

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

DANIELA MIARELLI CARVALHO

**Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da
fluoxetina e seu metabólito em gestantes saudáveis**

**Ribeirão Preto
2016**

DANIELA MIARELLI CARVALHO

Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes saudáveis

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa Dra Elaine Christine Dantas Moisés

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Carvalho, Daniela Miarelli

Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes saudáveis.

147 p.: il; 30 cm.

Dissertação para título de Mestre apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Moisés, Elaine Christine Dantas.

Palavras chave: 1. Fluoxetina 2. Norfluoxetina 3. Enantiômeros 4. Farmacocinética 5. Gestação 6. Transferência placentária.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Miarelli Carvalho

Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes saudáveis

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico aos meus amados pais, Vanda e João, pelo apoio e incentivo constante de sempre ir atrás da minha realização profissional, que com amor, paciência e compreensão foram fundamentais na escolha deste caminho.

A minha família, irmãos, cunhadas e sobrinhos, pelo apoio, incentivo e amizade. Em especial a Marília e Renata pela ajuda na correção.

A minha querida amiga e orientadora, Profa Dra Elaine Christine Dantas Moisés, por acreditar na minha capacidade, pelo incentivo, pelo carinho e dedicação.

Agradecimento Especial

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos e me direcionar para o melhor a ser seguido, pela sabedoria conquistada de cada dia.

À Prof. Dra. Vera Lucia Lanchote, por aceitar a colaboração deste projeto, disponibilizando seu laboratório PK Clin, colaborando e orientando, com sua infinita sabedoria e contribuição no meu aprimoramento científico ao longo da pós-graduação.

Aos meus irmãos Tereza e Glênio, pelo amor, carinho e incentivo, essenciais que sempre tiveram por mim.

As minhas amigas Gabriela Filgueira e Juciene Caris, pela amizade, pela enorme ajuda, anjos colocado em minha vida desde o início do meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Geraldo Duarte, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, pelo carinho e pela contribuição na qualificação para o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Carvalho Cavalli, primo e amigo, que sempre me incentivou nesta caminhada, colaborando com nosso projeto, um exemplo de profissional.

As técnicas do PK Clin, Maria Paula e Adriana, por me auxiliarem no desenvolvimento dos métodos de análise deste estudo, pelos ensinamentos e pela excelente competência profissional.

Ao Dr. Luiz Augusto Martins e à Dra. Flávia Magalhães, pela contribuição indispensável na realização deste estudo, sempre dispostos e com sorrisos e gentilezas nos momentos necessários.

Agradecimento e carinho especial a equipe dos ambulatórios de gestação de alto risco do departamento de ginecologia e obstetria do HC-FMRP, pelo grande apoio e auxílio.

Aos funcionários do departamento de ginecologia e obstetria do HC-FMRP, pela paciência e disponibilidade em me auxiliar.

A todos os meus amigos do grupo de pesquisa do Laboratório Pk Clin pela troca de experiências e conhecimentos pessoais e profissionais, pela amizade, pelo enorme apoio durante todo meu trabalho, em especial a Juciene Caris pela excelente ajuda na bancada, amizade e companheirismo de todos os momentos. Vocês foram essenciais para a concretização deste estudo.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pelo comprometimento e competência com as pacientes.

As pacientes que participaram desta pesquisa, pela confiança e amizade, tenho enorme carinho por cada uma de vocês.

A FAEPA e FAPESP pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

CARVALHO, DM. Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes saudáveis. **2016. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.**

A fluoxetina, um fármaco quiral disponível para uso clínico, como uma mistura racêmica de (S)-(+)-fluoxetina e (R)-(-)-fluoxetina, é a droga mais utilizada no tratamento de estados depressivos durante a gravidez. N-desmetilação de fluoxetina por CYP2D6, CYP2C9 e CYP3A4 produz o seu metabólito ativo, norfluoxetina com os enantiômeros (S)-(+)-e (R)-(-)-norfluoxetina. Os objetivos deste estudo foram avaliar a farmacocinética, distribuição transplacentária e metabolismo da fluoxetina e norfluoxetina, em gestantes saudáveis. Foram avaliadas nove gestantes sem comorbidades. Todas receberam dose única de 20 mg de fluoxetina via oral em duas ocasiões distintas, sendo a primeira com 32 semanas e a segunda no dia do parto. Após a administração do fármaco, foram coletadas amostras seriadas de sangue materno para avaliação da concentração dos enantiômeros da fluoxetina, nos tempos de zero a 672 horas. No dia do parto, após receber a medicação, foram coletadas amostras sanguíneas materna no momento do nascimento, de sangue de vasos umbilicais, espaço interviloso, líquido amniótico para avaliação da transferência placentária. Vinte e quatro horas após o parto, foi coletada uma amostra de 3 mL de leite materno para avaliação de excreção. A análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (LC-MS/MS). O método de análise foi desenvolvido e validado de acordo com a RDC 27, ANVISA. As medianas dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros (S)-(+)- e (R)-(-)- da fluoxetina foram, respectivamente: C_{max} 6,05 vs 5,94 ng/mL, $t_{1/2}$ α 1,94 vs 2,33 h, $AUC^{0-\infty}$ 97,81 vs 209,20 ng.h/mL, Cl/f 1,45 vs 0,66 L/h/kg, Vd/f 19,00 vs 23,25 L/kg. E dos parâmetros farmacocinéticos dos (S)-(+)- e (R)-(-)-norfluoxetina foram, respectivamente: C_{max} 6,29 vs 3,29 ng/mL, $t_{1/2}$ α 83,48 vs 95,15 h, $AUC^{0-\infty}$ 942,70 vs 498,6 ng.h/mL. O método para análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina mostraram limites compatíveis com a aplicação de um estudo clínico envolvendo a administração de uma dose única.

Foi observada enantiosseletividade em alguns parâmetros na farmacocinética e transferência placentária da fluoxetina e norfluoxetina em gestantes.

Palavras-chave: fluoxetina, norfluoxetina, enantiômeros, farmacocinética, gestação, transferência placentária.

ABSTRACT

CARVALHO, DM. **Pharmacokinetic study and analysis of transplacental distribution of fluoxetine and its metabolite in healthy pregnant women.** 2016 147 f. Thesis (MS) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Fluoxetine, a chiral drug available for clinical use as a racemic mixture of (S)-(+)-fluoxetine and (R)-(-)-fluoxetine, is the most widely used drug in the treatment of depressive states during pregnancy. N-demethylation of fluoxetine by CYP2D6, CYP2C9 and CYP3A4 produce its active metabolite norfluoxetine as the enantiomers S-(+) and (R)-(-)-norfluoxetine.

