

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**ANDRÉ LUIS TAVARES PINTO**

**Azatioprina no tratamento de pacientes com doença de Crohn córtico-dependente:  
resultados no longo prazo e fatores preditivos de resposta**

**Juiz de Fora**

**2010**

**ANDRÉ LUIS TAVARES PINTO**

**Azatioprina no tratamento de pacientes com doença de Crohn córtico-dependente:  
resultados no longo prazo e fatores preditivos de resposta**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Júlio Maria Fonseca Chebli**

**Juiz de Fora**

**2010**

Pinto, André Luis Tavares.

Azatioprina no tratamento de pacientes com doença de Crohn córtico-dependente: resultados no longo prazo e fatores preditivos de resposta / André Luis Tavares Pinto. – 2010.  
38 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Doença de Crohn. 2. Intestinos – Doenças. 3. Azatioprina. I. Título.

CDU 616.34-002

**ANDRÉ LUIS TAVARES PINTO**

**Azatioprina no tratamento de pacientes com doença de Crohn córtico-dependente:  
resultados no longo prazo e fatores preditivos de resposta**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

Aprovado em 30 de março de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Júlio Maria Fonseca Chebli - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Bertges  
SUPREMA

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Gonçalves da Costa  
SUPREMA

---

Prof. Dr. Herval de Lacerda Bonfante  
SUPREMA

---

Prof. Dr. Fábio Heleno de Lima Pace  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador desta Tese e meu grande amigo Prof. Dr Júlio Maria Fonseca Chebli pela tolerância, compreensão e contínuo aprendizado durante todo o período de confecção deste trabalho, a quem rendo homenagem pelo exemplo de competência, humanismo e caráter, cuja amizade espero sempre desfrutar.

Ao Prof. Pedro Gaburri, pelo fundamental apoio e honrosa participação na elaboração deste estudo assim como pela preciosa amizade.

Aos amigos de trabalho do Ambulatório de Doença Inflamatória Intestinal do Hospital Universitário – UFJF, pelo aprendizado e agradável convivência.

À minha esposa e companheira Cláudia pela paciência e colaboração perenes desde os tempos do mestrado.

Ao meu filho Pedro Henrique , fonte de constante estímulo e perseverança.

À toda minha família , irmãos e irmãs, pelo apoio e estímulo e especialmente à minha mãe , pelas orações e confiança incondicional e ao meu Pai que embora já tendo partido, certamente está alegre pela conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Alexandre Zanini, da Faculdade de Economia e Administração da UFJF, pelas análises estatísticas.

À Direção da Faculdade de Medicina da UFJF e ao Centro de Estudos, por terem autorizado a realização deste trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, sem a colaboração dos quais não seria possível a realização desta pesquisa.

## RESUMO

A doença de Crohn é uma afecção intestinal inflamatória crônica, multissistêmica e de caráter recorrente. Sua etiopatogênese permanece ainda desconhecida, mas considera-se haver um cenário fisiopatológico caracterizado, principalmente, pela inibição da imunidade inata com exacerbação da imunidade adaptativa, com atividade inflamatória mucosa intensificada. Por isso, os corticosteróides constituem a base fundamental do tratamento farmacológico na indução da remissão clínica na doença, graças às suas potentes ações como supressores do processo inflamatório. Entretanto, os proibitivos efeitos colaterais da corticoterapia prolongada associados à alta frequência da cortico-dependência na doença estimulou a busca de alternativas terapêuticas para manutenção da remissão no longo prazo. Nesse contexto, os imunossupressores, particularmente, os análogos da purina, azatioprina (AZA) ou 6-mercaptopurina ocupam um papel central no tratamento de manutenção na doença, com efeitos “poupadores de esteróides”. A utilização desses agentes para manter a remissão clínica na doença é apoiada por evidências de estudos clínicos controlados e randomizados. No entanto, a maioria desses estudos não avaliou especificamente os doentes cortico-dependentes, não sendo claramente conhecida a ação dos análogos da purina nesse grupo de pacientes. Portanto, os objetivos do nosso estudo foram verificar a eficácia no longo prazo, da AZA em uma população exclusivamente portadora de doença de Crohn dependente de esteróides, assim como identificar os possíveis fatores preditivos associados à resposta clínica sustentada. Além disso foi verificada também a segurança dessa terapia, através da análise da incidência de eventos adversos. Para tanto, um total de 106 indivíduos adultos com doença de Crohn cortico-dependente foram prospectivamente incluídos para tratamento com AZA (2-3 mg/Kg/dia), durante o período de acompanhamento de até 10 anos. A proporção de doentes em remissão sustentada livre de esteróides ao final de 12, 24, 36, 48 e 60 meses foi de 0.61, 0.73, 0.72, 0.70 e 0.70 respectivamente. Depois disso, essa taxa anual foi sendo gradualmente reduzida, alcançando um nadir aos 108 meses de acompanhamento. O tempo médio de retirada completa dos esteróides foi de seis meses. Características demográficas, aquelas relacionadas à doença e a dose de AZA não se correlacionaram com remissão sustentada. Apenas a reduzida contagem leucocitária média durante o acompanhamento foi associada com a remissão livre de corticóides (P=0.01). Efeitos adversos graves relacionados à terapia com AZA foram incomuns.

**Palavras-chave:** Doença de Crohn. Doença Inflamatória Intestinal. Azatioprina. Corticosteróides.

## ABSTRACT

The Crohn's disease is a chronic, inflammatory, multisystem bowel disorder with a relapsing course. Her etiology remains unknown but probably there's a scenario characterized by inhibition of innate immunity and exacerbation of the adaptative immunity with exacerbated mucosal inflammatory activity. Then, the corticosteroids have been the mainstay of pharmacologic treatment for inducing clinical remission in the disease. However, the prohibitive side effects of prolonged corticosteroid therapy associated with high frequency of the corticosteroid- dependency in the disease taken to alternative treatments for long- term maintenance of clinical remission. The immunomodulators, especially, the purine analogs, azathioprine(AZA) or 6- mercaptopurine are the major option for this indication, with corticosteroid- sparing proprieties. The use of these agents is supported by randomized, controlled clinical studies. However, these trials have not evaluated the specific issue of the steroid dependence. Thus, our objectives in this study were to asses the efficacy and safety of AZA therapy in patients strictly with steroid-dependent Crohn`s disease and possibly, factors associated with sustained clinical remission. Therefore, 106 adults patients with steroid-dependent Crohn`s disease were prospectively included for treatment with AZA (2-3mg/Kg/day) during the period of follow up as long as 10 years. The proportion of patients remaining in sustained steroid-free remission at 12, 24, 36, 48 and 60 months was 0.61, 0.73, 0.72, 0.70 and 0.70, respectively. Thereafter, the annual rate of weaning from steroids decreased gradually, reaching a nadir of 0.41 at 108 months. Median time to complete steroid withdrawal was 6 months. Demographics, disease-related data and the AZA dose did not correlate with sustained remission. Only the reduced mean leukocyte count during the follow up was associated with remission free steroids (P= 0.01). Serious adverse effects related to AZA therapy were uncommon.

**Key-words:** Crohn`s disease. Inflammatory Bowel Disease. Azathioprine. Corticosteroids.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Considerações Gerais.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Os Análogos de Purina: Azatioprina e 6-Mercaptopurina.....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Farmacologia clínica.....	11
1.2.2	Efeitos adversos.....	11
1.2.3	Eficácia clínica na doença de Crohn cortico-dependente.....	13
<b>1.3</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Seleção de pacientes.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Regimes de tratamento.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Desenho do estudo e seguimento.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Medidas de evolução.....</b>	<b>20</b>
3.4.1	Medidas de eficácia primária.....	20
3.4.2	Medidas de eficácia secundária.....	21
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>27</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

A doença de Crohn é um distúrbio inflamatório crônico multisistêmico e recidivante que pode atingir todo o trato gastrointestinal com predileção, entretanto, para o intestino delgado e o cólon, além do potencial para cursar com manifestações extra-intestinais.

A doença é uma condição relativamente nova, tendo sua descrição original atribuída a Crohn, Ginsburg e Oppenheimer em 1932 (Crohn BB, Ginsburg L, Oppenheimer GD, 1932).

Embora muitas teorias impliquem uma combinação de fatores genéticos, ambientais e imunorregulatórios, a causa desse distúrbio permanece desconhecida.

Classicamente, a epidemiologia demonstra que a doença não é uma condição comum, sendo mais freqüente em regiões como a Escandinávia, Grã-Bretanha e América do Norte. Por outro lado, continentes como a África e a América Latina são tradicionalmente associados a baixas taxas de incidência e prevalência para essa afecção. Apesar dessa conhecida variação geográfica na ocorrência da doença, um corpo significativo de dados epidemiológicos têm identificado uma tendência real de aumento no diagnóstico e na incidência mundial da doença de Crohn nas últimas décadas, inclusive no Brasil (Munckholm P, Langholz E, Nielsen OH, 1992, Gaburri PD et al., 1998)

A razão para essa tendência de aumento é desconhecida, mas especula-se que fatores ambientais possam ser parcialmente responsáveis uma vez que fatores genéticos não se alteram tão rapidamente (Sandler RS, Loftus EV Jr, 2004).

Nas regiões de maior freqüência da doença como a América do Norte, por exemplo, a prevalência varia de 26 a 198 casos / 100.000 pessoas, com taxas de incidência também variando de 3 a 14.6 casos / 100.000 pessoas ano (Loftus EV Jr, Sandborn WJ, 2003).

Enquanto distúrbio crônico inflamatório e idiopático, a doença de Crohn requer tratamento tanto para controle da fase ativa da doença como também para mantê-la em remissão, sendo estes, objetivos primários da terapia médica na doença. Esses objetivos nem sempre alcançados na prática clínica visam finalmente a melhora da qualidade de vida dos pacientes, sendo essa de fato, uma das principais metas terapêuticas a ser buscada (Lichtenstein GR et al., 2004).

Como objetivos secundários estão a prevenção de complicações (por exemplo, do câncer), a indução e manutenção de remissão endoscópica (cura da mucosa) e histológica e a redução da toxicidade associada ao tratamento (Lichtenstein GR et al, 2004).

