RYOM, L.; Cumulative and current exposure to potentially nephrotoxic antiretrovirals and development of chronic kidney disease in HIV-positive individuals with a normal baseline estimated glomerular filtration rate: a prospective international cohort study. *The Lancet*, v. 3, n. 1, p. e23-e32, 2016.

MOSS, D.M.; DOMANICO, P.; WATKINS, M.; PARK, S.; RANDOLPH, R.; WRING, S.; RAJOLI, R.K.R.; HOBSON, J.; RANNARD, S.; SICCARDI, M.; OWEN, A. Simulating intestinal transporter and enzyme activity in a physiologically based pharmacokinetic model for tenofovir desopoxila fumarate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. V. 61, n. 7, pp. e00105-17, 2017.

NISHIJIMA, T.; HAYASHIDA, T.; KUROSAWA, T.; TANAKA, N.; OKA, S.; GATANAGA, H.; Drug transporter genetic variants are not associated with TDF-related renal dysfunction in patients with HIV-1 infection: A pharmacogenetic study. *PLOS/ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141931>, p. 1-12, 2015.

NISHIJIMA, T.; KOMATSU, H.; GATANAGA, H.; AOKI, T.; WATANABE, K.; EI KINAI; HONDA, H.; TANUMA, J.; YAZAKI, H.; TSUKADA, K.; HONDA, M.; TERUYA, K.; KIKUCHI, Y.; OKA, S.; Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of japanese patients. *Plos One*, V. 6, n. 7, p.1-8, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach. 2^a ed, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Update of recommendations on first – and second – line antiretroviral regimens. p. 16 2019.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X.O.; CHANG, S.H.; NURIEVA, R.; WANG, Y.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*. V. 6, n. 11, pp. 1133-1141, 2005.

PAVLOS, R.; PHILLIPS, E.J.; Individualization of antiretroviral therapy. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. V. 5, pp. 1-17, 2012.

POIZOT-MARTIN, I.; SOLAS, C.; ALLEMAND, J.; OBRY-ROGUET, V.; PRADEL V.; BREGIGEON, S.; FAUCHER, O.; LACARELLE, B. Renal impairment in patients receiving a tenofovir-cART regimen: impact of tenofovir trough concentration. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. V. 62, n. 4, pp. 375-380, 2013.

RODRIGUEZ-NOVOA, S.; LABARGA, P.; D'AVOLIO, A.; BARREIRO, P.; ALBALATE, M.; VISPO, E.; SOLERA, C.; SICCARDI, M.; BONORA, S.; DI PERRI, G.; SORIANO, V. Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS*. V. 24, n. 7, pp. 1064-1066, 2010.

RUNGTIVASUWAN, K.; AVIHINGSANON, A.; THAMMAJARUK, N.; MITRUK, S.; BURGER, D.M.; RUXRUNGTHAM, K.; SUKASEM, C.; PUNYAWUDHO, B. Pharmacogenetics-based population pharmacokinetic analysis of tenofovir in Thai HIV-infected patients. *Pharmacogenomics*. V. 18, n. 16, pp. 1481-1490, 2017.

RYOM, L.; MOCROFT, A.; KIRK, O.; WORM, S.W.; KAMARA, D.A.; REISS, P.; ROSS, M.; FUX, C.A.; MORLAT, P.; MORANNE, O.; SMITH, C. LUNDGREN, J.D.; Association between antiretroviral exposure and renal impairment among HIV-positive person with normal baseline renal function: the D:A:D study. *The journal of infectious diseases*, V. 207, n. 9, p. 1359-69, 2013.

SANCHE, S.; SHEEHAN, N.; MESPLEDE, T.; WAINBERG, M.A.; LI, J.; NEKKA, F. A Mathematical model to predict HIV virological failure and elucidate the role of lymph node drug penetration. *Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. V. 6 pp. 469-476, 2017.

SCHAUER, A.P.; SYKES, C.; COTTRELL, M.L.; PRINCE, H.M.A.; KASHUBA, A.D.M. Validation of an LC-MS/MS assay to simultaneously monitor the intracellular active metabolites of tenofovir, emtricitabine and lamivudine in dried blood spots. V. 149, pp. 40-45, 2018.

SEIFERT, S.M.; CASTILLO-MANCILLA, J.R.; ERLANDSON, K.; MORROW, M.; GANDHI, M.; KUNCZE, K.; HORNG, H.; ZHENG, J.; BUSHMAN, L.R.; KISER, J.J.; MAWHINNEY, S.; ANDERSON, P.L. Adherence biomarker measurements in older and younger HIV-infected adults receiving tenofovir-based therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes – JAIDS*. V. 77, n. 3, pp. 295-298, 2018.

SENTENAC, S.; FERNANDEZ, C.; THUILLIER, A.; LECHAT, P.; AYMARD, G. Sensitive determination of tenofovir in human plasma samples using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. v. 793, n. 2, pp. 317-324, 2003.

SHEDLOCK, D.J.; SHEN, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. Postado em março de 2003. Disponível em: <[http://aidsscience.org/Science/300\(5617\)337.html](http://aidsscience.org/Science/300(5617)337.html)> Último acesso em: 08/07/2019.

SILVA, P.A. Habilidades matemáticas e memória operacional em crianças de 7 a 12 anos infectadas pelo HIV por transmissão vertical, em estado assintomático. Dissertação (mestrado em psicologia) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Assis – SP, p. 87. 2011.

SIRIRUNGSI, W.; SAIK, U.; HARRISON, L.; KAMKON, J.; TAWON, Y.; LUEKAMLUNG, N.; THONGPAEN S.; NILMANAT, A.; JOURDAIN, G.; LALLEMANT, M.; LE COEUR, S.; NGO-GIANG-HUONG, N.; OWEN, A.; CRESSEY, T.R. No relationship between drug transporter genetic variants and tenofovir plasma concentrations or changes in glomerular filtration rate in HIV-infected adults. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. V. 68, n. 4, pp. e56-e59, 2015.

TAKAHASHI, M.; KUDAKA, Y.; OKUMURA, N.; HIRANO, A.; BANNO, K.; KANEDA, T. Determination of plasma tenofovir concentrations using a conventional LC-MS method. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. V. 30, n. 9, pp. 1784-1786, 2007.

TOLEDO, M.I.; SILVA, A.W.M.; SILVA, D.L.M.; SILVA, E.V.; OLIVEIRA, F.A.R.; NÓBREGA, H.V.; CRUZ, I.A.; FAGUNDES, K.H.; MEINERS, M.M.M.A.; GUIMARÃES, R.S.F.; SAAVEDRA, P.A. Cuidado farmacêutico aos pacientes com HIV/AIDS. In: SANTOS, P.C.J.L. (Org.) Cuidado Farmacêutico para Pacientes com Câncer, Hepatite, HIV/AIDS, Dengue e Outras Doenças. 1. ed. - Rio de Janeiro : Atheneu, 2019. pp. 171-190.

WAHL, A.; HO, P.T.; DENTON, P.W.; GARRETT, K.L.; HUDGENS, M.G.; SWARTZ, G.; O'NEILL, C.; VERONESE, F.; KASHUBA, A.D.; GARCIA, J.V. Predicting HIV pre-exposure prophylaxis efficacy for women using a preclinical pharmacokinetic-pharmacodynamic in vivo model. *Scientific Reports*. V. 7, 2017.

WANGA, V.; VENUTO, C; MORSE, G.D.; ACOSTA, E.P.; DAAR, E.S.; HAAS, D.W.; LI, C.; SHEPHERD, B.E.; Genome-wide association study of tenofovir pharmacokinetics and creatinine Clearance in AIDS clinical trials group protocol A5202. *Pharmacogenet Genomics*. V. 25, n. 9, pp. 450-461, 2015.