The objectives of this study were to evaluate the pharmacokinetics, transplacental distribution and metabolism of fluoxetine and norfluoxetine in healthy pregnant women.

A total of nine pregnant women without comorbidities received a single oral dose of 20 mg fluoxetine on two separate occasions, the first in the 32 gestation weeks and the second at the day of delivery. After drug administration during the first sequential samples of maternal blood were collected at time zero until 672 hours. On the day of delivery, after receiving the medication maternal blood sample was collected at birth, umbilical blood vessels, intervillous space, and amniotic fluid sample for evaluation of placental drug transfer. Twenty-four hours after delivery was collected a sample of 3 ml of breast milk for analysis of excretion by this way. The analysis of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma was performed by high-performance liquid chromatography (LC-MS/MS). The analytical method was developed and validated in accordance with the RDC 27, ANVISA.

Median pharmacokinetic parameters of (S)-(+)- and (R)-(-)-fluoxetine enantiomers were: C_{max} 6.05 vs 5.94 ng/mL, $t_{1/2}$ α 1.94 vs 2.33 h, $AUC^{0-\infty}$ 97.81 vs 209.20 ng.hr/mL, Cl/f 1.45 vs 0.66 L/h/kg, Vd/f 19.00 vs 23.25 L/kg. The values of (S)-(+)- and (R)-(-)-norfluoxetine enantiomers were: C_{max} 6.29 vs 3.29 ng/mL, $t_{1/2}$ α 83.48 vs 95.15 h, $AUC^{0-\infty}$ 942.70 vs 498.6 ng.h/mL.

Confidence method for sequence analysis of the enantiomers of fluoxetine and its active metabolites showed limits compatible with the application of a clinical study involving the administration of a single dose of pregnant women.

Enantioselectivity was observed in some parameters of pharmacokinetics and placental fluoxetine and norfluoxetine transfer in healthy pregnant women.

Keywords: fluoxetine, norfluoxetine, enantiomers, pharmacokinetics, pregnancy, placental transfer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sinapse da serotonina (adaptado de HOT; MATHEW; CHARNEY, 2009) (14). __ 25
- Figura 2.** Estruturas químicas dos enantiômeros (S)-(+), (R)-(-)-fluoxetina e (S)-(+), (R)-(-)-norfluoxetina. *Centro Quiral (adaptado de Bueno J.S. et al. 2011)(43). _____ 27
- Figura 3.** Estrutura esquemática da placenta humana. Mostrando a relação entre vilosidade corial, espaço interviloso e as artérias espiraladas (Figura adaptada de Callen P.W., Ultrasonography in obstetrics and Gynecology, 4th Ed.) (87). _____ 33
- Figura 4.** Cálculo amostral. _____ 41
- Figura 5.** Espectro de massas do íon produto (A) e do íon protonado (B) da fluoxetina. ____ 59
- Figura 6.** Espectro de massas do íon produto (C) e do íon protonado (D) da norfluoxetina. 59
- Figura 7.** Cromatogramas referente à ordem de eluição da fluoxetina e norfluoxetina (50 ng/mL de metanol). Padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-fluoxetina (A), padrão do enantiômero (S)-(+)-fluoxetina (B), padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-fluoxetina (A), padrão do enantiômero (S)-(+)-fluoxetina (B), padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-norfluoxetina (C), padrão do enantiômero (S)-(+)-norfluoxetina (D). _____ 60
- Figura 8.** Cromatogramas da análise dos enantiômeros FLX e NorFLX no plasma humano e no fluido amniótico. Análise dos enantiômeros da FLX (A) e NorFLX (B) em plasma obtido após a administração de uma dose oral única de 20 mg FLX racêmica em gestante. Análise dos enantiômeros da FLX (C) e NorFLX (D) em fluido amniótico obtido após a administração de uma dose oral única de 20 mg FLX racêmica gestante. 1) (S)-(+)-FLX.; 2) (R)-(-)-FLX; 3) (S)-(+)-NorFLX; 4) (R)-(-)-NorFLX. _____ 61
- Figura 9.** Cromatogramas referente à análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno. _____ 62
- Figura 10.** Curvas de concentração plasmática versus tempo dos enantiômeros da fluoxetina em gestantes após administração de 20 mg de cloridrato de fluoxetina racêmico em dose única. Dados expressos em Mediana, Percentil 25 e Percentil 75. _____ 69
- Figura 11.** Curvas de concentração plasmática versus tempo dos enantiômeros da norfluoxetina em gestantes após a administração de 20 mg de cloridrato de fluoxetina racêmico em dose única. Dados expressos em Mediana, P25 e P75. _____ 69
- Figura 12.** Curvas de concentração plasmática versus tempo dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em gestantes. Dados expressos em Mediana. _____ 70
- Figura 13.** Avaliação comparativa das medianas, percentil 25 e 75 e os valores mínimo e máximo de (A) relação feto/mãe, (B) relação espaço interviloso/mãe, (C) artéria umbilical/veia umbilical, (D) veia umbilical/espaço interviloso, (E) líquido amniótico/veia materna; (F) líquido amniótico/veia umbilical dos enantiômeros da fluoxetina em 9 gestante. _____ 74
- Figura 14.** Avaliação comparativa das relações das medianas, percentil 25 e 75 e os valores mínimo e máximo de (A) feto/ mãe, (B) espaço interviloso/mãe, (C) artéria umbilical/veia umbilical, (D) veia umbilical/espaço interviloso, (E) líquido amniótico/veia materna; (F) líquido amniótico/veia umbilical dos enantiômeros da norfluoxetina em 9 gestante. _____ 74
- Figura 15.** Avaliação comparativa das relações das medianas, percentil 25 e 75 e os valores mínimo e máximo de leite materno / mãe da norfluoxetina e fluoxetina em 8 gestantes. __ 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios para episódio depressivo maior _____	22
Tabela 2. Condições ideais de ionização e fragmentação obtidas para fluoxetina e norfluoxetina _____	50
Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas _____	51
Tabela 4. Dados clínicos das gestantes _____	56
Tabela 5. Dados Bioquímicos das gestantes investigadas _____	57
Tabela 6. Dados clínicos referentes à resolução da gestação _____	58
Tabela 7. Efeito matriz para os enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano e líquido amniótico _____	63
Tabela 8. Parâmetros de validação, Precisão e Exatidão, do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano por LC-MS/MS _____	64
Tabela 9. Parâmetros de validação, Precisão e Exatidão, do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em líquido amniótico humano por LC-MS/MS _____	65
Tabela 10. Teste estabilidade para análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico humano _____	66
Tabela 11. Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação do método _____	67
Tabela 12. Precisão e exatidão, média intra lotes (n=5), inter lotes (n=5) e eficiência do processo de extração (EP) _____	68
Tabela 13. Parâmetros farmacocinéticos da fluoxetina em gestantes (n=9) _____	71
Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos da norfluoxetina em gestantes (n=9) _____	71
Tabela 15. Concentrações da fluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9) _____	72
Tabela 16. Concentrações da norfluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9) _____	72
Tabela 17. Relação da transferência placentária da fluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9) _____	73
Tabela 18. Relação da transferência placentária da norfluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9) _____	73
Tabela 19. Concentrações da fluoxetina e norfluoxetina e da relação feto/mãe dos mesmos fármacos em amostras coletadas 24 horas após o parto _____	75
Tabela I – Dados individuais das nove gestantes _____	109
Tabela II – Dados bioquímicos das nove gestantes _____	110
Tabela III – Características individuais dos recém-nascidos (RN) das nove gestantes _____	111
Tabela IV – Valores individuais das concentrações plasmática <i>versus</i> tempo do enantiômeros (S)-(+)-fluoxetina _____	112
Tabela V – Valores individuais das concentrações plasmática <i>versus</i> tempo do enantiômeros (R)-(-)-fluoxetina _____	113
Tabela VI – Valores individuais das concentrações plasmática <i>versus</i> tempo do enantiômeros (S)-(+)-norfluoxetina _____	114