Durante as recidivas da doença, intervenções terapêuticas clínicas ou cirúrgicas são frequentemente necessárias para re-estabelecer a remissão. Idealmente, estratégias a serem utilizadas devem visar induzir pronta resposta e manter os pacientes em remissão prolongada, ao mesmo tempo em que se minimiza a dependência de esteróides e a toxicidade relacionada à terapia (Panaccione et al., 2008). Estas metas certamente se traduzirão na redução de complicações, de hospitalizações e da necessidade de cirurgias ocasionadas pela doença, bem como poderão prevenir a mortalidade relacionada à doença de Crohn e promover a melhora na qualidade de vida dos indivíduos afetados. Muitos pacientes com doença de Crohn podem não receber terapia eficaz e sua doença permanecer ativa, levando à inflamação descontrolada e, potencialmente, ao desenvolvimento de complicações decorrentes da doença subjacente ou do uso contínuo de esteróides.

Nesse contexto, com relação à indução da remissão clínica da doença, apesar da imprecisão a respeito de sua etiologia, admite-se haver um cenário fisiopatológico de resposta imune exacerbada com atividade inflamatória mucosa intensificada, mediada por células inflamatórias e por uma série de citocinas pró-inflamatórias. Por isso, na indução da remissão, os corticosteróides têm sido a base fundamental do tratamento farmacológico na doença, pelo menos nas formas moderadas e graves, por suas conhecidas ações, através de múltiplos mecanismos, como potentes supressores do processo inflamatório (Yang YX, Lichtenstein GR, 2002).

Dois estudos controlados tradicionais demonstraram claramente a efetividade dos corticosteróides na indução da remissão clínica na doença de Crohn, com taxas de resposta alcançando entre 80 a 90% dos casos (Summers R et al., 1979 e Malchow et al., 1984). Em pacientes com doença de Crohn requerendo tratamento com corticosteróides, as evoluções imediatas são geralmente favoráveis, mas a perspectiva dentro dos próximos 12 meses é desalentadora (Panaccioni et al., 2008).

Entretanto, como já comentado, a doença de Crohn não é uma doença aguda, sendo obrigatório o planejamento terapêutico de longo prazo, com vistas à manutenção da remissão clínica, tendo sido ela uma vez alcançada. Em busca desse objetivo primário já foi verificada a ineficácia dos corticóides em manter a doença em remissão clínica, uma vez que apresentam taxas de recidiva semelhantes ao placebo, além da ocorrência comum dos conhecidos e proibitivos efeitos colaterais da corticoterapia prolongada (Malchow et al., 1984).

Dois elegantes estudos de Munkholm e colegas (1994) e Faubion e colaboradores (2001) avaliaram também os resultados da corticoterapia na doença de Crohn. Ambos, com achados semelhantes, demonstraram que os corticosteróides são úteis na resposta imediata da

doença, com melhora clínica dentro de 30 dias na maior parte dos pacientes (80-90%). Entretanto, uma parcela desses pacientes que inicialmente respondeu a esses agentes, não manteve a remissão clínica no longo prazo, tornando-se cortico-refratários e necessitando de tratamento cirúrgico ao final de um ano de terapia (20%) ou se tornaram cortico-dependentes (28 a 36% dos pacientes). Estes últimos são arbitrariamente definidos como aqueles indivíduos que inicialmente respondem à terapia com corticóides, mas que recidivam durante a regressão gradual da dose do medicamento ou pouco tempo após a sua suspensão (dentro de 6 meses), necessitando da reintrodução da droga para controle clínico da doença (Hanauer SB, 2003).

Torna-se claro, portanto, que menos de 50% dos pacientes com doença de Crohn tratados com corticosteróides, ao final de 12 meses de tratamento, encontra-se em remissão clínica livre de corticóides e sem cirurgia.

Hanauer e colaboradores (2003) em publicação relativamente recente, comentaram que a cortico-dependência é de fato, a regra da terapia com corticosteróide na doença de Crohn. Portanto, tendo em vista a alta frequência da cortico-dependência na doença, bem como dos efeitos indesejáveis da terapia esteróide prolongada, alternativas terapêuticas têm sido avaliadas a fim de se manter a remissão clínica da doença e, concomitantemente, reduzir a toxicidade associada à corticoterapia.

Diversas modalidades terapêuticas podem ser empregadas em pacientes com doença de Crohn dependente de esteróides visando esse efeito “poupador de esteróides”, ao mesmo tempo em que se mantém a remissão da doença. A escolha da abordagem terapêutica permanece tipicamente entre a cirurgia ou a otimização da terapia clínica, a qual tradicionalmente envolve a introdução de um dos imunomoduladores (Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, 2003). Dentre eles, as terapias mais frequentemente utilizadas têm sido os análogos de purina, a 6-mercaptopurina e a azatioprina, que formam a base da terapia imunossupressora na doença de Crohn (Su C, Lichtenstein GR, 2004). Esta classe de fármacos tem sido usada para tratar as doenças inflamatórias intestinais por mais de 30 anos. O uso destas drogas para manter a remissão em pacientes dependentes de esteróides com doença de Crohn, é inequivocamente apoiado por evidências oriundas de estudos clínicos controlados randomizados (Willoughby JM, Beckett J, Kumar PJ, 1971 e Candy S, Wright J, Gerber M, 1995)

## **1.2 Os Análogos da Purina: Azatioprina e 6- Mercaptopurina**

### **1.2.1 Farmacologia clínica**

A Azatioprina (AZA) é uma pró-droga que após absorção oral, é convertida em 6-mercaptopurina por uma clivagem não enzimática dependente de glutatona e outros compostos presentes na mucosa intestinal, fígado, eritrócitos e outros tecidos, com um fator de conversão de 50% entre a primeira e a segunda. A 6-mercaptopurina é, então, metabolizada pela tiopurinametiltransferase (TPMT) ao metabólito inativo 6-metilmercaptopurina ou pela xantina oxidase no metabólito inativo ácido 6-tioúrico. Finalmente, a 6-mercaptopurina, competitivamente, pode ser metabolizada por processo enzimático seqüencial nos seus potenciais metabólitos ativos, os nucleotídeos 6-tioguanina que, provavelmente, mediam as ações biológicas imunossupressoras dessas drogas (Mahadevan U, Sandborn WJ, 2004).

Os mecanismos pelos quais essas ações se dão são desconhecidos, entretanto, evidências sugerem que esses efeitos imunossupressores estejam principalmente, relacionados à inibição da síntese dos nucleotídeos de purina, com inibição da síntese de DNA e, conseqüente, redução dos níveis de divisão e proliferação celular (Tiede J et al. 2002).

Essas ações levariam à inibição da reação linfocitária mista, redução da citotoxicidade dependente de células naturais Killer e redução de linfócitos plasmáticos na lâmina própria dos tecidos afetados, com queda da contagem linfocitária periférica. Mais recentemente, relatou-se que os análogos da purina induzem também a apoptose de células "T", mecanismo esse que pode estar prejudicado na doença de Crohn, contribuindo para a patogênese da inflamação na doença (Huibregtse IL, van Lent AU, van Deventer SJH, 2007).

### **1.2.2 Efeitos Adversos**

Os efeitos colaterais dos análogos da purina podem ser classificados como reações alérgicas ou idiossincrásicas, que tendem a ocorrer nas primeiras semanas de tratamento ou como reações não alérgicas, usualmente dose-dependentes, geralmente ocorrendo mais tardiamente no curso do tratamento (Mahadevan U, Sandborn WJ, 2004).

As reações idiossincrásicas ou alérgicas incluem febre, rash cutâneo, astenia, mialgias, artralgia, náuseas e vômitos, pancreatite aguda, diarreia e alguns casos de hepatite e dor abdominal não relacionada à pancreatite.

As reações não alérgicas à azatioprina ou 6-mercaptopurina são representadas por reações de mielotoxicidade (leucopenia, anemia, trombocitopenia), hepatotoxicidade, risco de infecções oportunistas, e um risco aumentado, embora controverso, de malignidade, especialmente, linfoma (Mahadevan U, Sandborn WJ, 2004).

A incidência geral das reações adversas nos pacientes tratados varia entre 4 a 30% nos trabalhos publicados (Markowitz JF, 2003 e Dubinsky MC, 2004), sendo necessária às vezes, a suspensão do tratamento em função desses efeitos.

Em relação às reações alérgicas, destacam-se os eventos de náuseas e pancreatite aguda. A troca do tipo de análogo da purina pode ser tentada em alguns pacientes com história de náuseas e vômitos durante o uso da azatioprina, através da substituição da mesma pela 6-mercaptopurina, por ser esta última, droga livre do anel imidazólico, ao qual se imputa a razão para tal reação. Entretanto, isso naturalmente, não é recomendável para pacientes com pancreatite aguda (McGovern DP et al., 2002).

Entre as reações não alérgicas, as mais frequentes são os eventos hematológicos, principalmente a leucopenia, que pode ocorrer em qualquer período do tratamento com as tiopurinas. A frequência desse efeito relatada na literatura varia entre 2 a 15% dos pacientes, variação essa que se deve provavelmente ao nível de leucometria utilizado como definição de leucopenia e à dose prescrita de tiopurina nos diferentes estudos (Connell WR et al., 1993).

A trombocitopenia pode ocorrer conjuntamente com a leucopenia ou pode se manifestar como incidente isolado. Se a contagem plaquetária não melhora com a redução e/ou suspensão da terapia, deve ser avaliada a possibilidade de um efeito hepatotóxico das tiopurinas (Dubinsky MC, 2004).

A prevalência média da hepatotoxicidade nos pacientes com doença inflamatória intestinal tratados com azatioprina ou 6-mercaptopurina é classicamente baixa, em torno de 3% (Gisbert JP, Gonzalez-Lama Y, Mate J, 2007). Não obstante, a frequência desses eventos varia significativamente de acordo com o número de pacientes avaliados e com o tempo de acompanhamento.

Essas reações podem ser agrupadas em três síndromes principais: hipersensibilidade, reação colestática idiossincrásica e lesão celular endotelial, que pode determinar complicações graves, tais como hiperplasia nodular regenerativa, doença veno-oclusiva e peliose hepática. Parcela dos pacientes pode apresentar discretas elevações dos testes hepáticos (aminotransferases), provavelmente sem implicações clínicas, os quais geralmente retornam aos valores normais durante o monitoramento, sem necessidade de ajuste da dose do imunomodulador em muitos casos (Gisbert JP, Gonzalez-Lama Y, Mate J, 2007).