ZHENG, J-H.; GUIDA, L.A.; ROWER, C.; CASTILLO-MANCILLA, J.; MEDITZ, A.; KLEIN, B.; KERR, B.J.; LANGNESS, J.; BUSHMAN, L.; KISER, J.; ANDERSON, P.L. Quantitation of tenofovir and emtricitabine in dried blood spots (DBS) with LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V. 88, 2014.

APÊNDICE 1: Dados clínicos dos participantes da pesquisa

Voluntários	Sexo	Idade	Peso (kg)	IMC	CD4 basal	CD4 pós-TARV	Creatinina Basal	Creatina pós-TARV	ClCr basal	ClCr pós-TARV	Conc. Tenofovir
1	M	28			725	1079	1	1			73,05
2	M	33			17	157	0,9	0,9			49,7
3	M	44			1273	1319	0,8	1,1			82,5
4	M	32	75	24,8	546	433	0,7	0,8	160,7	140,6	66,4
5	M	26	70	25,1	568		0,9	1,3	123,1	85,3	57
6	M	26	89	26,0		943					61,1
7	F	43	65	29,3	131		0,9	0,9	82,7	82,7	40,8
8	M	51	72	24,9	1026		1,1	1,3	80,9	68,5	48,9
9	M	26	64,2		1313	1154	1,2	1,5	84,7	67,8	27,25
10	M	38	103	30,8	661	990	1		145,9		29,49
11	M	36	70	21,6	127	223	0,9	1	112,3	101,1	50,4
12	M	23	70	22,9	351		0,9	1,3	126,4	87,5	112,7
13	M	29	103	34,8	935	1154	0,7	0,7	226,8	226,8	59,2
14	M	28	60	18,7	430	516	0,96	1,1	97,2	84,8	44
15	M	33	79	25,8	269	561	0,8	1,1	146,8	106,7	25,89
16	M	31	66	21,1	9	121	1,1	1,1	90,8	90,8	43,6
17	M	24				1150	0,9	1			30,69
18	M	30				795		1,1			19,65
19	M	42	68	21,5	52	192	0,9	1,2	102,8	77,1	37,2
20	M	38	88	30,4	669	593	1,1	1,3	113,3	95,9	40,2
21	M	55	96,5	28,2	239		1,7	1,37	67,0	83,2	19,78
22	M	40	71	22,4	301	429	0,8	1	123,3	98,6	30,07

Voluntários	Sexo	Idade	Peso (kg)	IMC	CD4 basal	CD4 pós-TARV	Creatinina Basal	Creatina pós-TARV	CICr basal	CICr pós-TARV	Conc. Tenofovir
23	M	30	65	23,9	128	203	1	1,6	99,3	62,1	41,2
24	M	23	56	19,8		932	0,9	0,8	101,1	113,8	29,61
25	M	37	75	26,6	268	338	1,1	1,2	97,5	89,4	
26	M	25	82	24,5	908	943	1,2	1,5	109,1	87,3	
27	F	35	86		561	576	0,75	1,1	142,1	96,9	
28	M	22	72		630,8	768	1,1	1,2	107,3	98,3	
29	M	35	76	26,9	951	1104					
30	M	24	82,6	25,2	342		0,7	0,9	190,1	147,9	
31	M	32	87	29,8		488		1,3		100,4	
32	M	38			468		1	1			
33	M	36	64	21,1	364	437	1,1	1,1	84,0	84,0	
34	M	46	80	23,1		1328	1	1,4	104,4	74,6	
35	M	22	74	23,4	581		1	1,1	121,3	110,3	
36	M	24	68	21,7	1415		0,8	1,1	136,9	99,6	
37	M	42	67,3		285	498	1	1	91,6	91,6	
38	M	34	72	23,5	537	593	1,1		96,4		
39	M	25	65	22,8		620	0,56		185,4		
40	M	24	71,5			593		1,1		104,7	
41	M	38			2218		1,2				
42	M	33					1,1	0,9			
43	F	40	68	23,0	90		1,1	1,4	73,0	57,3	
44	M	32				688		1,4			
45	M	24	70	20,5	200	376	1	1,1	112,8	102,5	
46	F	46	59		475	558	0,7	0,9	93,5	72,7	
47	M	23			1007	1007	0,9	1,2			

Voluntários	Sexo	Idade	Peso (kg)	IMC	CD4 basal	CD4 pós-TARV	Creatinina Basal	Creatina pós-TARV	CICr basal	CICr pós-TARV	Conc. Tenofovir
48	M	19	72	23,0	524		1,2	1	100,8	121,0	
49	M	25	75	24,8	700		1,1	1,1	108,9	108,9	
50	M	42	90	30,8	309	580	0,9	1,1	136,1	111,4	
51	M	28	80	26,4	541	778	1,1	1,2	113,1	103,7	
52	M	23	67	20,5	934			1,1		99,0	
53	M	26	117,5	32,5	210	755	1	1,1	186,0	169,1	
54	M	21	83	24,8	290		1,1	1,5	124,7	91,5	
55	M	30			923		0,9	1			
56	M	21			377			1			
57	M	24						1,1			
58	M	23	61		84	277		1,4		70,8	
59	M	41			54	321	0,7	1,1			
60	M	38			22	145	1	1,3			
61	M	25	85	26,2		808	1,1	1,3	123,4	104,4	
62	M	47	65	22,5	485	581	1	1,2	84,0	70,0	
63	M	43	64	21,9	349	621	0,9	1,1	95,8	78,4	
64	M	21	75	23,1		359	0,8	1,1	154,9	112,7	
65	M	32					0,95	1,2			
66	M	22			569		1,1	1,2			
67	M	35			1013		0,9	1,2			
68	F	67			883		0,4	0,4			
69	M	49	75	23,7	417		0,8	1,2	118,5	79,0	
70	M	46			942		0,8	1,1			
71	M	33			287	558	1,2	1,1			
72	M	32	72	22,7	43	84	1	1,2	108,0	90,0	

Voluntários	Sexo	Idade	Peso (kg)	IMC	CD4 basal	CD4 pós-TARV	Creatinina Basal	Creatina pós-TARV	ClCr basal	ClCr pós-TARV	Conc. Tenofovir
73	F	36	75	27,5	1100	1038	1,2	1,1	76,7	83,7	
74	M	48			575	522	0,8	1			
75	F	38			708		0,7	0,8			
76	M	24	51	18,3		707	0,9	1	91,3	82,2	
77	M	26			17	91	1,3	0,9			
78	M	41	59	23,3	460		0,9		90,1		
79	M	30									
80	M	28	76	24,8	551		1,1		107,5		
81	M	25			1371	1787	0,7				
82	M	24	53,1	17,9	206	211	1	1	85,6	85,6	
83	M	62					1				
84	M	27	82,7		145	200	1,2	1,3	108,2	99,8	
85	M	30			232	557	0,9	1,2			
86	M	36	73		887			0,9		117,2	
87	M	25	62	20,0				1,2		82,5	
88	M	27	94,5	32,3	700		1,3	1,4	114,1	105,9	
89	M	26	83	29,8	656	887	1,1	1	119,5	131,4	

APÊNDICE 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Projeto: CUIDADO FARMACÊUTICO PARA PESSOAS QUE VIVEM COM HIV (PVHIV) NA FARMÁCIA ESCOLA UNB

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa Cuidado farmacêutico para pessoas que vivem com HIV (PVH) na farmácia escola UnB/HUB, sob a responsabilidade das pesquisadoras Maria Inês de Toledo e Noêmia U.T. Leão, com a participação do aluno Ringo Star Fernandes Guimarães. Esta parte do projeto tem como objetivo verificar a quantidade do medicamento tenofovir no seu sangue.

O objetivo desta pesquisa é analisar o serviço do cuidado farmacêutico para pessoas que vivem com HIV (PVH) na Farmácia Escola HUB/UNB/EBSERH.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio de resposta a um questionário sobre o uso dos medicamentos e coleta de uma pequena quantidade (3,5 mL) do seu sangue realizada durante exames de rotina com um tempo estimado de no máximo 5 minutos a mais do tempo usualmente gasto na sua rotina dentro do hospital para sua realização.