Tabela VII – Valores individuais das concentrações plasmática <i>versus</i> tempo do enantiômeros (R)-(-)-norfluoxetina _____	115
Tabela VIII – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da fluoxetina _____	116
Tabela IX – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da norfluoxetina _____	117
Tabela X – Dados individuais da excreção fetal dos enantiômeros da fluoxetina em plasma e líquido amniótico _____	121
Tabela XI – Dados individuais da excreção fetal dos enantiômeros da norfluoxetina em plasma e líquido amniótico _____	122
Tabela XII – Dados individuais das relações materno e fetais dos enantiômeros da fluoxetina _____	123
Tabela XIII – Dados individuais das relações materno e fetais dos enantiômeros da norfluoxetina _____	124
Tabela XIV – Concentrações da fluoxetina e norfluoxetina em amostras coletadas 24 horas após o parto _____	125

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do departamento de ginecologia e obstetrícia _____	102
ANEXO B – Aprovação do comitê de ética e pesquisa _____	103

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido _____	105
APÊNDICE B – Características individuais das gestantes investigadas. _____	107
APÊNDICE C – Parâmetros bioquímicos e hematológicos utilizados para a avaliação da normalidade dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino . _____	108
APÊNDICE D – Características dos recém-nascidos das gestantes investigadas. _____	109
APÊNDICE E – Dados individuais do enantiômero (S)-(+)-Fluoxetina após a ingestão oral, de dose única 20 mg fluoxetina racêmica nas nove gestantes investigadas. _____	110
APÊNDICE F – Dados individuais do enantiômero (R)-(-)-Fluoxetina após a ingestão oral, de dose única 20 mg fluoxetina racêmica nas nove gestantes investigadas. _____	111
APÊNDICE G – Dados individuais do enantiômero (S)-(+)-Norfluoxetina após a ingestão oral, de dose única 20 mg fluoxetina racêmica nas nove gestantes investigadas. _____	112
APÊNDICE H – Dados individuais do enantiômero (R)-(-)-Norfluoxetina após a ingestão oral, de dose única 20 mg fluoxetina racêmica nas nove gestantes investigadas. _____	113

APÊNDICE I – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da fluoxetina nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica.	114
APÊNDICE J – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da norfluoxetina nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica.	115
APÊNDICE K – Gráficos individuais das concentrações <i>versus</i> o tempo para os enantiômeros da FLX e NorFLX nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica.	116
APÊNDICE L – Dados individuais da distribuição entre os diferentes compartimentos maternos e fetais dos enantiômeros da fluoxetina nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.	119
APÊNDICE M – Dados individuais da distribuição entre os diferentes compartimentos maternos e fetais dos enantiômeros da norfluoxetina nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.	120
APÊNDICE N – Dados individuais das razões feto-mãe dos enantiômeros da fluoxetina nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.	121
APÊNDICE O – Dados individuais das razões feto-mãe dos enantiômeros da norfluoxetina nas nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.	122
APÊNDICE P – Dados individuais em leite materno da fluoxetina e norfluoxetina nas 9 gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.	123
APÊNDICE Q – Cromatogramas individuais da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno de 8 gestantes tratadas com dose única oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.	124
APÊNDICE R – Artigo Original	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CQ: Controle de qualidade

CQA: Controle de qualidade de alta concentração

CQB: Controle de qualidade de baixa concentração

CQD: Controle de qualidade de diluição

CQM: Controle de qualidade de média concentração

CV: Coeficiente de variação

CYP: Citocromo P450

DGO: Departamento de ginecologia e obstetrícia

EPR: Erro padrão relativo

F/M: Relação Feto/Materna

FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FLX: fluoxetina

FMN: Fator de matriz normalizado por padrão interno

HCFMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HMOs: Oligossacarídeos do leite humano

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IC 95%: Intervalo de confiança 95%

IMC: Índice de massa corporal

ISR: Inibidores seletivos de recaptção

ISRS: Inibidores seletivos de receptação da serotonina

LA: Líquido amniótico

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

LC: Cromatografia líquida

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LIQ: Limite inferior de quantificação

LOD: Lower limit of detection

LOD: Lower limit of quantification

MAO: Monoaminoxidase

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: Espectrometria de massas

NorFLX: norfluoxetina, metabólito ativo da fluoxetina

P-gp: Glicoproteína-P

PI: Padrão interno

SNC: Sistema nervoso central

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

UPC: Unidade de pesquisa clínica

v/v: volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC: Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

Cl creatinina: *Clearance* de creatinina

Cl/f: *Clearance* total aparente

C_{max}: Concentração plasmática máxima

K_{el}: Constante de velocidade de eliminação

t_½: Meia-vida de eliminação

α: constante de velocidade de absorção

β: constante de velocidade de eliminação rápida

T_{max}: Tempo para alcançar Concentração plasmática máxima

Vd/f: Volume de distribuição aparente

®: Marca registrada

™: Trademark

5-HT: 5-hidroxitriptamina, Serotonina

(R)-(-): Enantiômero (R)-(-)

(S)-(+): Enantiômero (S)-(+)