Outro efeito muito comentado é o potencial para malignidade nos indivíduos tratados com tiopurinas, porém a reação permanece como tópico polêmico. O risco deriva da observação de que essas medicações foram implicadas no surgimento de casos de linfoma não-Hodgkin entre pacientes com artrite reumatóide e transplantados de órgãos sólidos (Lewis JD, Schwartz JS, Lichtenstein GR, 2000).

Connel e colaboradores (1994) verificaram diferença significativa somente para carcinoma colorretal numa população de 755 pacientes com doença inflamatória intestinal tratados com azatioprina, durante um período de 30 anos de observação, sendo esses casos naturalmente relacionados à doença de base.

Present e colaboradores (1989) relataram uma taxa de 3% de linfoma nesses pacientes, cuja incidência não difere significativamente do esperado para a população geral. Entretanto, um estudo recente realizado na Clínica Mayo sugeriu que o tratamento dos pacientes com doença intestinal inflamatória com tiopurinas pode estar associado a um risco levemente aumentado de linfoma associado ao vírus Epstein-Barr (Daiharsh GA, Loftus Jr EV, Sandborn WJ, 2002).

Lewis e colaboradores (2000) por outro lado, analisando o impacto da terapia com azatioprina na sobrevida e na qualidade de vida de pacientes com doença de Crohn, relataram que os benefícios dessa terapia superam os riscos, incluindo o de transformação neoplásica.

Cumulativamente, portanto, os dados sugerem que o risco de malignidade, quando presente, é muito pequeno e o benefício geral da terapia com azatioprina /6-MP é maior que esse eventual risco, particularmente em pacientes jovens.

Finalmente, como todo tratamento imunossupressor, a utilização das tiopurinas acarreta risco aumentado de complicações infecciosas, às vezes, potencialmente fatais, sobretudo nos pacientes leucopênicos. A frequência relatada dessas complicações é de aproximadamente 7%, sendo as infecções do trato respiratório superior e inferior, inclusive pneumonias, as mais frequentemente observadas (7% e 3 %, respectivamente). Há relatos também de casos de Herpes Zoster (2%) e citomegalovirose, inclusive fatais (Warman IJ et al., 2003).

### **1.2.3 Eficácia Clínica na Doença de Crohn Cortico-Dependente**

A terapia baseada em imunossupressores pode reduzir ou eliminar o uso de corticosteróides em pacientes com doença de Crohn córtico-dependente. Os análogos da

purina \_ 6-mercaptopurina e azatioprina \_ permanecem como o fundamento da terapia imunomoduladora para esta indicação (Markowitz et al., 2000; Plevy, 2002; Su, Lichtenstein, 2004). Qualquer um destes agentes pode ser utilizado, sendo a escolha baseada, geralmente, na experiência prévia do clínico. As doses de AZA mais efetivas parecem estar entre 2 a 3 mg/Kg/dia, embora não haja comparações diretas entre níveis de doses diferentes. Da mesma forma, não existem estudos comparando a utilização de doses progressivamente escalonadas (baseadas no peso corporal) com a prescrição da dose de manutenção ideal desde o início do tratamento (Pannacione, 2008).

O primeiro estudo que convincentemente demonstrou a eficácia das tiopurinas na doença de Crohn foi publicado em 1980 por Present e colaboradores.

Vários outros estudos incluíram dados a respeito da habilidade dos análogos da purina em permitir descontinuar ou reduzir as doses de esteróides, medida pela capacidade de seguir um programa de redução da droga ou pelo alcance de uma dose de esteróide menor que 10mg/dia sem recidiva (Present et al., 1970; Willoughby et al., 1971; Klein et al., 1974; Ewe et al., 1993; Candy et al., 1995). Estes estudos demonstraram que tanto a AZA quanto a 6-mercaptopurina foram úteis na manutenção da remissão clínica durante o programa de redução ou descontinuação da prednisona. A meta-análise de Pearson e colaboradores (1995) confirmou a efetividade dos análogos da purina para a manutenção da remissão clínica, bem como seu efeito poupador de corticosteróides. Uma revisão da Cochrane (Sandborn et al., 2003) referendou a indicação destas drogas para este último fim, com *odds ratio* de 3,86 (95% IC,1,4–6,96).

No mais amplo estudo retrospectivo envolvendo experiência clínica de 30 anos com AZA, realizado em Oxford, as taxas de remissão global foram de 45% em 272 pacientes com doença de Crohn de comportamento clínico diverso (Fraser, Orchard, Jewell, 2002). Fatores favorecendo a remissão foram a contagem leucocitária menor (abaixo de 5.000 células mm<sup>3</sup>) (p=0.0001), o volume globular médio maior (p=0.0001), a idade mais avançada (p=0.05) e a localização colônica da doença (p=0.03). Estes autores observaram que a eficácia da azatioprina foi razoavelmente bem sustentada durante pelo menos cinco anos.

Entretanto, esses estudos avaliaram em sua maioria, concomitantes ações dos corticóides e dos análogos da purina, não abordando especificamente, os pacientes cortico-dependentes. Portanto, a proporção de pacientes cortico-dependentes tratados com AZA ou 6-mercaptopurina que é capaz de manter a remissão durante a regressão gradual e retirada dos corticóides, não é bem conhecida, sendo que os estudos que avaliaram o tema específico da cortico-dependência são escassos, de pequeno tamanho e com variáveis medidas de eficácia.



Além disso, diferenças demográficas e geneticamente determinadas podem limitar as generalizações dessas conclusões, visto que a maior parte desses trabalhos avaliou populações da América do Norte e da Europa. Nesse contexto, devemos ressaltar que o conhecido polimorfismo genético do perfil metabólico das tiopurinas, no que diz respeito aos níveis de atividade sérica da TPMT pode, ainda mais, interferir nos resultados do tratamento imunossupressor com esses fármacos em populações, eventualmente, geneticamente distintas.

Recentemente, um estudo prospectivo aberto de nosso grupo (Chebli et al., 2007) avaliando a AZA no tratamento de 69 pacientes com doença de Crohn esteróide-dependente, verificou-se que remissão sem esteróides foi alcançada em 68% a 81% dos pacientes durante os primeiros 48 meses de tratamento. Interessante que a contagem leucocitária média no final do primeiro ano da terapia com AZA foi significativamente menor nos pacientes que alcançaram remissão sustentada sem esteróides comparada com aqueles não respondedores à droga ( $5197 \pm 1250$  vs.  $8340 \pm 1310$  leucócitos, respectivamente;  $P < 0.01$ ). Neste estudo, AZA foi relativamente bem tolerada e a incidência de efeitos adversos importantes foi pequena.

### **1.3 Justificativa**

Em uma publicação prévia de nosso grupo, Chebli et al. (2007) demonstraram a segurança e a boa eficácia do tratamento com AZA em um número relativamente limitado de pacientes com doença de Crohn córtico-dependente.

Considerando a escassa disponibilidade de experimentos prospectivos com esta droga envolvendo pacientes com doença de Crohn dependente de esteróides, aliado ao fato dos estudos atualmente publicados serem limitados pelo pequeno tamanho da população avaliada ou pelo seguimento no curto ou médio prazo; e tendo em vista nossa considerável experiência clínica adquirida em um centro terciário especializado em doenças inflamatórias intestinais, nós nos propusemos a realizar o estudo em questão.

Este estudo prospectivo longitudinal aberto foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança da AZA em manter a remissão clínica sem esteróides em pacientes com doença de Crohn estritamente definida como cortico-dependente, bem como os possíveis fatores associados à resposta clínica sustentada. Esta pesquisa é uma extensão do estudo previamente publicado pelo nosso grupo (Chebli et al., 2007) e desenvolvido em nosso Centro, com um período de acompanhamento mais longo e envolvendo quase o dobro de pacientes.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar em pacientes com doença de Crohn cortico-dependente:

a) A eficácia e segurança, no longo prazo, do tratamento com AZA para a manutenção da remissão sem corticóides.

b) Os possíveis fatores associados com a resposta clínica sustentada à AZA.

c) Tempo para a retirada completa dos esteróides.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de pacientes

Durante o período de Janeiro de 1997 a Outubro de 2006 pacientes adultos com doença de Crohn cortico-dependente e acompanhados no ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF) foram admitidos para o estudo após a assinatura de um termo de consentimento livre e informado. O protocolo do estudo, por sua vez, foi definido em concordância com a declaração de Helsinki e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da mesma instituição.

O diagnóstico de doença de Crohn foi baseado nos critérios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos geralmente aceitos para a doença (Nikolaus, Schreiber, 2007).

Pacientes foram arbitrariamente descritos como portadores de doença de Crohn cortico-dependente, se eles apresentaram uma resposta clínica parcial ou completa ao tratamento com prednisona (40-60mg/dia) e mantiveram a doença em remissão clínica com o uso contínuo de esteróides, necessitando de uma dose diária mínima de 15mg/prednisona ou quando tivessem tido recidiva clínica dos sintomas durante pelo menos duas tentativas de se descontinuar a terapia com corticosteróide dentro de 6 meses antes de sua inclusão no estudo.

Os critérios de inclusão no estudo foram: idade  $\geq 18$  anos; Índice de atividade da doença de Crohn (IADC)  $< 150$  pontos; cortico-dependência; necessidade de 15-60mg/dia/prednisona para o controle dos sintomas, e aqueles pacientes com dose estável de prednisona  $\geq 15$ mg/dia por no mínimo 4 semanas antes da entrada no estudo (exceto durante período de regressão gradual da terapia). Os pacientes poderiam estar em uso de tratamento concomitante com ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) em dose estável por no mínimo 4 semanas antes da inclusão e em tratamento com antibióticos direcionados à doença inflamatória, com dose estável por no mínimo 2 semanas prévias à inclusão no estudo.

Os critérios de exclusão foram: idade  $< 18$  anos ou  $> 65$  anos; evidência radiológica de doença fibroestenótica no período de 6 meses antes da entrada no estudo; estenose intestinal sintomática; síndrome de intestino curto; presença de estomas; complicações sépticas; ou uma doença grave necessitando de terapia com corticosteróide parenteral, hospitalização ou cirurgia.

Os pacientes foram também excluídos se possuíssem história atual ou progressiva de malignidade, displasia colônica, infecção ativa e/ou grave nos últimos três meses ou comorbidades clinicamente significativas. Foram excluídas as pacientes grávidas ou lactantes; e em caso de mulheres férteis foi necessário o uso de métodos efetivos de contracepção.