A pesquisa traz poucos riscos ao senhor(a), tais como, 1) pequeno gasto adicional de tempo já que as atividades serão realizadas em conjunto com os seus exames de rotina, 2) risco normal da coleta de sangue que será realizada por técnico treinado em coleta de rotina, 3) identificar possíveis falhas na adesão ao tratamento pois será possível saber se o(a) senhor(a) não estiver ingerindo os comprimidos. Se o(a) senhor(a) aceitar participar, estará contribuindo para avaliar os serviços clínicos farmacêuticos da Farmácia Escola.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a participar de qualquer procedimento ou responder qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a) ou alteração no seu atendimento no HUB. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, o senhor (a) poderá buscar ser indenizado(a), bem como ser ressarcido(a) de despesas adicionais decorrentes de sua participação na pesquisa, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados, sem identificação dos usuários, no Núcleo de Medicina Tropical na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Ringo Star Fernandes Guimarães, no Laboratório de Toxicologia, no

Hospital Universitário de Brasília (61) 3448.5000 SGAN 605, Av. L2 Norte Brasília / DF. Cep: 70.830-200



telefone (61) 998593369, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou para a Profa. Noêmia na Farmácia Escola (Fone (61) 2028-5018). O contato pode ser feito também por email: ringo_star_2005@hotmail.com

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a).

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável
Nome e assinatura

Brasília, ____ de _____ de _____.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: CUIDADO FARMACÊUTICO PARA PESSOAS QUE VIVEM COM HIV (PVHIV) NA FARMÁCIA ESCOLA UNB

Pesquisador: NOEMIA URRUTH LEÃO TAVARES

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 85133418.0.0000.0030

Instituição Proponente: FACULDADE DE SAÚDE - FS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.133.545

Apresentação do Projeto:

"O presente projeto será desenvolvido em etapas com diferentes estratégias metodológicas e desenhos quantitativo e qualitativo de acordo com os objetivos do estudo, a saber: 1) Elaboração e validação do Protocolo de Dispensação de TARV e validação do instrumento de acompanhamento farmacoterapêutico. Para validação dos instrumentos, serão realizadas oficinas com a equipe da farmácia escola e equipe interdisciplinar e multiprofissional, utilizando a técnica de consenso grupo nominal e posteriormente um consenso com especialistas na área de serviços farmacêuticos clínicos utilizando o método Delphi. 2) Coorte Clínica: Estudo observacional, será realizada uma coorte clínica retrospectiva onde serão analisados os dados de pacientes que iniciaram TARV entre novembro de 2017 e maio de 2018 em acompanhamento farmacoterapêutico por seis meses na unidade (novembro de 2017 a outubro de 2018). Os dados serão extraídos do banco de dados do serviço, em novembro de 2018 de forma retrospectiva."

"Metodologia Proposta: O presente projeto será desenvolvido na Farmácia Escola (FE) da Universidade de Brasília (UNB), farmácia comunitária ambulatorial vinculada ao Hospital Universitário de Brasília. O presente projeto será desenvolvido em etapas com diferentes estratégias metodológicas quantitativa e qualitativa de acordo com os objetivos do estudo, a saber: 1) Elaboração e validação do Protocolo de Dispensação de TARV. Será elaborado e validado um Protocolo de dispensação de medicamentos antirretrovirais, que permitirá a definição dos

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



parâmetros para atendimento dos usuários de TARV e definidos critérios utilizados para a estratificação dos pacientes de acordo com a necessidade da oferta de serviços clínicos mais complexos. 2) Validação do instrumento de acompanhamento farmacoterapêutico Será realizado a validação do instrumento testado e utilizado no serviço de acompanhamento farmacoterapêutico dos usuários de TARV pelo serviço. 3) Coorte Clínica: será realizada uma coorte clínica de pacientes em acompanhamento farmacoterapêutico na Farmácia Escola do HUB/UNB/EBSERH, cujos dados estiverem disponíveis no banco de dados do serviço. O serviço de acompanhamento farmacoterapêutico realizado no serviço inclui pacientes em início ou mudança de tratamento, bem como os encaminhados pela equipe multiprofissional devido a falhas terapêuticas ou de adesão e os triados na farmácia durante a dispensação. Durante o acompanhamento é realizada uma consulta de entrada (basal) e mais cinco consultas até o 6º mês de tratamento após a entrada no serviço. No 1º e no 6º mês de acompanhamento dos pacientes é aplicado o instrumento de Avaliação da Qualidade de Vida da Organização Mundial de Saúde (versão abreviada) (WHOQOL-bref). Em caso de relato de reações adversas, além da notificação no sistema Vigihosp, o algoritmo de Naranjo será utilizado para avaliar a causalidade. Desfechos e medidas no seguimento dos pacientes:

- A adesão ao tratamento será avaliada de três formas dependendo da fonte de informação: 1) Adesão autorreferida do paciente ao tratamento (avaliada pela versão traduzida do Brief Medication Questionnaire (BMQ) (31); 2) Registro de dispensação (Percentual de retirada de medicamentos na farmácia durante o período de seguimento); 3) Avaliação direta através do monitoramento da concentração plasmática realizada na avaliação da condição clínica (realizada após a validação do método experimental, adaptado Da ENEAS, PCR et al, 2014). Serão colhidas amostras de sangue (3,5, mL) adicionais de PVHIV após 90 de início de tratamento (na mesma ocasião de coleta de exames de rotina) de pacientes que concordarem em participar do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Efetividade do tratamento TARV (resposta satisfatória ao tratamento, entendida como a ocorrência simultânea, no período de seguimento de 1) evolução imunológica favorável, 2) ausência de hospitalização; 3) não existência de qualquer novodiagnóstico de evidência de imunodeficiência grave (aids) (17, 27).
- Qualidade de vida do paciente (instrumento de Avaliação da Qualidade de Vida da Organização Mundial de Saúde (versão abreviada) (WHOQOL-bref))
- Ocorrência de Reações Adversas será avaliada de três maneiras, de acordo com sua fonte de informação:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.133.545

1) Autorrelato: qualquer efeito ou sintoma indesejável, relatado pelo paciente associado ao uso de TARV durante os seguimento utilizando o algoritmo de Naranjo para avaliação de causalidade; 2) Registro médico: qualquer efeito ou sintoma indesejável, registrado em prontuário, como resultante do uso de ARV durante os primeiros 12 meses de tratamento; 3) Registro de exames laboratoriais a partir do registro no prontuário; 4) Construção de indicadores de monitoramento e avaliação do serviço de cuidado farmacêutico.

Com base nos formulários e protocolo validados serão construídos indicadores de oferta, demanda e indicadores clínicos de monitoramento e avaliação do serviço implantado."

"Critério de Inclusão: Pacientes adultos (18 anos ou mais) que iniciaram TARV entre novembro de 2017 a maio de 2018 em acompanhamento farmacoterapêutico na Farmácia Escola pelo período de seis meses."

"Critério de Exclusão: Pacientes em acompanhamento médico da infecção pelo HIV diferente do ambulatório do HUB."

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

Avaliar o processo de implantação do cuidado farmacêutico para pessoas que vivem com HIV (PVHIV) na Farmácia Escola da UNB."

"Objetivo Secundário:

- Validar os instrumentos utilizados para realização e registro dos serviços clínicos desenvolvidos na Farmácia Escola;
- Elaborar e validar o protocolo de dispensação da Terapia Antirretroviral (TARV) visando a promoção do uso racional de medicamentos e estratificação de risco dos pacientes em relação aos problemas relacionados a farmacoterapia;
- Analisar a efetividade dos serviços farmacêuticos clínicos em relação a adesão ao tratamento, qualidade de vida, desfechos clínicos dos pacientes atendidos, bem como monitorar as possíveis reações adversas ao uso da terapia antiretroviral;
- Construir e validar indicadores e metas para o monitoramento e avaliação dos serviços clínicos farmacêuticos."