[M+H]⁺: Íon molecular protonado

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. Introdução	22
1.1 DEPRESSÃO	21
1.1.1 Conceituação e fisiopatologia	21
1.1.2 Depressão no ciclo gravídico-puerperal	23
1.1.3 Bases bioquímicas da depressão	24
1.1.4 Tratamento medicamentoso na gestação	25
1.1.4.1 Inibidores de recaptação da serotonina	26
1.2 FLUOXETINA	26
1.2.1 Caracterização farmacológica	26
1.2.2 Enantiosseletividade da fluoxetina	27
1.2.3 Metabolismo da fluoxetina	28
1.2.4 Farmacocinética e farmacodinâmica dos enantiômeros da fluoxetina e seu metabólito ativo	29
1.3 FARMACOCINÉTICA DE DROGAS NA GESTAÇÃO	30
1.3.1 Aparelho gastrointestinal	30
1.3.2 Sistema cardiovascular	30
1.3.3 Composição proteica plasmática	31
1.3.4 Metabolismo de drogas	31
1.3.5 Excreção renal	31
1.4 DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS DIFERENTES COMPARTIMENTOS MATERNOS E FETAIS	32
1.4.1 Transferência Placentária	32
1.4.2 Líquido Amniótico	33
1.4.3 Leite materno	34
2. Justificativa	35
3. Objetivos	37
3.1 GERAL	38
3.2 ESPECÍFICOS	38
4. Casuísticas e Métodos	39
4.1 CASUÍSTICA	40
4.1.1 Aspectos éticos do projeto	40
4.1.2 Seleção de pacientes	40
4.1.3 Cálculo amostral	40
4.1.4 Critérios	41
4.1.4.1 Critérios de inclusão	41
4.1.4.2 Critérios de exclusão	41
4.1.4.3 Critério de descontinuidade	41
4.1.5 Tipo de estudo	41
4.2 MÉTODO	42
4.2.1 Dados epidemiológicos	42

4.2.2 Coleta de amostras biológicas _____	43
4.2.3 Sistema de coleta da transferência placentária e excreção fetal _____	44
4.2.4 Desenvolvimento do método de análise para determinação dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico _____	44
4.2.4.1 Reagentes _____	44
4.2.4.2 Solução padrão _____	44
4.2.4.3 Análise cromatográfica _____	45
4.2.4.4 Preparo das amostras _____	45
4.2.4.5 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina _____	46
4.2.5 Validação dos métodos de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico _____	46
4.2.5.1 Efeito matriz _____	46
4.2.5.2 Linearidade _____	47
4.2.5.3 Precisão e exatidão _____	47
4.2.5.4 Estabilidade _____	48
4.2.6 Desenvolvimento do método de análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno _____	49
4.2.6.1 Generalidades _____	49
4.2.6.2 Desenvolvimento do método - Sistema 2D LC-MS/MS _____	49
4.2.6.3 Condições de ionização dos analitos _____	50
4.2.6.4 Condições de análise _____	50
4.2.6.5 Preparo das soluções de trabalho _____	51
4.2.6.6 Preparo das amostras _____	51
4.2.7 Validação do método de análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno _____	52
4.2.7.1 Seletividade _____	53
4.2.7.2 Efeito de matriz _____	53
4.2.7.3 Linearidade _____	53
4.2.7.4 Precisão e Exatidão _____	53
4.2.8 Análise farmacocinética _____	54
4.2.9 Análise estatística _____	54
5. Resultados _____	55
5.1 CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA _____	56
5.2 ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA _____	58
5.2.1 Análise dos métodos em plasma e líquido amniótico _____	58
5.2.2 Análise do método em leite materno _____	62
5.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA _____	62
5.3.1 Plasma e líquido amniótico _____	62
5.3.2 Leite Materno _____	67
5.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA EM GESTANTES _____	68
5.4.1 Análise farmacocinética dos enantiômeros da FLX e NorFLX _____	68
5.4.2 Análise da distribuição entre os diferentes compartimentos maternos e fetais dos enantiômeros da FLX e NorFLX _____	72
5.4.2.1 Transferência placentária no plasma e excreção fetal no líquido amniótico _____	72
5.4.2.2 Excreção no leite materno _____	75
6. Discussão _____	76
6.1 CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA _____	77

6.2 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA EM PLASMA, LÍQUIDO AMNIÓTICO E LEITE MATERNO _____	79
6.3 FARMACOCINÉTICA DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA _____	81
6.4 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS DIFERENTES COMPARTIMENTOS MATERNOS E FETAIS DOS ENANTIÔMEROS DA FLX E NorFLX _____	84
7. Conclusões _____	88
8. Referências Bibliográficas _____	90
Anexos _____	101
Apêndices _____	104

1.1 DEPRESSÃO

1.1.1 Conceituação e fisiopatologia

O conceito de depressão maior é abrangente e pouco específico, englobando um extenso espectro de condições, que vão desde apresentações clínicas leves, como reações psicológicas ao luto, até aquelas formas mais graves de depressão, para as quais, provavelmente colaboram fatores biológicos adquiridos e/ou geneticamente determinados. É considerado patológico quando requerer intervenção medicamentosa associada à psicoterapia por médico especializado (1).

Inúmeras hipóteses têm sido propostas com o objetivo de explicar os mecanismos fisiopatológicos dos sintomas depressivos (2–5). Embora a etiologia da depressão seja assunto de controvérsia na literatura, considera-se que os distúrbios do humor possam ser atribuídos a alterações de alguns grupos de neurônios que contêm aminas biogênicas.

A constatação de o inibidor da monoaminoxidase (MAO), enzima responsável pela inativação de neurotransmissores na fenda sináptica, ter a capacidade de prevenir a degradação dessas aminas e, conseqüentemente, diminuir os sintomas depressivos embasou a hipótese monoaminérgica da depressão (6). Esta teoria relaciona o déficit na liberação de neurotransmissores na sinapse ao aumento compensatório no número de seus receptores.