Finalmente, pacientes que previamente receberam terapia anti-TNF alfa, ou com outros imunossuppressores foram também excluídos.

### 3.2 Regimes de tratamento

Pacientes que preencheram os critérios de inclusão e que concordaram em participar do estudo tiveram adicionado à terapia esteróide, AZA na dose inicial de 50mg/dia pelos primeiros 15 dias, após a coleta de um leucograma basal.

A terapia com AZA foi iniciada objetivando-se uma dose alvo de 2-3mg/Kg/dia. Após 15 dias de tratamento, se a contagem leucocitária permaneceu acima de 10.000/mm<sup>3</sup>, a dose inicial foi aumentada em 25mg a cada duas semanas, com monitorização pelo leucograma até a contagem leucocitária cair abaixo de 10.000/mm<sup>3</sup> ou a dose-alvo ser atingida. No paciente incomum, com contagem leucocitária basal <10.000/mm<sup>3</sup> a dose inicial de AZA foi mantida em média por oito semanas quando em geral iniciávamos a retirada do corticóide, juntamente com o aumento gradual da dose de AZA de acordo com o esquema já descrito, sob monitorização hematológica até a dose alvo de 2-3mg/Kg/dia ou o leucograma global de aproximadamente 4.000/mm<sup>3</sup>.

A dose pode ser ajustada para prevenir leucopenia grave ou trombocitopenia. Além disso, a AZA foi suspensa ou a dose foi reduzida em caso de febre, doença concomitante ou toxicidade relacionada à droga. Geralmente, após oito semanas como já comentado, iniciávamos o esquema de regressão gradual do corticóide até a retirada completa se a condição clínica do paciente permanecesse estável. Tentativas sistemáticas para retirada da corticoterapia foram feitas em todos os pacientes de acordo com um esquema pré-definido. Pacientes com dose de prednisona maior que 40mg/dia iniciavam redução de sua dose em 5 mg a cada semana, enquanto pacientes recebendo uma dose entre 40 e 20 mg/dia, reduziram sua dose em 2,5 mg a cada semana; e aqueles recebendo prednisona em dose inferior a 20 mg/dia, reduziram em 2,5 mg a cada duas a três semanas. Em caso de recidiva dos sintomas durante a redução da dose da terapia corticosteróide, a mesma foi aumentada para 0,8 a 1,0 mg/k/dia. Após esse aumento da dose, a prednisona foi novamente reduzida seguindo o mesmo esquema inicial ou em taxa ligeiramente mais lenta. Pacientes que também necessitaram de reintrodução precoce da prednisona após a sua retirada, seguiram o mesmo esquema de conduta. Uma vez tendo sido a prednisona descontinuada, a AZA foi mantida

indefinidamente. Tratamento sintomático com antidiarreicos, antiespasmódicos e antissecretores foi permitido.

Discussão detalhada das vantagens e desvantagens do uso contínuo de AZA foi feita com cada paciente a cada seis meses durante o curso do tratamento.

Falha terapêutica foi definida como: necessidade de terapia de resgate (tratamento com infliximabe ou cirúrgico); piora dos sintomas necessitando aumento na dose basal de prednisona após seis meses de AZA (tempo 0 dose); impossibilidade de redução de pelo menos 50% da dose inicial de corticóide após seis meses de terapia com AZA; ou o desenvolvimento de quaisquer efeitos adversos idiossincrásicos demandando a suspensão da AZA. Em qualquer ocasião, durante o acompanhamento, pacientes que progrediram de resposta sustentada para resposta parcial ou não resposta foram considerados com falha à terapia com AZA a partir daquele momento.

Resposta parcial à AZA foi definida quando foi possível a redução de pelo menos 50% da dose basal de prednisona, assim como a manutenção de uma dose diária menor que 15mg de prednisona e remissão clínica com CDAI abaixo de 150 pontos.

A avaliação da dose de corticóide foi feita em intervalos anuais após o início do tratamento com AZA.

### **3.3 Desenho do estudo e seguimento**

O desenvolvimento do estudo se caracterizou por ensaio prospectivo, observacional, aberto conduzido por um período de 10 anos, incluindo uma entrevista inicial duas semanas antes do início da terapia com AZA. Na admissão, foram avaliados critérios de elegibilidade, dados demográficos, características relacionadas à doença e as medicações em uso.

Também amostras de sangue foram coletadas para avaliação hematológica e bioquímica. Os dados demográficos e clínicos relevantes registrados foram: sexo, idade, raça (branca e não branca), duração da doença, história cirúrgica e tabagismo. A localização da doença foi definida de acordo com a classificação de Vienna (Gasche, Scholmerich, Brynskov, 2000). A atividade da doença foi avaliada pelo escore IADC na entrada do estudo (Best et al., 1976) e a cada três meses por todo o período do estudo. Contagem inferior a 150 pontos indicou remissão clínica e pontuação mais elevada indicou doença ativa.

Pacientes foram orientados a usar um diário para registrar os escores de IADC, dose de AZA e prednisona e outras medicações concomitantes, presença de sintomas e ocorrência de possíveis efeitos adversos previamente a cada consulta clínica. Pacientes foram avaliados

cl clinicamente a cada mes, durante os primeiros seis meses e após, a cada dois a três meses, de acordo com o julgamento clínico. Todos os pacientes se submeteram a monitorização laboratorial de rotina para verificação de potencial toxicidade durante o tratamento. Foram realizados hemograma, dosagem de amilase e transaminases no momento da inclusão, com monitorização subsequente de leucograma a cada duas semanas nas primeiras oito semanas e, depois a cada dois meses por toda a duração do tratamento, e as transaminases foram avaliadas a cada três meses, indefinidamente. A determinação da amilase sérica foi feita durante os primeiros três meses ou se dor abdominal significativa ocorresse durante o curso do tratamento com AZA. Além disso, os pacientes foram alertados a retornarem prontamente para avaliação clínica em caso de febre ou qualquer outro sinal de infecção. Leucopenia foi definida como leucograma global menor que 3.000 células/mm<sup>3</sup> e leucopenia grave menor que 2.000 células/mm<sup>3</sup> e linfocitopenia quando a contagem linfocitária foi menor que 800 células/mm<sup>3</sup>. Trombocitopenia foi definida como contagem plaquetária menor que 100.000 células/mm<sup>3</sup>.

Os pacientes foram retirados do estudo por quaisquer das seguintes razões: não aderência, solicitação do paciente, infecção grave, níveis séricos de transaminases persistentemente anormais (acima de três vezes o valor de referência), leucopenia ou trombocitopenia persistentes (>12semanas), exacerbação significativa dos sintomas requerendo terapia de resgate, reações de hipersensibilidade ou cirurgia iminente.

### **3.4 Medidas de evolução**

#### **3.4.1 Medidas de eficácia primária**

O parâmetro primário para a determinação da eficácia da droga no estudo foi a proporção de pacientes cortico-dependentes com resposta sustentada à terapia com AZA ao final de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 meses após o início da medicação. Resposta sustentada foi definida como a retirada completa da terapia com prednisona e manutenção dos valores do IADC menores que 150 pontos, sem necessidade de reintrodução de esteróide durante pelo menos um ano subsequente.

### **3.4.2 Medidas de eficácia secundária**

Os principais parâmetros de eficácia secundária foram o tempo necessário para a retirada completa dos esteróides e a avaliação da segurança do uso de AZA, através da análise da incidência de eventos adversos e das alterações nos testes laboratoriais de rotina realizados durante o acompanhamento.

As medidas de eficácia foram avaliadas em todos os pacientes que receberam pelo menos uma dose de AZA (população intenção de tratar).

### **3.5 Análise estatística**

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa SPSS14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). As variáveis quantitativas foram expressas como mediana e variações ou como média e desvio padrão, quando normalmente distribuídas. Comparações entre os grupos de resposta sustentada e falha terapêutica, assim como as relações possíveis entre a resposta completa à AZA com dados demográficos, relacionados à doença ou laboratoriais basais, foram analisadas utilizando o teste T de Student, teste do Qui-quadrado e o teste não paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriados. Essas análises foram feitas baseadas na população com intenção de tratar (isto é, todos os pacientes que receberam pelo menos uma dose de AZA e se submeteram à avaliação basal).

As contagens leucocitárias e linfocitárias foram calculadas em intervalos anuais de acompanhamento. Probabilidades de remissão sustentada foram avaliadas pela análise da Tabela de Vida. Todas as variáveis significativas determinadas pela análise univariada foram consideradas em um modelo de regressão logística incondicional para determinar se relações independentes ocorreram entre as variáveis. A influência de variáveis concomitantes com o tempo de remissão livre de esteróides foi determinada pelo modelo proporcional de casualidade de Cox. Para comparação, o nível de significância estatística foi o valor de  $p < 0,05$ .

## 4 CONCLUSÕES

Em pacientes com doença de Crohn cortico-dependente:

1. A terapia com AZA constitui uma expressiva opção no tratamento destes pacientes por períodos de até 10 anos, com razoável eficácia clínica e bom perfil de segurança.
2. Os pacientes que desenvolvem uma redução persistente na contagem leucocitária (particularmente o leucograma global  $<6.000$  células/mm<sup>3</sup>) durante a terapia com AZA são os que mais provavelmente irão obter remissão sustentada livre de esteróides.
3. A retirada dos esteróides ocorreu em média seis meses após o início da terapia com AZA.



## REFERÊNCIAS

- BEST, W.R.; BECKTEL, J.M., SINGLETON, J.W., et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. **Gastroenterology**. v. 70, 1976, p. 439-444.
- CANDY, S.; WRIGHT, J.; GERBER, M., et al. A controlled double-blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. **Gut**. v.37, 1995, p.674-678.
- CHEBLI, J.M.; GABURRI, P.D.; SOUZA, A.F.M., et al. Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study. **J Gastroenterol Hepatol**. v. 22, 2007, p.268-274.
- CONNEL, W.R.; KAMM, M.A.; RITCHIE, J.K., et al. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. **Gut**. v.34, 1993, p. 1081 – 1085 .
- CONNELL, W.R.; KAMM, M.A.; DICKSON, M., et al. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. **Lancet**. v.343, 1994, p. 1249 – 1252.
- CROHN, B.B.; GINSBURG, L.; OPPENHEIMER, G.D. Regional ileitis : a pathologic and clinical entity. **JAMA**. v.99, 1932, p. 1323 – 1329.
- DAYHARSH, G.A.; LOFTUS, E.V. Jr.; SANDBORN, W.J., et al. Epstein – Barr virus positive lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. **Gastroenterology**. v.122, 2002, p. 72 – 77.
- DUBINSKY, M.C. Azathioprine, 6-Mercaptopurine in Inflammatory Bowel Disease : Pharmacology, Efficacy and Safety. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v. 2, 2004, p. 731 – 743.
- EWE, K.; PRESS, A.G.; SINGE, C.C., et al. Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. **Gastroenterology**. v.105, 1993, p. 367-372.
- FAUBION, W.A.; LOFTUS, E.V.; HANSEN, W.S., et al. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population – based study. **Gastroenterology**. v.121, 2001, p. 255 – 60.
- FRASER, A.G.; ORCHARD, T.R.; JEWELL, D.P. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. **Gut**. v. 50, 2002, p. 485–9.
- GABURRI, P.D.; CHEBLI, J.M.F.; CASTRO, L.E. de., et al. Epidemiology, clinical features and clinical course of Crohn's disease : a study of cases. **Arq. Gastroenterol**. v.35, 1998, p.240 – 6 .