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

A presente pesquisa apresenta riscos considerados mínimos, como o desconforto com o tempo gasto para a participação na pesquisa, mas não realiza nenhuma intervenção ou modificação adicional nas variáveis fisiológicas ou psicológicas e sociais dos indivíduos que participam no estudo. A coleta de sangue para o monitoramento plasmático será feita juntamente com os exames de rotina já recomendados pelo protocolo de tratamento. Todos os dados de pacientes e equipe serão mantidos em sigilo e nenhum resultado será divulgado individualmente."

"Benefícios:

Os benefícios propostos com o projeto são avaliar a efetividade dos serviços clínicos farmacêuticos implantados na Farmácia Escola e propor indicadores de monitoramento e avaliação dos mesmos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda ao projeto aprovado anteriormente, com inclusão de TCLE para a coleta de amostras de sangue para determinação de tenofovir conforme já previsto no projeto original. Segundo as autoras, embora a coleta de sangue seja realizada no momento da coleta de exames de rotina usando a mesma punção, é necessário incluir TCLE mencionando especificamente que será avaliada a concentração de tenofovir no sangue.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos analisados para emissão do presente parecer:

- 1- Projeto Detalhado: "Projeto_de_cuidado_com_emendamodificado.docx" em 31/01/2019
- 2- Modelo de TCLE: "tcleparacoletadesanguemodificado.docx" em 31/01/2019
- 3- Carta de resposta ao CEP: "cartarespostaparecer.doc" em 31/01/2019

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado No. 3.123.396:

Solicita-se:

1. Quanto ao TCLE:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.133.545

1.1 Deixar claros os riscos envolvidos com a participação na pesquisa. Contemplar os riscos descritos no projeto e também os riscos com a coleta de sangue. Embora a coleta de sangue não seja procedimento exclusivo para a condução da pesquisa, o TCLE será aplicado com a finalidade de usar amostra de sangue, portanto acrescentar potenciais riscos e formas de minimizá-los.

RESPOSTA: "A pesquisa traz poucos riscos aos participantes, tais como, 1) pequeno gasto adicional de tempo já que as atividades serão realizadas em conjunto com os seus exames de rotina, 2) risco normal da coleta de sangue que será realizada por técnico treinado em coleta de rotina, 3) identificar possíveis falhas na adesão ao tratamento pois será possível saber se o(a) senhor(a) não estiver ingerindo os comprimidos".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2 Acrescentar a razão da coleta de sangue no TCLE, conforme explicitada na carta de encaminhamento da emenda ao CEP: "mencionando especificamente que será avaliada a concentração de tenofovir no sangue".

RESPOSTA: Modificamos no TCLE para deixar mais claro: "Esta parte do projeto tem como objetivo verificar a quantidade do medicamento tenofovir no seu sangue".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.3 Mencionar no TCLE o ressarcimento de despesas relacionadas com a participação na pesquisa, conforme disposto no modelo de TCLE disponível no site do CEP/FS (<https://fs.unb.br/cep/modelos-dedocumentos>).

RESPOSTA: Modificamos a redação incluindo o que foi solicitado: "bem como ser ressarcido de despesas adicionais decorrentes de sua participação na pesquisa"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.4 Numerar as páginas do TCLE para preservar a integridade do documento (página 1 de 2, Página 2 de 2).

RESPOSTA: Modificado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5 Acrescentar campo para rubricas do participante e do pesquisador na primeira página.

RESPOSTA: Incluído.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.133.545

2. No projeto da Plataforma Brasil e no projeto detalhado emendado, incluir riscos da coleta de sangue e formas de minimizá-los.

RESPOSTA: O projeto foi modificado na página 11 conforme segue: "A presente pesquisa apresenta riscos considerados mínimos, tais como, 1) pequeno gasto adicional de tempo, 2) risco normal da coleta de sangue 3) identificar possíveis falhas na adesão ao tratamento pois será possível saber se o participante não estiver ingerindo os comprimidos. Para minimizar os riscos salientamos que não haverá nenhuma intervenção ou modificação adicional nas variáveis fisiológicas ou psicológicas e sociais dos indivíduos que participam no estudo, a coleta de sangue para o monitoramento plasmático será feita juntamente com os exames de rotina já recomendados pelo protocolo de tratamento e por técnicos treinados do serviço. Todos os dados de pacientes e equipe serão mantidos em sigilo e nenhum resultado será divulgado individualmente."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Esclarecer qual será a participação de Ringo Star Fernandes Guimarães na equipe de pesquisa.

RESPOSTA: O aluno de mestrado Ringo Star Fernandes é responsável pela validação e determinação de tenofovir.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Todas as pendências foram atendidas.

Não há óbices éticos para a realização do presente protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme a Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa inicial.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1265628_E1.pdf	31/01/2019 11:45:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_de_cuidado_com_emendamodificado.docx	31/01/2019 11:42:18	MARIA INÊS DE TOLEDO	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.133.545

Investigador	Projeto_de_cuidado_com_emendamodificado.docx	31/01/2019 11:42:18	MARIA INÊS DE TOLEDO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleparacoletadesanguemodificado.docx	31/01/2019 11:41:00	MARIA INÊS DE TOLEDO	Aceito
Outros	cartarespostaparecer.doc	31/01/2019 11:40:10	MARIA INÊS DE TOLEDO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_dispensa_tcle_coorte.pdf	16/05/2018 09:41:09	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SolDispTCLE.doc	16/05/2018 09:37:41	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Outros	CartaRespPendencias_CEPFS_15052018.pdf	16/05/2018 09:32:23	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Outros	CartaRespPendencias_CEPFS_15052018.doc	16/05/2018 09:30:59	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP_reformulado.docx	16/05/2018 09:28:31	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_17042018.pdf	17/04/2018 18:19:34	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Outros	CartaRespPendencias_CEPFS_17042018.doc	17/04/2018 18:15:48	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_responsabilidade_e_compromisso.docx	13/03/2018 13:50:08	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Outros	cv_5571710480939360.pdf	08/02/2018 17:32:09	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_CEP.pdf	08/02/2018 16:55:18	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_responsabilidade_CEP.pdf	08/02/2018 16:52:32	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_CEP.docx	08/02/2018 16:39:40	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Orçamento	Orcamento_CEP.docx	08/02/2018 16:38:21	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_institucional_e_coparticipante.pdf	05/02/2018 16:12:59	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/02/2018 15:39:15	CELIANE SEVERINO NEIVA	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.133.545

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 06 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador(a))

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Concentração plasmática de tenofovir e alteração da função renal em pessoas vivendo com HIV

Ringo Star Fernandes Guimarães^a, , Ingrid Ferreira Metzger^{b,c} Eloísa Dutra Caldas^b e Maria Inês de Toledo^{b,c}

^aAluno de mestrado do PPGNMT da FM/UnB; Professora do curso de Farmácia da Universidade de Brasília, PPGNMT

Resumo

O fumarato de tenofovir desoproxila, inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, utilizado no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), em associação com a lamivudina e o dolutegravir sódico, compõem a terapia antirretroviral (TARV) de primeira linha no Brasil desde 2017. Alguns autores observaram associação entre a concentração plasmática de tenofovir e diminuição da função renal. Este trabalho teve como objetivo determinar as concentrações plasmáticas de tenofovir e possíveis alterações da função renal em pessoas vivendo com HIV (PVHIV) em uso da TARV de primeira linha no Brasil. Trata-se de estudo observacional transversal com a participação de 89 PVHIV atendidas no Hospital Universitário de Brasília que foram recrutadas entre agosto de 2018 e abril de 2019. Dados clínicos foram obtidos de todos participantes e 24 deles tiveram amostras de sangue coletadas para análise de tenofovir. O método analítico validado para determinação de tenofovir envolve precipitação de proteínas com acetonitrila e quantificação de tenofovir por LC-MS/MS, com limite de quantificação de 5 ng/mL. As PVHIV participantes do estudo tinham entre 19 e 67 anos (mediana de 31,5 anos), eram predominantemente homens, com índice de massa corporal média de $24,6 \pm 3,8$, e média de T CD4+ de 541,2 células/mm³. Os dados de dosagem de creatinina sérica mostraram queda significativa da função renal após o início do tratamento, com depuração de creatinina caindo de 114,3 para 97,4 mL/min/1,73m². As concentrações plasmáticas de tenofovir variaram em função do tempo da última dose, com valores entre 19,7 e 112,7 ng/mL (média de 46,7 ng/mL), e foi possível estabelecer valores de referência para utilização em estudos futuros considerando o esquema de TARV de primeira linha vigente no Brasil.