Tabela 1. Critérios para episódio depressivo maior (1)

A	<p>No mínimo cinco dos seguintes sintomas estiveram presentes durante o período de duas semanas, representam uma alteração a partir do funcionamento anterior; sendo pelo menos um dos sintomas (1) humor deprimido ou (2) perda do interesse ou prazer</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, indicado por relatos subjetivos (p. ex., sente-se triste ou vazio) ou observação feita por terceiros (p.ex., chora muito). NOTA: Em crianças e adolescentes, pode ser humor irritável; 2. Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou em quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias (indicado por relato subjetivo ou observação feita por terceiros); 3. Perda ou ganho significativo de peso sem estar em dieta (p.ex., mais de 5% do peso corporal em 1 mês), ou diminuição ou aumento do apetite quase todos os dias. NOTA: Em crianças, considerar incapacidade de apresentar os ganhos de peso esperados; 4. Insônia ou hipersonia quase todos os dias; 5. Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outros, não meramente sensações subjetivas de inquietação ou de estar mais lento) 6. Fadiga ou perda de energia quase; 7. Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada (que pode ser delirante), quase todos os dias (não meramente auto recriminação ou culpa por estar doente); 8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, quase todos os dias (por relato subjetivo ou observação feita por outros); 9. Pensamentos de morte recorrentes (não apenas medo de morrer), ideação suicida sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.
B	Os sintomas não satisfazem os critérios para um Episódio Misto
C	Os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.
D	Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (p.ex., droga de abuso ou medicamento) ou de uma condição médica geral (p.ex., hipotireoidismo)
E	Os sintomas não são mais bem explicados por luto, ou seja, após a perda de um ente querido, os sintomas persistem por mais de dois meses ou são caracterizados por acentuados prejuízos funcionais, preocupação mórbida com desvalia, ideação suicida, sintomas psicóticos ou retardo psicomotor.

A principal mudança no Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM 5th ed.) no critério diagnóstico da depressão maior consiste no período que se inicia os episódios depressivos. Depressão pós-parto passou a ser diagnosticada com início ainda na gestação e não somente no início após o parto como no manual anterior (7) (Tabela 1).

1.1.2 Depressão no ciclo gravídico-puerperal

Entre os transtornos mentais que acometem as puérperas um dos mais relevantes é a depressão pós-parto, que, com frequência, é subdiagnosticada ou permanece sem o devido tratamento (8,9). A literatura descreve um alto risco de estados depressivos em mulheres na idade fértil, podendo ser potencializado durante o processo de maternidade (10–12).

Estima-se que uma em cada cinco pessoas, em algum momento da vida, passará pela experiência de um episódio de depressão maior (13,14). Considerando-se a população feminina, 10-15% das mulheres teriam depressão durante a gravidez (15), dados atuais sugerem um aumento considerável, passando para 20% o número de mulheres que sofrem de depressão durante a gestação (10–12) e 10-22% no pós-parto (16), sendo observada a ocorrência de 1,1 a 4 casos de estado depressivo em cada 1.000 partos (17,18).

Em ampla revisão de literatura, Menon (2008) aponta que o número de diagnósticos é geralmente subestimado, podendo atingir taxas superiores a 70% das mulheres grávidas, se investigados todos os critérios de depressão maior (19).

Nos Estados Unidos, em 2005, Gaynes e colaboradores observaram que 14,5% das mulheres desenvolvem um quadro de depressão, durante a gravidez ou nos primeiros três meses após o nascimento da criança (20). Essa incidência varia de acordo com a idade gestacional, com taxas no primeiro, no segundo e terceiro trimestres, de 7,4% (intervalo de confiança de 95%, 2,2%-12,6%), 12,8% (10,7%-14,8%), 12,0% (7,4%-16,7%), respectivamente (20,21). No Brasil, seguindo essa mesma tendência de acordo com a idade gestacional, os dados somados estão em torno de 44,2% (22). Estudo realizado com 1.083 puérperas, em Ribeirão Preto e região, apontou uma taxa de 23,7% para depressão pós-parto (23).

Lancaster e colaboradores em 2010 (24) examinaram vários fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de depressão em gestantes e observaram que os fatores que mais estavam associados com esta doença foram o estresse diário, falta de suporte social e violência doméstica.

O desenvolvimento e/ou agravamento do quadro clínico de depressão durante a gestação acarreta potenciais riscos tanto para mãe, como para o feto, podendo ocasionar consequências devastadoras na mulher, em seu filho e também em sua família (19,25), principalmente em relação ao desenvolvimento motor, emocional e cognitivo de crianças de mães acometidas no período pós-parto (26,27). Em estudo sobre depressão crônica no primeiro ano pós-parto, realizado com 112 mães e suas crianças, foi relatado atraso significativo no desenvolvimento psicomotor destas crianças até 15 meses (28,29).

Neste contexto, com o objetivo de diagnóstico e início de tratamento precoce, evitando agravamento do quadro, recomenda-se o rastreamento da gestante para esta entidade clínica a cada trimestre da gestação (24,30).

1.1.3 Bases bioquímicas da depressão

Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), é uma indolamina, produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido L-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, sendo quimicamente designada como: L-Triptofano-L-5OH Triptofano-5-OH Triptamina (31).

Depois de ser sintetizada a partir do triptofano, fica armazenada dentro de vesículas para ser liberada na fenda sináptica quando ocorrer um estímulo deste neurônio. O transportador 5-HT está localizado na porção terminal do axônio e no corpo do neurônio serotoninérgico, havendo vários subtipos, com destaque para o envolvimento do 5-HT_{1A} na fisiopatologia de transtornos da ansiedade (32,33).

Quando a serotonina é liberada de seus terminais na fenda sináptica, se liga aos seus receptores localizados tanto na fibra pré como na pós-sináptica (figura 1). Os principais circuitos que este transmissor segue são (34):

- Ativação dos receptores pós-sinápticos resultando na transdução do sinal estimulatório do neurônio sequencial;
- Ligação aos receptores pré-sinápticos do neurônio, a partir do qual foi liberada, fornecendo feedback e regulando a plasticidade do mesmo;
- Recaptação para dentro do neurônio pré-sináptico através de seu transportador, sendo então reciclada, retornando a célula à sua condição de descanso, para futuramente ser liberada de novo ou decomposta pela monoaminoxidase e excretada na urina. Utilizando-se este mecanismo, evita-se a superestimulação dos receptores.

Esta proteína age como inibidor e modulador na conduta geral e psíquica do ser humano, influenciando quase todas as funções cerebrais por inibir ou estimular o sistema gaba (35). É considerado um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC). Atua na regulação fisiológica de diferentes funções do corpo humano, alterando o sono, o apetite, o humor, o comportamento sexual e também ajudando a controlar os músculos lisos do coração e da via gastrointestinal (36). Sendo assim, falhas nestas etapas de produção, liberação e/ou ação de serotonina, através de seus receptores, podem desencadear distúrbios relacionados com o humor. No entanto, falhas nestas etapas de produção, liberação e/ou ação de serotonina, através de seus receptores, podem desencadear distúrbios relacionados com o humor (37).