GASCHE, C.; SCHOLMERICH, J.; BRYNSKOV, J., et al. A simple classification of Crohn's disease. Report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. **Inflamm Bowel Dis**; v.6, 2000, p. 8-15.

GISBERT, J.P.; GONZALEZ – Lane Y; MATE, J. Thiopurine – induced Liver injury in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. **Am J Gastroenterol** . v.102, 2007, p. 1518-1527.

HANAUER, S.B. Considerations in the management of steroid – dependent Crohn's disease. **Gastroenterology** . v.125, 2003, p. 906 – 10.

HUIBREGTSE, I.L.; VAN LART, A.V.; VAN DIVERTER, S.J.H. Immunopathogenesis of IBD : Insufficient supressor function in the Gut ? **Gut** , v.56, 2007, p. 584 – 592.

KLEIN, M.; BINDER, H.J.; MITCHELL, M., et al. Treatment of Crohn's disease with azathioprine: a controlled evaluation. **Gastroenterology**. v. 66, 1974, p.916-922.

LEWIS, J.D.; SCHWARTZ, J.S.; LICHTENSTEIN, G.R. Azathiopurine for maintenance of Remission in Crohn's Disease : Benefits outweigh the Risk of Lymphoma . **Gastroenterology**. v.118, 2000, p. 1018 – 1024.

LICHTENSTEIN, G.R.; CUFFARI, C.; KANE, S.V., et al. Maintaining Remissions Across the Lifespan. **Inflamm Bowel Dis**. v. 11(suppl.2), 2004, p.S11-S21.

LOFTUS, Jr. E.V.; SANDBORN, W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease . **Gastroenterol. Clin. N. Am.** v. 31, 2003, p. 1 -20.

MAHADEVAN, U.; SANDBORN, W.J. Clinical pharmacology of inflammatory bowel disease therapy . In: KIRSNER. **Inflammatory Bowel Diseases**. 6 ed. Philadelphia: SAUNDERS, 2004, p.484-502.

MALCHOW, H.; EWE, K.; BRANDES, J.W., et al. European Cooperative Crohn's Disease Study ( ECCDS ) : Results of Drug Treatment . **Gastroenterology**, v. 86, 1984, p.249-266.

MARKOWITZ, J.F. Therapeutic Efficacy and Safety of 6 – Mercaptopurine and Azathioprine in Patients with Crohn's Disease . **Reviews in Gastroenterological Disorders** . v. 3 suppl 1, 2003, p. S23 – 29 .

MARKOWITZ, J.; GRANCHER, K.; KOHN, N., et al. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. **Gastroenterology**. v.119, 2000, p. 895-902.

McGOVERN, D.P.; TRAVIS, S.P.; DULEY, J., et al. Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole –related and is independent of TPMT activity. **Gastroenterology**. v. 122, 2002, p. 838-839.

MUNKHOLM, P.; LANGHOLGZ, E.; NIELSEN, O.H., et al. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the country of Copenhagen , 1962 -87 : a sixfold increase in incidence Scand . **J. Gastroenterol**, . v. 27, 1992, p.609-614.

MUNKHOLM, P.; LANGHOLZ E.; DAVIDSEN M., et al. Frequency of glucocorticoid – resistance and dependency in Crohn`s disease . **Gut** . v. 35, 1994, p.360-362.

NIKOLAUS, S.; SCHREIBER, S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** . v. 133, 2007, p.1670-1689.

PANACCIONE, R.; RUTGERTS, P.; SANDBORN, W.J., et al. Treatment algorithm to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with Inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol and Ther**. v.28, 2008, p.674-688.

PEARSON, D.C.; MAY, G.R.; FICK, G.H., et al. Azathioprine and 6 – mercaptopurine in Crohn`s disease . A meta – analysis. **An Intern Med**. v.123, 1995, p. 132 – 142.

PLEVY, S.E. Corticosteroid –sparing treatments in patients with Crohn`s disease . **Am J Gastroenterol**. v.97, 2002, p. 1607-1617.

PRESENT, D.H.; KORELITZ, B.I. ; WISCH, N., et al . Treatment of Crohn`s disease with 6 – Mercaptopurine . A long term randomized , double –blind study . **N Engl J Med**. v.302, 1980, p. 981 – 987.

PRESENT, D.H; MELTZER, S.J; KRUMHOLZ, M.P., et al. 6 – Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short and long –term toxicity. **An Intern Med**. v.111, 1989, p. 641 – 649.

SANDBORN, W.; SUTHERLAND, L.; PEARSON, D., et al. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn`s disease ( Cochrane review ) Update Software Oxford , **The Cochrane Library** , 2003

SANDLER, R.S.; LOFTUS, Jr. E.V. Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases. In: KIRSNER. **Inflammatory Bowel Diseases**. 6 ed. Philadelphia: SAUNDERS, 2004, p.245-262.

SU, C.; LICHTENSTEIN, G.R. Treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine and 6-mercaptopurine. **Gastroenterol Clin N Am** . v.33, 2004, p.209-234.

SUMMERS, R.; LUITZ, D.; SESSIONS, Jr., et al. National Cooperative Crohn`s Disease Study : results of drug treatment . **Gastroenterology**. v. 77, 1979, p. 847 – 869.

TIEDE, J.; WIRTA, S.; STRAND, S., et al. CD 28 – Induced RAC – GTP activity is the molecular Target of azathioprine in primary human CD4 T lymphocytes : A mechanism for azathioprine mediation in IBD base don the induction of T cell apoptosis. **Gastroenterology**. v.122, 2002, p. A14.

WARMAN, I.J.; KORELITZ, B.I.; FLEISSHER, M.R., et al . Cumulative experience with short and long term toxicity to 6- Mercaptopurine in the treatment of Crohn`s Disease and Ulcerative Colitis . **J Clin Gastroenterol**.v.37 (3), 2003, p. 220 – 225.

WILLOUGHBY, J.M.; BECKETT, J.; KUMAR, P.J., et al. Controlled trial of azathioprine in Crohn`s disease. **Lancet**. v. 2, 1971, p.944-947.

YANG, Y.X.; LICHTENSTEIN, G.R. Corticosteroids in Crohn`s Disease. **Am. J. Gastroenterol.** v. 97, 2002, p. 803 – 823.

## **APÊNDICE**

Received: 2008.04.09  
 Accepted: 2008.07.31  
 Published: 2009.05.01

## Azathioprine therapy in steroid-dependent patients with Crohn disease: Results of a 10-year longitudinal follow-up study

PI

### Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

André Luiz Tavares Pinto<sup>A,B,D,E</sup>, Liliana Andrade Chebli<sup>A,B,D</sup>, Mario Sergio Ribeiro<sup>B,C</sup>, Fábio Heleno de Lima Pace<sup>B,C</sup>, Jussara Paixão Moraes<sup>B,C</sup>, Flávio José do Amaral Júnior<sup>B</sup>, Pedro Duarte Gaburri<sup>A,B,C</sup>, Aécio Flávio Meirelles de Souza<sup>B,D</sup>, Julio Maria Fonseca Chebli<sup>A,B,D,E,G</sup>

Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Inflammatory Bowel Diseases Center, University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora, University of Juiz de Fora School of Medicine, Minas Gerais, Brazil

**Source of support:** Dr. Julio Maria Fonseca Chebli is the recipient of a grant from CNPq, Brazil; this study was partly supported by a Clinical Research Grant from the FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil

### Summary

#### Background:

Studies assessing the efficacy of azathioprine in steroid-dependent patients with Crohn's disease are scarce. The aim of this study was to assess the long-term efficacy and safety of azathioprine, and factors associated with sustained response, in steroid-dependent patients with Crohn's disease.

#### Material/Methods:

In this prospective, observational study, adult steroid-dependent subjects with Crohn's disease receiving azathioprine therapy were assessed over a 10-year period. Azathioprine dosage was adjusted according to clinical response and occurrence of adverse events. Median treatment duration was 83 months. Steroid therapy was tapered according to protocol.

#### Results:

A total of 106 subjects were included. The proportion of subjects remaining in sustained steroid-free remission at 12, 24, 36, 48, and 60 months was 0.61, 0.73, 0.72, 0.70, and 0.70, respectively. Thereafter, the rate of weaning from steroids decreased gradually, reaching a nadir of 0.41 at 108 months. Median time to complete steroid withdrawal was 6 months. Demographic, azathioprine dose, and disease-related data did not correlate with remission. By multivariate analysis, only decreased mean leukocyte count during follow-up was independently associated with steroid-free remission ( $P=0.001$ ). Subjects who achieved an annual mean leukocyte count  $<6000/\text{mm}^3$  were more likely to sustain steroid-free remission ( $P=0.01$ ). Serious adverse events in response to azathioprine were uncommon.

#### Conclusions:

Azathioprine therapy offers a meaningful option in the management of steroid-dependent Crohn's disease for up to 10 years. A persistent decrease in leukocyte count may provide a surrogate marker of sustained steroid-free response.