Palavras-chave

Pessoas vivendo com HIV, HIV, tenofovir, LC-MS/MS, creatinina, nefropatias.

Introdução

Com os avanços da terapia antirretroviral atualmente as suas complicações se tornaram mais importantes do que as consequências da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em si (FINE & GALLANT, 2013; MOCROFT et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendava até recentemente como esquema de terapia antirretroviral (TARV) de primeira linha para adultos a associação de três fármacos: fumarato de tenofovir desoproxila, emtricitabina ou lamivudina e efavirenz (OMS, 2016). Essa recomendação foi alterada em 2019 com a substituição do efavirenz pelo dolutegravir sódico (OMS, 2019), mesma TARV adotado pelo Brasil no ano de 2017 (BRASIL, 2017a).

O fumarato de tenofovir desoproxila, um pró-fármaco do tenofovir em sua forma salina, é um dos inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR) aprovados para o tratamento contínuo de infecções crônicas da hepatite B e do HIV, em combinação com outros antirretrovirais (ARV) (NISHIJIMA et al., 2015).

Estudos em humanos apontaram que a nefrotoxicidade associada ao uso do tenofovir pode ser dependente da concentração do fármaco no plasma sanguíneo, sendo que este é determinado principalmente por três fatores: dose, volume de distribuição e taxa de excreção renal. Alterações ou predisposição em um desses fatores podem aumentar a probabilidade de ocorrência de toxicidade (HALL, 2013). Problemas renais podem ter prevalência em PVHIV em tratamento com a TARV entre 2% a mais de 30%, dependendo da existência de outros fatores de risco (MOCROFT et al., 2016). Rodriguez-Novoa et al. (2010) mostraram que o tenofovir age sobre os rins de maneira dose-dependente, com uma relação direta com as concentrações plasmáticas. Desta forma, o monitoramento plasmático de tenofovir pode ser uma estratégia eficiente para prevenir problemas renais provenientes da TARV,

pois pode identificar usuários que apresentam elevada concentração plasmática do fármaco (RODRIGUEZ-NOVOA et al., 2010).

A quantificação de fármacos e seus metabólitos pode ser feita em vários tipos de amostras biológicas, como plasma, soro, cabelo, urina e saliva (SEIFERT et al., 2018). Essa quantificação desempenha papel importante na avaliação e interpretação da biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética e possíveis efeitos tóxicos. O biomonitoramento de fármacos e seus metabólitos também são de interesse crescente para o campo de monitoramento da adesão, dadas as limitações da adesão autorreferida (GANDHI et al., 2016). Os métodos de análise devem ser validados para que os resultados produzidos sejam confiáveis e possam ser interpretados e reproduzidos em qualquer laboratório, apresentando especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, exatidão e limite de quantificação adequado (MAINARDES & GREMIÃO, 2009).

A concentração plasmática do tenofovir pode aumentar em mais de 30% em combinação com outros medicamentos, entre eles os presentes na TARV, como os inibidores da protease (IP). Uma vez que este regime está amplamente utilizado, acaba se estabelecendo uma dificuldade para separar esses efeitos e descobrir sinergismos (FINE & GALLANT, 2013; BAHETI et al, 2011).

Este estudo teve como objetivo investigar as concentrações plasmáticas de tenofovir e possíveis alterações da função renal em PVHIV em uso da TARV de primeira escolha conforme o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) vigente no Brasil em 2018.

Métodos

Materiais e equipamentos

O padrão de tenofovir monoidratado foi adquirido da Farmacopeia Americana (USP), grau de pureza 100%, lote R044C0. O padrão de aciclovir foi doado pelo Instituto de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ) (Lote 1021, grau de pureza 100%). Reagentes usados: acetonitrila (Sigma-Aldrich®); H₂O MilliQ ultrapura sistema MilliQ gradiente CR, Millipore®; ácido fórmico (Sigma-Aldrich®);

Foram usados: agitador de tubos modelo VX-200 (Labnet®); centrífuga Rotina 380R (Hettich®); balança analítica Shimadzu® AUW220D. A coluna usada de fase reversa (C18) foi da marca Phenomenex Gemini 5 µm, com tamanho 150 x 4,60 mm.

Sistema Shimadzu®, equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e módulo comunicador CBM-S0A acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo 4000QTRAP, AB SCIEX (EUA) com fonte Turbo Ion Spray® e software Analyst®.

Participantes do estudo

Trata-se de estudo observacional transversal e experimental com a participação de 89 PVHIV atendidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB/UNB) em uso da TARV de primeira linha de tratamento no Brasil (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico) por pelo menos sete semanas que foram recrutadas entre agosto de 2018 e abril de 2019, considerando esses critérios foi realizada amostragem de conveniência. Dados clínicos e sociodemográficos foram obtidos de todos participantes, e 24 deles tiveram amostras de sangue coletadas para quantificação de tenofovir.

Coleta e processamento do material biológico

Aproximadamente 3,5 mL de sangue foram coletados dos participantes por punção venosa após assepsia em tubos heparinados. O sangue foi centrifugado em 5870 g por 15 min e o plasma obtido foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

A otimização e validação do método analítico para determinação de tenofovir em plasma foi realizada com um *pool* de plasma de seis voluntários saudáveis. Nesse estudo, esse material foi denominado como plasma branco.

Método analítico em LC-MS/MS

A Fase móvel é constituída de H₂O MilliQ acidificada com ácido fórmico (0,1%) e acetonitrila 3%. As fases foram filtradas a vácuo em membrana de 0,45 µm (Millipore®) e degaseificadas. A eluição usada foi isocrática.

Método de extração foi precipitação de proteínas com acetonitrila, com 300µL do sobrenadante, seco em fluxo de nitrogênio, ressuspendido em água, filtrado em filtro de seringa e 20µL injetado no LC-MS/MS.

O método analítico para determinação de tenofovir foi validado nos seguintes parâmetros: limite de quantificação de 5 ng/mL, seletividade, efeito matriz, linearidade e homocedasticidade da curva, precisão e exatidão.

Análise estatística

A fim de verificar se as pessoas que coletaram amostras para estudo das concentrações de tenofovir eram representativas das pessoas elegíveis, os dados clínicos e sociodemográficos dos grupos foram comparados. Para variáveis dicotômicas foi usado o teste de Fisher e para variáveis categóricas o teste qui-quadrado. Para variáveis numéricas foi usado o teste t para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para não paramétricos. Os valores de creatinina e T CD4+ também foram analisados conforme o tempo de uso de tenofovir (basal, aproximadamente três meses) por meio do teste Teste de Wilcoxon pareado. Nos testes de correlação foi aplicado o teste de Pearson para variáveis paramétricas e o teste de Spearman para variáveis não paramétricas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5® e foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

Resultados

Características sociodemográficas

As PVHIV tinham de 19 a 67 anos (mediana de 31,5 anos), a maioria homens (92,2%). Apenas quatro tinham mais que 50 anos, sendo dois com mais de 60 anos. Cerca de 30% residia na região leste do Distrito Federal e 13,5% residia no entorno no Distrito Federal.