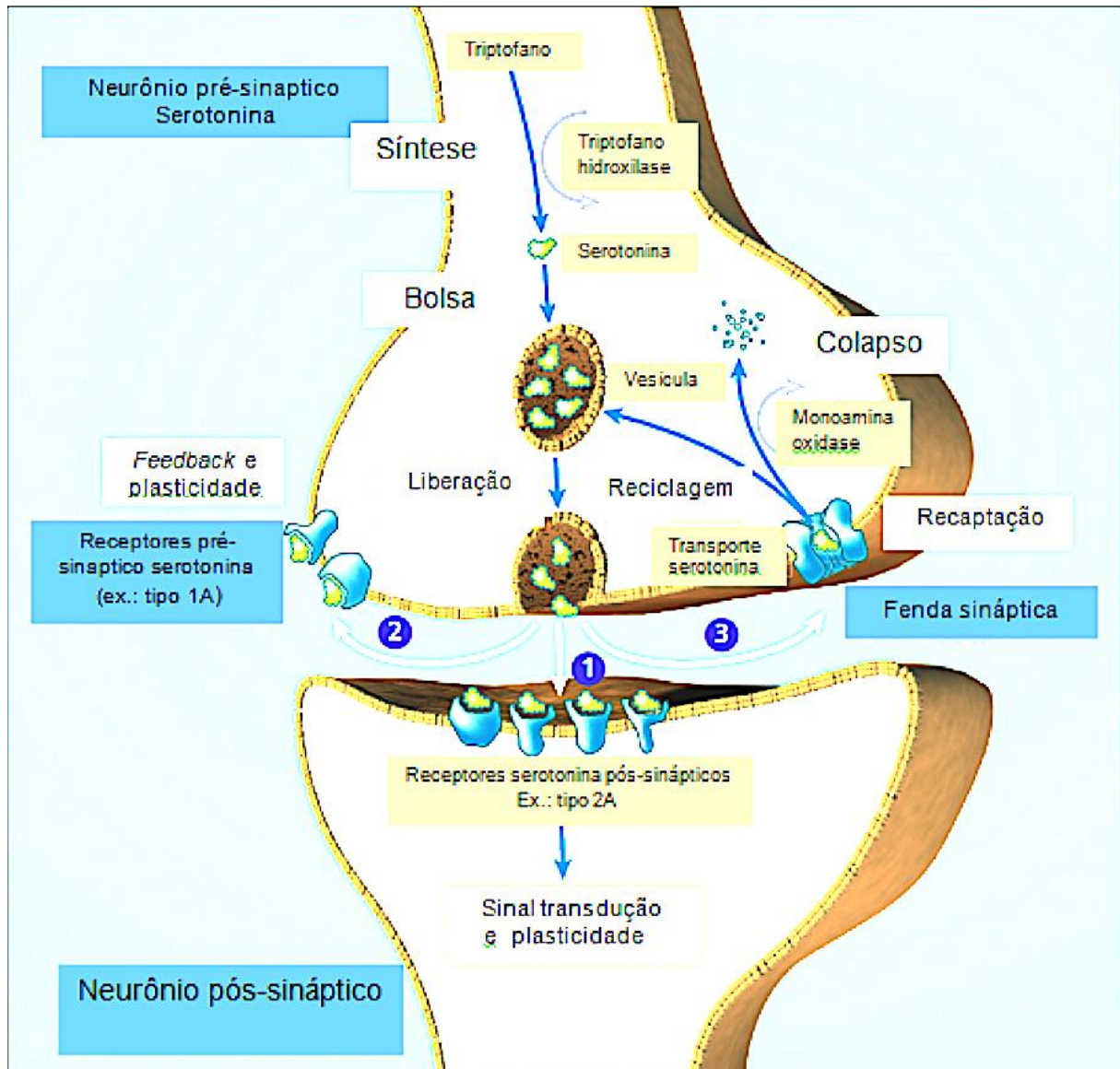


Figura 1. Sinapse da serotonina (adaptado de HOT; MATHEW; CHARNEY, 2009) (14).

1.1.4 Tratamento medicamentoso na gestação

Os antidepressivos atuam melhorando o humor e, conseqüentemente, o desempenho global da pessoa através, principalmente, do aumento da biodisponibilidade de neurotransmissores atuantes no Sistema Límbico, juntamente com a diminuição no número dos receptores e aumento de sua sensibilidade.

O aumento de aminas na fenda sináptica pode ser decorrente do bloqueio da recaptação da serotonina e da noradrenalina no neurônio pré-sináptico ou também da inibição da MAO.

1.1.4.1 Inibidores de recaptção da serotonina

O efeito antidepressivo dos inibidores de recaptção da serotonina (IRS) parece ser consequência do bloqueio seletivo da recaptção da serotonina (5-HT). Os IRS representam a classe de antidepressivo mais prescrita durante a gravidez para tratamento de distúrbios do humor. Por ano, 92.000 (2,8%) grávidas são tratadas com um agente IRS (20,38).

Em um estudo retrospectivo com gestantes que tomaram pelo menos um medicamento da classe dos ISRS, Wen e colaboradores (2006) (39) demonstraram que a fluoxetina foi a mais prescrita, seguida pela paroxetina, sertralina, fluvoxamina, e citalopram, respectivamente. Recente estudo realizado para investigar as áreas do pré córtex frontal e hipocampo do cérebro de ratas gestantes estressadas mostrou que, enquanto tratadas com fluoxetina, os efeitos do stress e os níveis de serotonina foram normalizados (12).

Os inibidores de recaptção da serotonina, assim como os outros agentes psicotrópicos, são classificados pelo "Food and Drug Administration" predominantemente como categoria C, de acordo com os riscos fetais durante a terapia farmacológica crônica durante a gestação (19), principalmente devido à pequena disponibilidade de grandes estudos clínicos randomizados e controlados. Por outro lado, observa-se na literatura, extensa descrição de prática clínica durante a gestação, principalmente em relação ao uso da fluoxetina.

1.2 FLUOXETINA

As características intrínsecas das drogas são de valor relevante no momento da escolha das mesmas para utilização nos tratamentos propostos. Dentre as drogas empregadas em terapêutica antidepressiva na gestação e puerpério, a fluoxetina, foco deste estudo, aparece como um dos fármacos mais utilizados na prática clínica.

1.2.1 Caracterização farmacológica

A fluoxetina (FLX) é um antidepressivo do tipo amina, quimicamente designada como cloridrato de (\pm) N-metila-3-fenila-3-[4-(trifluorometila)fenoxi]propano-1-amina, cuja fórmula molecular é $C_{17}H_{19}ClF_3NO$ (40). As estruturas químicas estão demonstradas na Figura 2.