#### key words:

Crohn disease • inflammatory bowel disease • corticosteroids • azathioprine

#### Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?ICID=869625>

#### Word count:

3602

#### Tables:

2

#### Figures:

3

#### References:

43

#### Author's address:

Julio Maria Fonseca Chebli, Rua Maria José Leal, 296, Juiz de Fora, MG, Brazil-CEP 36036-247, e-mail: chebli@lobo.com

## BACKGROUND

Crohn's disease (CD) is a chronic, multisystem, relapsing disorder of unknown etiology with a worldwide distribution [1,2]. Although there is no curative therapy, long-term clinical treatment of CD is targeted toward inducing and maintaining disease remission, preventing or reducing disease-related complications, and improving patient quality of life [3]. Corticosteroids remain one of the most effective therapies of medical treatment for moderate to severe exacerbation of CD [4]. Corticosteroid treatment allows for rapid control of disease activity, and symptoms are relieved in many patients with CD [5,6]. However, a substantial proportion (28% to 36%) of patients that respond initially to corticosteroids is unable to support withdrawal without relapse [7-9]. In addition, corticosteroid use is associated with a range of well-known adverse effects, especially after long-term treatment [4,6]. Hence, corticosteroid dependence in patients with CD is an important clinical problem, and maintenance of steroid-free remission is a major issue for these patients [10].

Azathioprine (AZA) is considered a first-line immunosuppressant in patients with CD who become dependent on glucocorticoids [10-12]. Several studies with thiopurine analogs have demonstrated a steroid-sparing effect of this drug class when used concomitantly with corticosteroids [13-17]. A Cochrane review confirmed the ability of these immunomodulators to aid in steroid discontinuation, with an odds ratio of 3.86 (95% confidence interval, 2.14-6.96) [18]. Once data are derived from countries other than North American or Europe, demographic and disease-related factors, as well as genetically determined pharmacodynamic differences, may limit the generalization of these findings. In addition, predictive factors of sustained steroid-free response in patients with CD and taking AZA are unknown. Moreover, long-term clinical trials assessing the specific issue of corticosteroid-dependence are scarce and small in size, and outcome measures used in different studies vary considerably [19,20].

Therefore, we aimed to assess the long-term efficacy and safety of AZA in maintaining steroid-free remission and factors associated with sustained clinical response in strictly defined steroid-dependent CD. This is an extension of a previously published study [21] developed at our center, with a longer follow-up period and nearly twice the number of patients. In addition, new findings related to this issue are described.

## MATERIAL AND METHODS

### Patient recruitment

During the period January 1997 to October 2006, adult outpatients of the Inflammatory Bowel Disease (IBD) Center at the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora (HU-UFJF), Brazil, presenting with corticosteroid-dependent CD were enrolled consecutively. Diagnosis of CD was based on generally accepted clinical, radiologic, endoscopic, and histologic criteria [22]. Patients were arbitrarily described as steroid-dependent if they previously showed a partial or complete clinical response to treatment with prednisone (40-60 mg/day) and had symptoms controlled only

by continued use of systemic steroids, requiring a daily oral dose of at least 15 mg prednisone, or had already undergone 2 failed attempts to discontinue steroids within 6 months before their inclusion in this study. Key inclusion criteria were: age >18 years; Crohn's Disease Activity Index (CDAI) score <150 points; requirement of 15 mg/day to 60 mg/day prednisone to control symptoms; steroid-dependency; and stable prednisone dosage (except during attempted tapering) for at least 4 weeks before entering this study. Patients were eligible if they had been receiving concomitant treatment with 5-aminosalicylic acid (5-ASA), as long as the dosage had been stable for 4 weeks before inclusion, and if they were taking IBD-directed antibiotics with a stable dose for the 2 weeks prior to study inclusion. Exclusion criteria were: age <18 years or >65 years; radiologic clues of fixed, non-inflammatory bowel obstruction within 6 months prior to study entry; symptomatic stenosis or strictures; short-bowel syndrome; presence of stomas or septic complications; or a severe disease requiring parenteral corticosteroid therapy, hospitalization, or immediate surgery. Patients were also considered ineligible if they had a current or previous history of neoplasm or colonic dysplasia, active infection, serious infections in the preceding 3 months, or clinically significant comorbidities. Pregnant or breast-feeding women were excluded, and those of child-bearing potential were required to use effective means of contraception. In addition, patients who previously received anti-tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  therapy, thalidomide, or other immunosuppressive drug were excluded.

The study protocol was defined in accordance with the declaration of Helsinki and was approved by the Human Use Investigation Committee of our institution. All patients signed a freely informed consent form before being admitted to this study.

### Treatment regimens

Patients who fulfilled the inclusion criteria and who agreed to enter the trial had AZA added to steroid therapy at an initial dosage of 50 mg/day for the first 15 days, after a baseline complete blood count (CBC). Tailoring of AZA therapy was performed during treatment, aiming for a target dose of 2 mg/kg to 3 mg/kg per day. After 2 weeks of AZA therapy, if the white blood cell (WBC) count remained above 10 000/mm<sup>3</sup>, the dose was increased by 25 mg at 2-week intervals, with CBC monitoring, until the WBC count was below 10,000/mm<sup>3</sup> or the target dose based on body weight was achieved. The dosage could be adjusted to prevent severe leukopenia or thrombocytopenia. In addition, AZA was withheld or the dose was reduced in the event of fever, concurrent disease or drug-related toxicity. Generally, after 8 weeks, we gradually attempted to taper steroid use until withdrawal if the patient's condition remained stable. Systematic attempts were made to withdraw corticosteroids from all patients according to a predefined schedule. Patients receiving a prednisone dose above 40 mg/day were allowed to decrease their dose by 5 mg every week, whereas patients receiving a dose between 40 mg/day and 20 mg/day decreased by 2.5 mg every week; those receiving a prednisone dose below 20 mg/day decreased by 2.5 mg every 2 to 3 weeks. In the event of relapse of symptoms in the course of steroid tapering, the dose of prednisone was increased to 0.8 mg/kg to 1.0 mg/kg per day. After this

dose increase, prednisone was again tapered at the same or a slightly lower rate. Patients who also required early re-introduction of prednisone after withdrawal followed the same schedule of management. Once prednisone was discontinued, AZA was to be maintained at the same dose indefinitely. Symptomatic treatment with antidiarrheal, spasmolytic, or over-the-counter antacid agents was allowed. A detailed discussion of the advantages and disadvantages of continued AZA use was held with each patient every 6 months during the course of treatment.

Treatment failure was defined as: the need for additional salvage therapy, such as the use of infliximab or surgery; worsening of symptoms, requiring an increase in baseline prednisone dose after 6 months of AZA [the time 0 dose]; impossibility of reducing the initial prednisone dose to at least 50% of the initial dose after 6 months of AZA therapy; or the development of any idiosyncratic adverse effects demanding withdrawal of AZA. At any occasion during follow-up, patients who had progressed from sustained response to partial or no response were considered to have experienced failure to AZA treatment.

Partial response to AZA was defined as  $\geq 50\%$  reduction of the prednisone dose, as well as a daily dose of prednisone  $< 15$  mg and maintenance of CDAI score at  $< 150$  points. Assessment of steroid dosage was performed at 12-month intervals after initiation of AZA treatment.

#### Study design and follow-up

The trial design was an open-label, prospective study. The study was conducted over a 10-year period, including an entry screening visit 2 weeks prior to the initiation of therapy. At entry, eligibility criteria were assessed, demographic and disease-related characteristics and current medications were recorded, and blood samples were obtained for hematologic assessment and clinical chemistry. The following relevant demographic data were evaluated: sex, age, and race (white vs nonwhite). Disease duration, surgical history, and cigarette use were also recorded. The location of the disease was described according to the Vienna classification [23]. Disease activity was evaluated according to the CDAI score [24] at baseline and every 3 months throughout the study period. Scores  $< 150$  indicated remission, whereas higher scores indicated active disease.

Patients were instructed on the use of diary cards to record CDAI scores, AZA intake, intake of prednisone and other concomitant medications, presence of symptoms, and occurrence of adverse effects prior to each clinical visit. Patients were evaluated clinically every month for the first 6 months and then at 2- to 3-month intervals, according to clinical judgment. All patients underwent routine laboratory monitoring for potential toxicity during treatment. Baseline CBC, serum amylase, and liver function tests were assessed, and to monitor myelo- and/or hepatotoxicity in response to AZA, subsequent testing consisted of CBC every 2 weeks for 8 weeks and then every 1 to 2 months for the duration of therapy, and serum transaminases was assessed every 3 months indefinitely. Determination of serum amylase was performed during the first 3 months or if significant abdominal pain developed over the course of AZA therapy. In addition, patients were advised to report promptly if a sore throat or

any other signs of infection occurred. Leukopenia was defined as a WBC count  $< 3.0 \times 10^9/L$ , severe leukopenia as a WBC count  $< 2.0 \times 10^9/L$ , and lymphopenia as a lymphocyte count of  $< 800$  cells/ $mm^3$ ; thrombocytopenia was considered at a platelet count  $< 100\,000 \times 10^6/L$ . Patients were withdrawn from the study for any of the following reasons: nonadherence; patient's request; development of severe infection; persistently abnormal serum transaminase level; persistent ( $> 12$  weeks) leukopenia or thrombocytopenia; marked exacerbation of symptoms requiring rescue therapy; reactions of hypersensitivity to AZA; their own decision to not continue to participate; or imminent surgery.

#### Outcome measures

##### Primary outcome measure

The primary outcome parameter for determination of drug efficacy was the proportion of corticosteroid-dependent patients with sustained response to AZA therapy at the end of 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, and 120 months after initiation of medication. Sustained response was defined as complete steroid discontinuation and maintenance of CDAI score  $< 150$  points without new steroid requirements during at least 1 whole year of follow-up.

##### Secondary outcome measures

The main secondary efficacy endpoints included the time to complete steroid withdrawal and evaluation of safety of AZA use. Safety was evaluated in terms of incidence of adverse events and changes in routine laboratory test results. Outcome measures were assessed for all patients who took at least 1 dose of AZA (intention-to-treat population).

##### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Quantitative variables were expressed as median and range or as mean  $\pm$  standard deviation (SD) when normally distributed. Comparisons between the sustained response and failure groups, as well as possible relations between sustained response to AZA and demographic, disease-related, or baseline laboratory data, were analyzed using the parametric Student *t* test, chi-squared test, and nonparametric Mann-Whitney test, as appropriate. These analyses were performed based on the intention-to-treat population (ie, all patients who received at least 1 dose of AZA and underwent baseline evaluation). Mean leukocyte and lymphocyte counts were calculated at 12-month intervals during follow-up. Probabilities of sustained remission were evaluated by life table analysis. All variables determined by univariate analysis were considered in an unconditional logistic regression model to determine if independent relations occurred between variables. The influence of concomitant variables on time to steroid-free remission was determined by Cox proportional hazards model. For comparison, the level of statistical significance was set at  $P < .05$ , and all reported *P* values are 2-tailed.