A informação sobre o peso das PVHIV só estava disponível em 61 prontuários, dos quais apenas 53 tinha informação sobre altura. A maioria dos 53 indivíduos apresentou índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 24,9, embora 12 indivíduos tenham apresentado sobrepeso (IMC ≥ 25) e seis eram obesos (IMC > 30). Não houve diferença entre os parâmetros

sociodemográficos entre os indivíduos que coletaram amostras de sangue para determinação de tenofovir e o total dos indivíduos elegíveis.

Dados Clínicos

As pessoas que apresentaram carga viral indetectável antes de iniciar o tratamento já haviam recebido tratamento com outro esquema antirretroviral. Após cerca de três meses de tratamento, mais de 90% das PVHIV apresentou carga viral indetectável. A maioria das PVHIV apresentou valores altos de T CD4+, com média acima do limite da normalidade (500 cópias/mL sangue) antes de iniciar o tratamento. Foi observado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no grupo de pessoas elegíveis e no grupo de pessoas que participaram da coleta de sangue em relação ao início do tratamento, ou seja, em ambos os grupos houve aumento de T CD4+ após três meses de tratamento.

Quanto à função renal, não houve diferença entre a creatinina sérica e depuração de creatinina estimada antes do início do tratamento entre os grupos elegíveis e os que coletaram amostras de sangue para determinação de tenofovir. Antes do início do tratamento, 2,6% das pessoas apresentavam creatinina sérica acima dos valores de referência (1,2 mg/dL). Esse número aumentou para 24% após três meses de tratamento e se manteve com seis meses de tratamento. Esse aumento é estatisticamente significativo em todos os grupos quando comparado a creatinina basal e após três meses de tratamento e após seis meses de tratamento, mas não houve diferença quando comparado os valores de três e seis meses de tratamento (Tabela 1).

Apenas 11% dos participantes elegíveis para o estudo apresentavam depuração de creatinina basal inferior aos valores de referência (homem: 85 mL/min/1,73m² e mulher: 75 mL/min/1,73m²). Esse valor aumentou para 31% dos participantes após três meses de tratamento e se manteve com seis meses. Esse aumento é estatisticamente significativo quando comparada a depuração de creatinina basal e após três meses de tratamento e após seis meses de tratamento no grupo com todos participantes elegíveis para o estudo e no grupo de pessoas que não coletaram sangue, mas não houve diferença quando comparado os valores de três e seis meses de tratamento e quando

comparamos cada grupo no mesmo tempo de tratamento (creatinina basal, 1 e 2) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da média e desvio padrão de creatinina sérica (mg/dL) e depuração de creatinina (ClCr; mL/min/1,73m²) antes do início do tratamento e após aproximadamente três e seis meses de tratamento.

Variáveis	Elegíveis	Coletaram sangue^c	Não coletaram sangue^c
Creatinina basal (n=76)	0,97 ± 0,19*	0,96 ± 0,21*	0,97 ± 0,19*
Creatinina 1 ^a (n=78)	1,13 ± 0,2*	1,11 ± 0,23*	1,13 ± 0,19*
Creatinina 2 ^b (n=37)	1,14 ± 0,2	1,15 ± 0,17	1,13 ± 0,22
Valor de p	<0,0001	0,005	<0,0001
ClCr basal (n=53)	114,3 ± 31,7*	115,9 ± 37,4*	113,5 ± 29,0*
ClCr 1 ^a (n=54)	97,4 ± 27,6*	98,4 ± 38,9*	97,0 ± 21,9*
ClCr 2 ^b (n=27)	95,5 ± 22,0	99,1 ± 30,6	93,4 ± 15,8
Valor de p	0,0006	0,004	0,006

^a106,8 ± 85,9 dias de tratamento, ^b240,9 ± 139,4 de tratamento. ^c Para determinação de tenofovir *O valor de p corresponde ao teste estatístico de Wilcoxon pareado comparando a creatinina basal e a creatinina 1 após início do tratamento.

Quantificação plasmática de tenofovir

As concentrações médias de tenofovir diminuíram em função do intervalo entre a última dose e a coleta de sangue (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de concentração plasmática de tenofovir conforme o tempo de ingestão do medicamento, média ± desvio padrão.

Variáveis	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=8)	Grupo 3 (n=10)
Concentração (ng/mL)	65,0 ± 11,7	51,6 ± 21,8	31,5 ± 22,5
Tempo após ingestão (h)	5,6 ± 1,1	9,0 ± 1,3	20,6 ± 4,2
Tempo de uso (dias)	239 ± 214	128 ± 93	221 ± 172

Grupo 1 = 4 a 7h após a última dose, Grupo 2 = 7,1 a 11h após a última dose, Grupo 3= 15 a 28h após a última dose

As variáveis testadas para correlações com as concentrações plasmáticas de tenofovir entre os grupos e total de pessoas são: idade, IMC, T CD4+, creatinina e depuração de creatinina (ClCr). A correlação entre a concentração plasmática de tenofovir e a depuração de creatinina da coleta 1

(após aproximadamente três meses de tratamento) do grupo 2 foi positiva e significativa ($r=0,79$; $p=0,036$). Também foi observada correlação positiva e significativa ($r=0,85$; $p=0,003$) entre valores de T CD4+ e concentração plasmática de tenofovir no grupo que coletou sangue entre 4 e 7 horas após a última dose. No entanto, correlação negativa entre concentração plasmática e T CD4+ foi observada para o grupo que coletou sangue após 15 a 28 horas após a última dose ($r=-0,54$; $p=0,03$). As demais correlações entre a concentração de tenofovir plasmática considerando os grupos e idade, peso, IMC, CD4 e ClCr antes e após o início do tratamento não foram significativas.

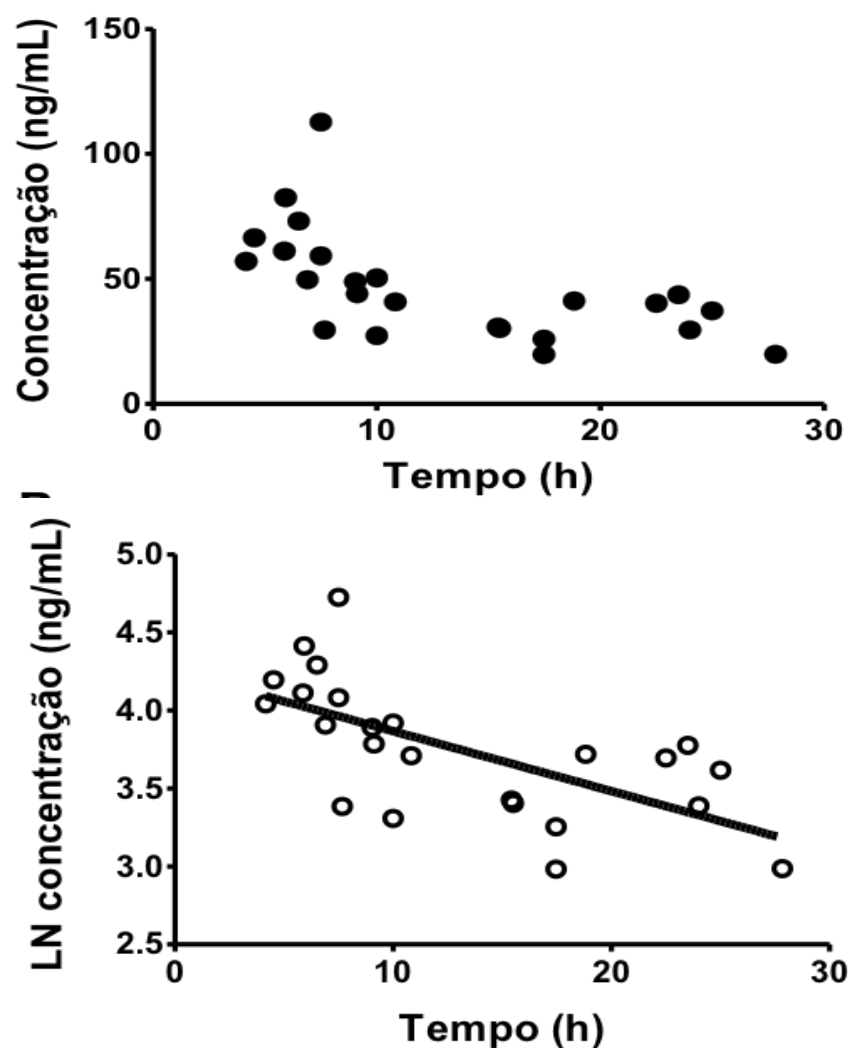


Figura 1. Análise de dispersão das concentrações de tenofovir obtidas dos participantes da coleta de sangue. LN = logaritmo de base natural (e).