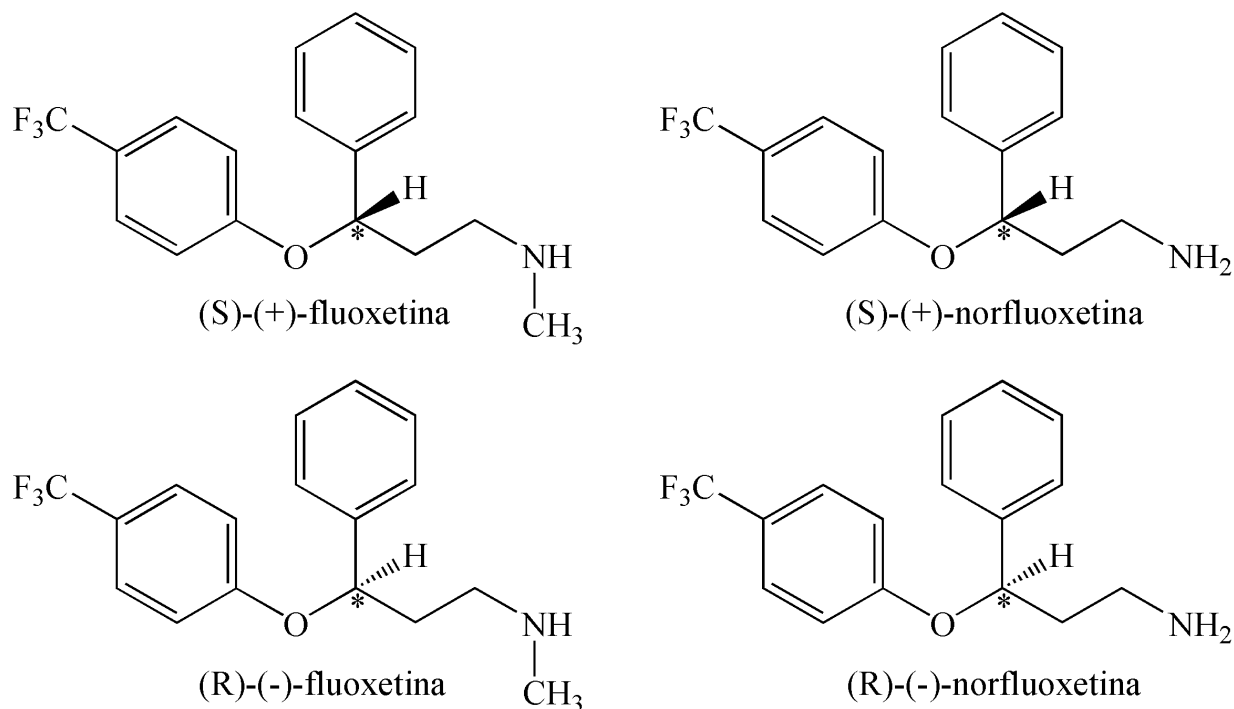


Figura 2. Estruturas químicas dos enantiômeros (S)-(+), (R)-(-)-fluoxetina e (S)-(+), (R)-(-)-norfluoxetina. *Centro Quiral (adaptado de Bueno J.S. et al. 2011)(41).

Por ser um fármaco altamente seletivo na inibição da recaptação da serotonina, aumentando sua atividade no cérebro, originou-se uma nova classe terapêutica, chamada inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS) de baixa toxicidade (42,43). Oferecendo assim maior segurança na prescrição de medicamento para depressão na população em geral e em gestantes, em decorrência de sua maior eficácia, menor taxa de efeitos adversos e margem de segurança maior, em comparação às classes de antidepressivos tricíclicos e inibidores de monoaminoxidase (15).

Além da indicação primária de tratamento para depressão, por seus efeitos clínicos, a FLX tem sido muito prescrita também para tratamento de vários outros distúrbios da ansiedade como transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico, depressão bipolar e bulimia nervosa (27,44).

1.2.2 Enantiosseletividade da fluoxetina

Os isômeros ópticos que possuem um ou mais centros quirais, um contendo uma estrutura que é a imagem especular da estrutura do outro, são chamados de enantiômeros. Os pares de enantiômeros possuem todas as propriedades químicas e físicas iguais, com exceção do desvio do plano da luz polarizada, porém podem apresentar efeitos clínicos e etapas metabólicas diferentes. Um par de enantiômeros pode ser metabolizado pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades ou por enzimas diferentes (45–47). A mistura de

dois enantiômeros é denominada mistura racêmica. Os enantiômeros são designados como S e R de uma droga quiral, sendo um (+) e outro (-).

A FLX atua terapêuticamente como racemato, sendo constituída por enantiômeros (S)-(+) e (R)-(-) (45). Os dois enantiômeros da FLX apresentam potência semelhante no bloqueio de recaptção da serotonina (45–47). Por sua vez, observa-se que o metabólito ativo (S)-(+)-norfluoxetina (NorFLX) é 20 vezes mais potente que o (R)-(-)-NorFLX, tanto *in vitro* como *in vivo* (48,49).

Neste contexto, considera-se que diferentes respostas clínicas podem estar relacionadas a diferenças na concentração e ação individual de cada enantiômero da FLX assim como da NorFLX (50–52).

1.2.3 Metabolismo da fluoxetina

As famílias mais comuns de enzimas envolvidas no metabolismo de drogas são: citocromo P450 (CYP), difosfato uridina glicuronosil transferase (UGT) e N-acetil transferase (NAT) (27,44,53,54).

A CYP é uma superfamília multigênica de enzimas encontradas primeiramente no fígado, mas também no trato gastrointestinal, pulmões e rins. As isoenzimas são divididas em três famílias principais (CYP1, CYP2 e CYP3), sendo isoenzimas específicas envolvidas no metabolismo hepático da maioria das drogas.

Os inibidores de recaptção de serotonina são substratos de enzimas da classe CYP, sendo que a nortriptilina é substrato da enzima CYP2D6 (55), o citalopram da CYP2C19, CYP3A4 e CYP2D6 (56–58) e sertralina do CYP2D6, CYP2C9, CYP2B6, CYP2C19 e CYP3A4 (20,59).

O composto original da FLX sofre *N*-desmetilação, produzindo o metabólito ativo NorFLX, prolongando sua ação biológica (45,49,60). A FLX desmetilada e seu metabólito NorFLX são metabolizados principalmente pelo CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 e, em menor proporção, pelo CYP2C19 (50,52,61,62), sendo pouco mais que 2,5% eliminado pela urina em sua forma inalterada (60).