## RESULTS

Of 437 adult patients with CD regularly followed-up in the IBD Center at HU-UFJF, 314 (72%) did not satisfy the eligi-





**Table 1.** Demographic and disease-related characteristics and baseline leukocyte count in corticosteroid-dependent patients with Crohn's disease, according to azathioprine response.

Characteristics	Sustained response* (n=51)	Partial response (n=18)	Failure (n=37)	P Value**
Sex (F/M) n (%)	24/27 (47/53)	8/10 (44.4/55.6)	20/17 (54/46)	.35
Age (yr)***	38.1±12	36.7±12.8	38.2±9.2	.97
Smoker n (%)	10 (19.6)	3 (16.6)	8 (21.6)	.81
Disease location (L1/L2/L3) (n)	19/14/18	6/7/5	14/10/13	.91
Disease duration (mo)***	81.8±70.2	73.4±48.3	75.4±73.8	.70
Previous abdominal surgery n (%)	21 (41.2)	4 (22.2)	16 (43.3)	.85
Previous median duration of steroid therapy (mo)	11.3 (5–14) <sup>#</sup>	7.8 (6–12)	10.3 (5–12).97	
Initial median daily dose of prednisone (mg)	29 (15–50) <sup>#</sup>	25 (15–40)	27.5 (15–60)	.88
Concomitant therapy with 5-ASA n (%)	15 (29.4)	7 (38.8)	9 (24.3)	.69
Median dose of AZA (mg/kg/day)	2.6 (1.5–3.2) <sup>#</sup>	2.4 (1.8–2.9)	2.9 (1.9–3.3)	.95
Leukocyte count (mm <sup>3</sup> )***	10 280±3 320	9 770±4 430	10 190±3 210	.88
CDAI score†	102±38	92±27	98±42	.89

5-ASA – 5-aminosalicylic acid; AZA – azathioprine; CDAI – Crohn's Disease Activity Index.

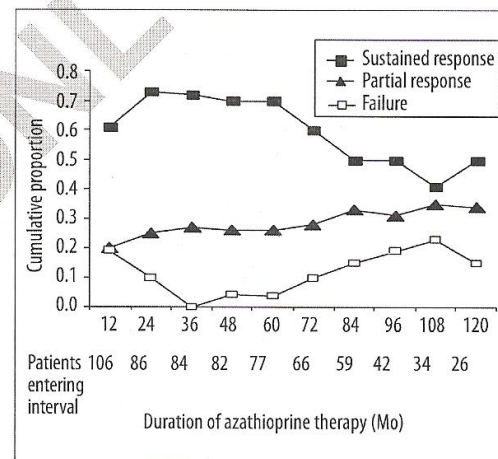
\* Patients remaining in sustained response up to the first clinical relapse; \*\* P value compares sustained response versus failure groups; \*\*\* Mean ± standard deviation; <sup>#</sup> Range.

bility criteria, and 17 declined to participate (a loss of 14% of those originally eligible). The most common reasons for refusal were lack of interest (6); 4 had no explanation for non-participation, and 7 refused to participate after reading the informed consent. Thus, 106 patients (86% of eligible subjects) were prospectively included. The group consisted of 45 (42%) men and 61 (58%) women (mean age 36.3 years; range 18–65 years). Pretrial demographic and clinical characteristics of the patients are listed in Table 1. The duration of AZA therapy was 83 months (range 12–120 months). No patient was lost to follow-up while on AZA therapy.

#### Clinical efficacy

The proportion of patients remaining in sustained steroid-free remission at 12, 24, 36, 48, and 60 months was 0.61, 0.73, 0.72, 0.70, and 0.70, respectively (Figure 1). Thereafter, the rate of remission without steroids decreased modestly, reaching a nadir (0.41) at 108 months. In 65 patients with sustained response to AZA during the first 12 months, median time until complete steroid withdrawal was 6 months (range 3–10 months). Withdrawal was achieved during the first 8 months in all except 2 cases.

The 2 groups – sustained response and failure – were comparable according to demographics, dose of AZA, and disease-related characteristics (Table 1). Likewise, there was no statistically significant difference in baseline mean WBC count between these 2 groups. By multiple logistic regression, the single variable that was independently related to sustained steroid-free remission was mean leukocyte count during follow-up period ( $P=.001$ ). Subjects who achieved an annual mean leukocyte count of less than 6 000 cells/mm<sup>3</sup>

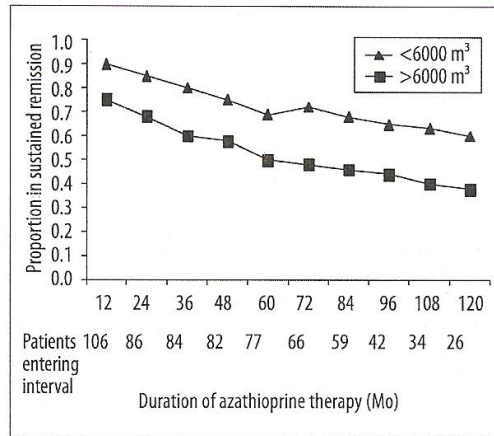


**Figure 1.** Cumulative proportion of steroid-dependent patients with Crohn disease with sustained or partial response or failure to azathioprine.

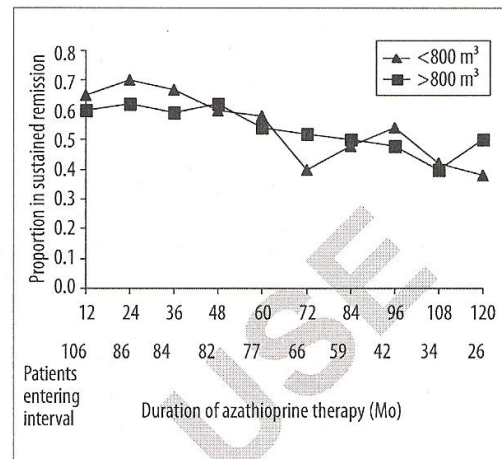
were more likely to sustain steroid-free remission ( $P=.01$ ) (Figure 2). Conversely, there was no difference in annual remission rate between subjects who developed lymphopenia compared with those without lymphopenia (Figure 3).

#### Safety

Table 2 shows the frequency of adverse events observed during the study and the approaches taken. Adverse effects



**Figure 2.** Analysis of the proportion of steroid-dependent patients with Crohn disease maintaining sustained remission without steroids during azathioprine therapy in relation to annual mean white blood cell (WBC) count over the course of treatment. Patients that achieved an annual mean WBC count of less than 6 000  $\text{mm}^3$  were more likely to stay in steroid-free remission ( $P=.01$ ).



**Figure 3.** Analysis of the proportion of steroid-dependent patients with Crohn disease maintaining sustained remission without steroids during azathioprine therapy in relation to the occurrence of lymphopenia during treatment. There was no difference in relapse rates between patients with and without lymphopenia.

**Table 2.** Short- and long-term adverse effect of azathioprine during treatment of corticosteroid-dependent patients with Crohn disease (n=106).

Adverse effect	Patients, n (%)**	Median duration of azathioprine therapy (Mo)	Range Approach (Mo)
Leukopenia	26 (24.5)	39	2–102 Dose reduction
Lymphopenia	22 (20.7)	40	5–96 None
<b>Nausea or vomiting</b>			
Mild	17 (16)	32	1–90 Dose reduction
Severe	7 (6.6)	0.5	0.5–1.5 Withdrawal
Rurti*	23 (21.7)	19	5–69 None
Mild elevations of liver enzymes	6 (5.7)	28	7–66 None
Thrombocytopenia	5 (4.7)	31	18–64 Dose reduction
Abdominal pain	4 (3.8)	1.2	1–3 Withdrawal
Acute pancreatitis	4 (3.8)	1.4	0.5–3.0 Withdrawal
Herpes zoster	3 (2.8)	22	19–23 None
Fever and muscle ache	3 (2.8)	0.5	– Withdrawal
Toxic hepatitis	2 (1.8)	3	– Withdrawal
Pneumonia	2 (1.8)	62	44–80 Withdrawal
Veno-occlusive hepatic disease	1 (0.9)	48	– Withdrawal
Overall adverse events	46 (43.4)	–	–

\* Rurti: recurrent upper respiratory tract infections; \*\* Some patients experienced more than 1 adverse effect in response to azathioprine.

were reported in 46 subjects (43.4%), of which 18 (17% of the total group) had to discontinue AZA therapy. Reasons for withdrawal from treatment owing to adverse events pre-

dominantly included severe nausea or vomiting, acute pancreatitis, or abdominal pain. These hypersensitivity adverse reactions were observed within 2 to 3 months of treatment,

and all symptoms and signs resolved within an average period of 5 days after AZA withdrawal. Leukopenia was the most frequent adverse effect, recorded in 26 patients (25%), of which 5 (5% of the total group) presented with severe leukopenia. A mean of 3 episodes of leukopenia per patient (range 1–13) was noted during follow-up. Leukopenia was observed at a median of 39 months (range 2–102 months) after initiation of AZA treatment. The median duration of leukopenia was 8 weeks (range 4–12 weeks). Azathioprine-induced myelotoxicity was managed successfully either by briefly lowering the dose ( $n=26$ ) or temporarily discontinuing the medication ( $n=5$ ). In the majority of patients, the same dosages or a modestly lower dose were later tolerated without substantial depression in WBC or platelet counts during follow-up. Two patients (2%) developed pneumonia while taking AZA, despite normal leukocyte count. Both were successfully managed with oral antibiotics along with temporary discontinuation of AZA therapy. None of the patients experienced severe infections, and no neoplasms were observed. No patients died as a result of AZA-related toxicity.

## DISCUSSION

Results of this study highlight the magnitude of long-term beneficial effects of AZA for the maintenance of sustained steroid-free remission in Brazilian patients with strictly steroid-dependent CD. The results show that sustained remission without steroids was attained in a considerable proportion of the cases, especially during the first 5 years of AZA treatment. However, life table analysis demonstrated that AZA was efficient for up to 10 years of therapy. Thus, it is possible to speculate that the effectiveness of AZA may remain indefinitely, at least for some patients with CD.