Discussão

As principais contribuições deste trabalho foram a validação de método laboratorial para quantificar tenofovir em amostra biológica, os achados de diminuição da função renal após aproximadamente três meses de tratamento e os valores das concentrações plasmáticas de tenofovir em esquema de TARV contendo dolutegravir.

O método para quantificação de tenofovir em plasma humano, usando LC-MS/MS foi validado obedecendo aos critérios da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. O método apresentou precisão, exatidão, seletividade, linearidade, efeito matriz, com LOQ aceitável para o fim proposto, menor que os descritos em outros estudos, sendo aplicável para pessoas com baixa adesão ao tratamento. O método de extração com a precipitação de proteínas com acetonitrila é simples, suficiente para dar seletividade a quantificação no LC-MS/MS. A eluição isocrática diminui o tempo de corrida.

As características sociodemográficas dos usuários de TARV do presente estudo são semelhantes aos dados epidemiológicos já descritos para essa população, que é constituída majoritariamente de homens, adultos jovens e ainda sem sinais de comprometimento do sistema imune ou do peso corporal – características observadas nos casos mais avançados da doença. Esse perfil reflete as mudanças que ocorreram nos últimos anos desde o advento da epidemia de HIV (RYOM, et al., 2013; NISHIJIMA et al., 2015; MOCROFT et al., 2016).

No geral, foi observada resposta adequada à TARV, evidenciado pela diminuição da carga viral em torno de 90 dias de tratamento, chegando a mais de 90% dos participantes com carga viral indetectável. Também foi observado aumento estatisticamente significativo de T CD4+, com exceção do grupo que não participou da coleta de sangue ($p=0,0512$). Esses dados confirmam os ensaios clínicos que justificaram a inclusão de dolutegravir em combinação com fumarato de tenofovir desoproxila e lamivudina como esquema de primeira linha no Brasil, sendo mais eficaz e com menos efeitos adversos (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

Outro dado relevante deste trabalho se refere ao aumento dos níveis de creatinina sérica e consequente diminuição da depuração de creatinina, com

diferença estatística após cerca de 90 dias de tratamento. Deve-se ressaltar que tendo em vista o desenho do estudo podem existir outros fatores fisiológicos, doenças ou sinergismo com outros medicamentos que possam ter contribuído para diminuição da função renal. Gandhi et al. (2016) também observaram que a depuração de creatinina diminuiu com o início do uso de tenofovir. No entanto, levantamento anterior realizado com PVHIV atendidos no HUB-UNB que iniciaram a TARV vigente à época (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina + efavirenz) não observou diminuição significativa da depuração de creatinina no início do tratamento, embora alguns indivíduos tenham apresentado níveis de creatina sérica elevada após aproximadamente seis meses (FAGUNDES, 2016).

Em estudo com 703 PVHIV em Tóquio, observaram que a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) teve diminuição de mais de 10 ml/min/1,73 m² após início do tratamento e que 89% das pessoas tiveram um delta negativo, ou seja, tiveram a TFGe reduzida e destes, 126 (20,2%) apresentaram valores abaixo do limite da normalidade (60 ml/min/1,73 m²) (NISHIJIMA et al., 2015). Dados similares foram encontrados no presente estudo, embora usando depuração de creatinina em vez de filtração glomerular para avaliar a função renal. Cerca de 80% das PVHIV tiveram delta negativo de depuração de creatinina estimada, e 31% apresentaram valores abaixo dos valores de referência.

Em outro estudo semelhante, Wanga et al. (2015) analisaram os dados da depuração de creatinina durante os primeiros seis meses de TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila + emtricitabina e relatam discretas alterações da depuração renal quando comparada ao valor basal. Os valores variaram de -0,5 mL/min com intervalo variando de -10,7 a +10,8, sem diferença significativa. Ao contrário, nosso estudo encontrou como valor médio dessa mudança em menos tempo, cerca de 90 dias, de -16,24 mL/min/1,73m² tendo valores variando de -45,23 a +20,17 sendo estatisticamente significativa essa alteração.

As concentrações plasmáticas de tenofovir variaram em função do tempo da última dose, com valores entre 19,7 e 112,7 ng/mL (média de 46,7 ng/mL), e foi possível estabelecer valores de referência para utilização em

estudos futuros considerando o esquema de TARV de primeira linha vigente no Brasil.

Não foi observada neste estudo relação de concentração plasmática de tenofovir e depuração de creatinina quando considerados todas as PVHIV que coletaram sangue, mas a relação foi significativa para aqueles que coletaram sangue 7,1 a 11 horas após a última dose. No entanto, essa análise não apresentou o resultado esperado, pois foi prejudicada pelo pequeno número de participantes e pela impossibilidade de padronizar o horário de coleta após a ingestão do medicamento.

Gandhi et al. (2016) relataram uma relação entre concentrações mais altas de tenofovir e emtricitabina em amostras de cabelo com maiores declínios da função renal. Esse achado foi corroborado por Havens et al. (2013) que também encontraram uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de tenofovir e a TFG_e ($r = -0,29$; $p = 0,002$).

O trabalho de Poizot-Martin (2013) incluiu pessoas jovens (de 11,3 a 21,1 anos), onde a concentração esperada de tenofovir no plasma seria um pouco maior devido a aumento da dose relativa, e encontrou uma faixa de concentração de tenofovir no vale de 61-135 ng/mL. Estes autores concluíram que pessoas com concentração plasmática de tenofovir no vale maior que 90 ng/mL têm risco maior de ter insuficiência renal, principalmente mulheres e indivíduos mais velhos (POIZOT-MARTIN et al. 2013). No entanto, no nosso estudo encontramos concentrações de $31,5 \pm 22,5$ ng/mL no vale, abaixo desse valor.

Embora vários estudos estejam disponíveis na literatura avaliando a função renal dos participantes quando em uso de TARV contendo fumarato de tenofovir desoproxila, não foram encontrados estudos que avaliassem PVHIV com a TARV atual usada no Brasil (fumarato de tenofovir desoproxila + lamivudina e dolutegravir sódico). Daar et al. (2011) observaram que diferentes TARV apresentam diferentes desfechos para a depuração de creatinina, sendo que a comparação de dois esquemas de TARV constituída de fumarato de tenofovir desoproxila, emtricitabina e atazanavir + ritonavir, e fumarato de tenofovir desoproxila + emtricitabina e efavirenz apresentou diferenças nas concentrações plasmáticas de tenofovir (DAAR et al., 2011).

Nossos resultados de concentrações de tenofovir no plasma apresentaram valores mais baixos quando comparados àqueles encontrados no estudo de farmacocinética de Baheti et al. (2011) envolvendo 55 pessoas (BAHETI et al., 2011). No entanto, nesse trabalho houve uso de lopinavir/ritonavir ou atazanavir/ritonavir, fármacos que podem aumentar as concentrações de tenofovir entre 22 e 32% (GOICOECHEA, 2008).

Tendo em vista os efeitos renais do tenofovir e a possível relação com as concentrações plasmáticas, o uso do método de determinação validado neste estudo poderá contribuir para identificar precocemente indivíduos que podem apresentar efeitos renais mais pronunciados. Outra aplicação do uso da concentração plasmática de fármacos se refere à adesão ao tratamento, já que as ferramentas mais usuais para monitorar a adesão, como autorrelato, contagem de comprimidos e visitas domiciliares, apresentam limitações. Cressey et al. (2017) propôs um protocolo para validação de método de quantificação de tenofovir na pré-dose como alternativa para monitorar a adesão.