Previous studies demonstrated a steroid-sparing effect of AZA [25–27]. Nevertheless, none of these studies made specific mention of strictly steroid-dependent patients. One recent European trial [20], assessing a smaller group of steroid-dependent CD subjects on AZA, reported a steroid-free remission rate of 59% at 12 months. This finding is similar to the rate of remission without steroids of 61% in our present study at the end of a 1-year period of AZA treatment.

No demographic variables or clinical characteristics at baseline were predictive of a sustained response to AZA at the end of treatment. Although leukopenia is not required for clinical efficacy of AZA in patients with active IBD [28–30], in our present study, patients who developed a persistent decrease in mean leukocyte count (ie,  $<6\,000$  cells/mm<sup>3</sup>) during the follow-up period were more likely to sustain steroid-free remission. It is valuable to highlight that both groups, those who showed a considerable decrease in annual mean leukocyte count and those who did not, were well matched demographically. Furthermore, CD-related characteristics as well as AZA dosage were similar in both groups. Although we cannot exclude the possibility that the higher WBC count observed in nonresponders to AZA was in response to persistent inflammatory bowel activity, it is possible that, at least for a subgroup of AZA responders, a substantial decrease in absolute leukocyte count might be a surrogate indicator of intraerythrocyte thioguanine nucleotide level. It is well known that the development of leukopenia during AZA treatment occurs in response to a high intracellular 6-thioguanine level [20]. In addition, some studies have re-

ported that patients with IBD who respond to thiopurine therapy have higher concentrations of 6-thioguanine than those who were nonresponsive [31,32]. This theory must be confirmed in future studies because an association between 6-thioguanine metabolite levels and WBC count was not confirmed in 2 previous trials [33,34]. Furthermore, other studies have failed to show a correlation between absolute leukocyte count and AZA efficacy [35]. In the meantime, from a practical point of view, it is possible to state that in patients with CD and receiving AZA therapy, a decrease in WBC count, maintained over a period of several months, may portend sustained steroid-free remission. Some patients who did not show a substantial decrease in absolute leukocyte count may still go into steroid-free remission in the subsequent months.

Of note, none of our patients attained sustained remission after 10 months of AZA use. Thus, it is likely that, for patients who do not show a clinical benefit of AZA therapy after 10 months of starting treatment, another therapeutic plan must be implemented. It is noteworthy that refractoriness to AZA was observed throughout the entire study period, despite continuous immunosuppressive treatment, that is, even though a patient may have responded well to AZA therapy at first, they might have become refractory to it later.

A high overall incidence (43.4%) of adverse effects in response to AZA was observed in our trial. The majority of subjects experienced mild adverse events while on AZA. Serious adverse events requiring withdrawal from the study occurred for 17% of subjects. This rate is consistent with findings of other investigators [35–37] who reported that, in patients with IBD treated with thiopurines, up to 20% had to discontinue drug therapy owing to the occurrence of adverse events. Similar to data from other studies [35,38,39], myelosuppression was the most common toxicity associated with AZA, and leukopenia was the most common presentation of this hematologic effect. The reported frequency of leukopenia during AZA therapy varies, depending on the definition of leukopenia and the dose prescribed. In the current study, myelotoxicity was observed at a median of 39 months after initiation of AZA treatment. Because bone marrow suppression may occur at any time during treatment [36], routine monitoring of blood count every 1 to 2 months is recommended for as long as the patient is treated with AZA [40,41]. Of note, although lymphopenia has been a prominent finding of AZA therapy, lymphocyte count was not useful in predicting clinical outcome in the present study.

Although the optimal duration of AZA treatment in CD is controversial, it should be mentioned that in the current study, continuation of AZA was beneficial over an extended, 10-year follow-up period. At present, the decision to continue AZA therapy indefinitely should be individualized. However, our findings are concordant with those of another study that found that when the benefit of thiopurine analogue therapy in CD was weighted against adverse events in a statistical model, the benefits appear to last up to 10 years, especially in younger subjects [42]. In addition, it must be emphasized that, despite long-term immunosuppression in CD, defective responses in both innate and adaptive immune systems, triggering a Th1-type inflammatory process, persists and requires continuous downregulation [43].

The present study may be limited by the fact that we did not have a placebo-controlled group; rather, our investigation focused on prospectively observing the treatment efficacy of AZA in patients with strictly steroid-dependent CD. Nonetheless, the most important clinical relevance is the fact that over a 10-year follow-up period, the proportion of patients who achieved sustained steroid-free remission (41–73%) was substantially higher than the rate observed with placebo (7%) in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [16] that also enrolled patients with CD on AZA for up to 15 months. Thus, bearing this limitation in mind, our present results offer an important contribution on the issue of AZA treatment in steroid-dependent CD and may have a considerable impact on the decision-making process concerning the duration of AZA therapy. To our knowledge, this prospective, single-center, longitudinal study represents the most extensive investigation to date on this topic with regard to patient numbers enrolled and length of follow-up. In addition, this is the first study to demonstrate that a persistent decrease in leukocyte count while on AZA therapy is predictive of a sustained steroid-free response in strictly steroid-dependent CD.

## CONCLUSIONS

In conclusion, therapy with AZA represents a meaningful option in the management of steroid-dependent CD for periods up to 10 years. Adverse events are common during long-term AZA therapy, but the safety profile of this drug is acceptable. The data suggest that patients who develop a persistent decrease in mean leukocyte count (particularly a WBC count  $<6\ 000$  cells/mm<sup>3</sup>) while taking AZA are those who most probably will have sustained steroid-free remission.

## Acknowledgements

This study was supported in part by a Clinical Research Grant from the FAPEMIG, Minas Gerais-Brazil.

## REFERENCES:

- Loftus EV Jr, Sandborn WJ: Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*, 2003; 31: 1–20
- Ekbohm A: The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm Bowel Dis*, 2004; 10(Suppl.1): S32–34
- Sandborn WJ, Feagan BG, Lichtenstein GR: Medical management of mild to moderate Crohn's disease: evidence-based treatment algorithms for induction and maintenance of remission. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007; 26: 987–1003
- Irving PM, Gearty RB, Sparrow MP, Gilson PR: Appropriate use of corticosteroids in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007; 26: 313–29
- Summers R, Switz D, Sessions J et al: National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology*, 1979; 77: 847–69
- Katz JA: Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. *Gastroenterol Clin N Am*, 2004; 33: 171–89
- Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V: Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut*, 1994; 35: 360–62
- Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, Harmsen WS et al: The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*, 2001; 121: 255–60
- Tung J, Loftus EV Jr, Freese DK et al: A population-based study of the frequency of corticosteroid resistance and dependence in pediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2006; 12: 1093–100
- Plevy SE: Corticosteroid-sparing treatments in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 2002; 97: 1607–17
- Fegan BG: Maintenance therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98(Suppl): S6–S17
- Su C, Lichtenstein GR: Treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gastroenterol Clin N Am*, 2004; 33: 209–34
- Klein M, Binder HJ, Mitchell M et al: Treatment of Crohn's disease with azathioprine: a controlled evaluation. *Gastroenterology*, 1974; 66: 916–22
- Present DH, Korelitz BI, Wisch N et al: Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *N Engl J Med*, 1980; 302: 981–87
- Ewe K, Press AG, Singe CC et al: Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1993; 105: 367–72
- Candy S, Wright J, Gerber M et al: A controlled double-blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut*, 1995; 37: 674–78
- Markowitz J, Grancher K, Kohn N et al: A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2000; 119: 895–902
- Sandborn W, Sutherland L, Pearson D et al: Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. (Cochrane review). Update Software Oxford, The Cochrane Library, 2003
- Hanauer SB: Considerations in the management of steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2003; 125: 906–10
- Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM et al: 6-Thioguanine monitoring in steroid-dependent patients with inflammatory bowel diseases receiving azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21: 829–39
- Chebli JM, Gaburri PD, De Souza AF et al: Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007; 22: 268–74
- Nikolaus S, Schreiber S: Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2007; 133: 1670–89
- Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J et al: A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*, 2000; 6: 8–15
- Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr: Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*, 1976; 70: 439–44
- O'Brien JJ, Bayless TM, Bayless JA: Use of azathioprine or 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1991; 101: 39–46
- Korelitz BI, Adler DJ, Mendelsohn RA, Sacknoff AL: Long-term experience with 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 1993; 88: 1198–205
- Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR: Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 1995; 123: 132–42
- Sandborn WJ, Tremaine WJ, Wolf DC et al: Lack of effect of intravenous administration on time to respond to azathioprine for steroid-treated Crohn's disease. North American Azathioprine Study Group. *Gastroenterology*, 1999; 117: 527–35
- Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY et al: Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2000; 118: 705–13
- Glas J, Török HP, Daczó J et al: The leukocyte count predicts the efficacy of treatment with azathioprine in inflammatory bowel disease. *Eur J Med Res*, 2005; 10: 535–38
- Cuffari C, Hunt S, Bayless TM: Enhanced bioavailability of azathioprine therapy compared to 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease: correlation with treatment efficacy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000; 14: 1009–14
- Cuffari C, Hunt S, Bayless TM: Utilization of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimize azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 2001; 48: 642–46
- Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G: 6-mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut*, 1996; 39: 401–6
- Sandborn WJ, Van Os EC, Zins BJ et al: An intravenous loading dose of azathioprine decreases the time to response in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1995; 109: 1808–17

PI

35. Gupta P, Gokhale R, Kirschner BS: 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2001; 33: 450-54
36. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE: Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut*, 1993; 34: 1081-85
37. Haber CJ, Meltzer SJ, Present DH, Koretitz BI: Nature and course of pancreatitis caused by 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1986; 91: 982-86
38. Warman JI, Korelitz BI, Fleisher MR, Janardhanam R: Cumulative experience with short- and long-term toxicity to 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol*, 2003; 37: 220-25
39. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP: The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut*, 2002; 50: 485-89
40. Aberra FN, Lichtenstein GR: Monitoring of immunomodulators in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21: 307-19
41. Lichtenstein GR: Use of laboratory testing to guide 6-mercaptopurine/azathioprine therapy. *Gastroenterology*, 2004; 127: 1558-64
42. Lewis JD, Schwartz JS, Lichtenstein GR: Azathioprine for maintenance of remission in Crohn's disease: benefits outweigh the risk of lymphoma. *Gastroenterology*, 2000; 118: 1018-24
43. Brown SJ, Mayer L: The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2007; 102: 2058-69

PERSONAL USE ONLY