Este estudo tem algumas limitações que devem ser mencionadas. O uso de dados secundários retrospectivos, especialmente de parâmetros clínicos causou algumas lacunas, como falta de dados de peso corpóreo e dosagem de creatinina sérica, que limitaram as análises de alteração da creatinina sérica e da depuração de creatinina estimada. Como se trata de uma amostra de conveniência, o número de pessoas que concordaram com a coleta de sangue foi limitada (27% dos participantes), e não foi possível coletar o sangue de todos os participantes no momento ideal para essa análise, o vale da concentração plasmática de tenofovir logo antes da ingestão da próxima dose da TARV. Finalmente, o método foi validado para quantificação de apenas um dos três fármacos que constituem a TARV utilizada como primeira linha no Brasil, tendo em vista que não foi possível obter padrão de dolutegravir sódico.

Apesar de todos os avanços no tratamento da infecção pelo HIV, ainda há muitos desafios a serem enfrentados para que tratamentos cada vez mais efetivos e seguros possam ser disponibilizados em larga escala para a população. Desta forma, os dados epidemiológicos sobre a função renal de PVIH em uso do esquema de primeira linha no Brasil devem ser

cuidadosamente avaliados e o método de quantificação de tenofovir no plasma, desenvolvido neste trabalho, pode contribuir para tornar o uso desses medicamentos mais seguros.

Referências

BAHETI, G.; KISER, J.J.; HAVENS, P.L.; FLETCHER, C.V. Plasma and intracellular population pharmacokinetic analysis of tenofovir in HIV-1-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 55, n. 11, pp. 5294-5299, 2011.

BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Último acesso em: 21/03/2019

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 416pp. (A)

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Nota informativa Nº 007/2017 – DDAHV/SVS/MS, 2017. (B)

CRESSEY, T.R.; SIRIPRAKAISIL, O.; KLINBUAYAEM, V.; QUAME-AMAGLO, J.; KUBIAK, R.W.; SUKRAKANCHANA, P.; THAN-IN-AT, K.; BAETEN J.; SIRIRUNGSI, W.; CRESSEY, R.; DRAIN, P.K. A randomized clinical pharmacokinetic trial of Tenofovir in blood, plasma and urine in adults with perfect, moderate and low PrEP adherence: the TARGET study. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, n. 496, pp. 1-6, 2017.

DAAR, E.S.; TIERNEY, C; FISCHL, M.A.; SAX, P.E.; MOLLAN, K.; BUDHATHOKI, C.; GODFREY, C.; JAHED, N.C.; MYERS, L.; KATZENSTEIN, D.; FARAJALLAH.; A.; ROONEY, J.F.; PAPPA, K.A.; WOODWARD, W.C.; PATTERSON, K.; BOLIVAR, H.; BENSON, C.A.; COLLIER, A.C.; Atazanavir plus ritonavir or efavirenz as part of a 3-drug regimen for initial treatment of HIV-1. *Annals of Internal Medicine*. V. 154, n.7, pp. 445–56, 2011.

FAGUNDES, K.H. Uso de tenofovir e alteração da função renal. Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília – DF, p. 14. 2016.

FINE, D.M.; GALLANT, J.E. Nephrotoxicity of antiretroviral agents: Is the list getting longer? *The journal of infectious diseases*, V. 207, n. 13, p. 1349-51, 2013.

GANDHI, M.; GLIDDEN, D.V.; MAYER, K.; SCHECHTER, M.; BUCHBINDER, S.; GRINSZTEJN, B.; HOSEK, S.; CASAPIA, M.; GUANIRA, J.; BEKKER, L.G.; LOUIE, A.; HORNG, H.; BENET, L.Z.; LIU, A.; GRANT, R.M. Association of age, baseline kidney function, and medication exposure with declines in creatinine clearance on pre-exposure prophylaxis: an observational cohort study. *Lancet HIV* 2016, v. 3, n. 11, p. 521-528, 2016.

GOICOECHEA, M.; LIU, S.; BEST, B.; SUN, S.; JAIN, S.; KEMPER, C.; WITT, M.; DIAMOND, C.; HAUBRICH, R.; LOUIE, S. Greater tenofovir-associated renal function decline with protease inhibitor-based versus nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. V. 197, n. 1, pp. 102-108, 2008.

HALL, A.M. Update on tenofovir toxicity in the kidney. *Pediatric Nephrology*, V. 28, n. 7, p. 1011-1023, jul. 2013.

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.D.; Reversed phase HPLC determination of zidovudine in rat plasma and its pharmacokinetics after a single intranasal dose administration. *Biol Res*, V. 42, n. 3, p. 357-364, 2009.

MOCROFT, A.; LUNDGREN, J.D.; ROSS, M.; FUX, C.A.; REISS, P.; MORANNE, O.; MORLAT, P.; MONFORTE, A.A.; KIRK, O. RYOM, L.; Cumulative and current exposure to potentially nephrotoxic antiretrovirals and development of chronic kidney disease in HIV-positive individuals with a normal baseline estimated glomerular filtration rate: a prospective international cohort study. *The Lancet*, v. 3, n. 1, p. e23-e32, 2016.

NISHIJIMA, T.; HAYASHIDA, T.; KUROSAWA, T.; TANAKA, N.; OKA, S.; GATANAGA, H.; Drug transporter genetic variants are not associated with TDF-related renal dysfunction in patients with HIV-1 infection: A pharmacogenetic study. *PLOS/ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141931>, p. 1-12, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach. 2^a ed, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Update of recommendations on first – and second – line antiretroviral regimens. p. 16 2019.

POIZOT-MARTIN, I.; SOLAS, C.; ALLEMAND, J.; OBRY-ROGUET, V.; PRADEL V.; BREGIGEON, S.; FAUCHER, O.; LACARELLE, B. Renal impairment in patients receiving a tenofovir-cART regimen: impact of tenofovir trough concentration. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. V. 62, n. 4, pp. 375-380, 2013.

RODRIGUEZ-NOVOA, S.; LABARGA, P.; D'AVOLIO, A.; BARREIRO, P.; ALBALATE, M.; VISPO, E.; SOLERA, C.; SICCARDI, M.; BONORA, S.; DI PERRI, G.; SORIANO, V. Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS*. V. 24, n. 7, pp. 1064-1066, 2010.

RYOM, L.; MOCROFT, A.; KIRK, O.; WORM, S.W.; KAMARA, D.A.; REISS, P.; ROSS, M.; FUX, C.A.; MORLAT, P.; MORANNE, O.; SMITH, C. LUNDGREN, J.D.; Association between antiretroviral exposure and renal impairment among HIV-positive person with normal baseline renal function: the D:A:D study. *The journal of infectious diseases*, V. 207, n. 9, p. 1359-69, 2013.

SEIFERT, S.M.; CASTILLO-MANCILLA, J.R.; ERLANDSON, K.; MORROW, M.; GANDHI, M.; KUNCZE, K.; HORNG, H.; ZHENG, J.; BUSHMAN, L.R.; KISER, J.J.; MAWHINNEY, S.; ANDERSON, P.L. Adherence biomarker measurements in older and younger HIV-infected adults receiving tenofovir-based therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes – JAIDS*. V. 77, n. 3, pp. 295-298, 2018.

WANGA, V.; VENUTO, C; MORSE, G.D.; ACOSTA, E.P.; DAAR, E.S.; HAAS, D.W.; LI, C.; SHEPHERD, B.E.; Genome-wide association study of tenofovir pharmacokinetics and creatinine Clearance in AIDS clinical trials group protocol A5202. *Pharmacogenet Genomics*. V. 25, n. 9, pp. 450-461, 2015.