Como citado previamente, o composto original FLX é uma mistura racêmica de (S)-(+) e (R)-(-) isômeros (50:50), sendo os isômeros (S)-(+)-FLX, (R)-(-)-FLX e (S)-(+)-NorFLX os que contribuem para a potência clínica da FLX (49,63,64). Avaliando-se separadamente as vias metabólicas dos isômeros, ressalta-se que os (S)-(+)-isômeros são metabolizados pelo CYP2D6 (52,65,66) e os (R)-(-)-isômeros pelo CYP2D6 e CYP2C9 (61).

Estudo de administração oral em humanos, usando isótopos radioativos de fluoxetina-¹⁴C, demonstrou que este fármaco é altamente metabolizado, sendo 75% da radioatividade excretada na urina e 10% nas fezes, em um período de 30 dias. Cerca de 11% de

fluoxetina¹⁴C foi eliminada em sua forma inalterada, 7% como NorFLX e 7 e 8% foi eliminada na forma conjugada de FLX e NorFLX, respectivamente. Mais que 20% foram excretadas como ácido hipúrico. Extrapolando o período de tempo observado até o infinito, sugere-se que 95% da dose administrada seguem estas vias de metabolização e eliminação (11,45).

1.2.4 Farmacocinética e farmacodinâmica dos enantiômeros da fluoxetina e seu metabólito ativo

A FLX por via oral é bem absorvida quando administrada em jejum. Na presença de alimentos diminui a taxa, mas não a extensão da absorção (11,45,60). No estudo realizado por Bergstrom et al. (1988b)(11) foram administradas, em voluntários sadios, cápsula e solução oral de FLX, ambas em dose única e não encontraram diferenças nas áreas sob as curvas de concentração plasmática *versus* tempo (AUC), concentração plasmática máxima (C_{max}) e tempo da concentração máxima (T_{max}) entre as duas formulações.

Foi observado em estudos com ratos e cães, que a biodisponibilidade da FLX é de 38% (67) e 72% (11), respectivamente, relativamente baixa, possivelmente devido ao seu metabolismo pré-sistêmico. Em humanos não gestantes, o pico da concentração máxima plasmática (C_{max}) de 15 a 55 ng/mL ocorre entre seis a oito horas após administração de dose única de 40 mg de FLX (45), estando 94,5% da concentração biodisponível ligada às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina e α -1-glicoproteína ácida (68). O composto original FLX atinge a concentração no estado de equilíbrio em 23 dias (20,52).

O volume de distribuição (Vd) da FLX é, em média 25 L/Kg, podendo variar de 12 a 42 L/Kg. Este alto valor de Vd e lipossolubilidade, característicos de fármacos que atuam no sistema nervoso central, permitem que altas concentrações de FLX e seu metabólito sejam alcançadas no fluido cerebrospinal. Conseqüentemente, durante a terapia crônica, a concentração plasmática e do fluido cerebrospinal se correlacionam ($r=0,53-0,88$) com uma razão de 0,034 para FLX e 0,017 para NorFLX (68).

Volume de distribuição elevado aliado a um lento processo de eliminação contribuem para uma meia-vida de eliminação longa, sendo de 1 a 6 dias (média 1,9 dias) para a FLX e de 7-15 dias para seu metabólito NorFLX (49,69). Em tratamento crônico, a FLX e seu metabólito NorFLX se acumulam, contribuindo para o aumento progressivo da meia-vida de eliminação para 4 a 5 semanas ou até mais (70).

Comparando-se a administração em doses múltiplas de 60 mg/dia com dose única de 20 mg/dia, observou-se maior concentração plasmática, porém sem relação direta nem com a eficácia do tratamento da depressão nem com os efeitos adversos (45,71). Quando administrada em doses múltiplas em uso crônico, observa-se diminuição do *clearance* de 35,5

para 10,8 L/h, sugerindo que uma ou mais enzimas que metabolizam a FLX saturam devido às suas altas concentrações (45,71).

Dados farmacológicos em relação à disposição cinética da FLX e de seu metabólito ativo, durante a gestação e no período pós-parto, são limitados na literatura (27,44).

1.3 FARMACOCINÉTICA DE DROGAS NA GESTAÇÃO

Durante a gestação, ocorrem diversas modificações fisiológicas no organismo materno que objetivam acomodar o crescimento e desenvolvimento fetal e garantir a própria segurança materna e fetal. Tais mudanças podem afetar direta ou indiretamente a farmacocinética das drogas utilizadas neste período, como a absorção, concentração plasmática máxima, tempo de concentração plasmática máxima da droga, ligação com proteínas plasmáticas, volume de distribuição e o *clearance* das mesmas (72). Algumas dessas mudanças e seus efeitos sob a farmacocinética de drogas são relatadas a seguir.

1.3.1 Aparelho gastrointestinal

No aparelho gastrointestinal, observa-se redução do tônus do esfíncter esofágico, lentidão no esvaziamento gástrico e na motilidade intestinal, principalmente devido à ação da progesterona na atividade do músculo liso (73,74). O crescimento uterino acarreta elevação e rotação do estômago, com aumento da pressão intragástrica e retardo no esvaziamento gástrico.

Alterações fisiológicas maternas induzidas pela gravidez podem afetar também a razão de absorção de drogas administradas via enteral. A redução do trânsito gastrointestinal pode aumentar o tempo (T_{max}) necessário para atingir o (C_{max}) da droga após sua administração e reduzir o nível alcançado, embora os efeitos na disponibilidade total possam ser relativamente menores (75).

1.3.2 Sistema cardiovascular

A associação de aumento da frequência cardíaca materna com a mudança do fluxo sanguíneo regional, principalmente devido à expansão do volume plasmático que inicia pela 6-8 semanas de gestação, atingindo valores máximos entre 32 e 34 semanas de gestação, afeta diretamente a distribuição e eliminação de drogas (76).

Durante a gravidez, em decorrência do aumento da volemia e do líquido extravascular, a água total do corpo chega a aumentar até 8 litros, criando um volume de distribuição (V_d) maior, no qual as drogas hidrofílicas podem distribuir. Em consequência desta diluição aparente, a concentração máxima (C_{max}) das drogas hidrofílicas é reduzida, embora o efeito

clínico deste seja compensado por mudanças nas proteínas-carreadoras. Portanto, mudanças do espaço do fluido extracelular (ECF), total de água corpórea (TBW) e ligação da droga nas proteínas plasmáticas podem afetar o Vd, conforme demonstrado através da seguinte equação: $Vd = ECF + fu(TBW - ECF)$, onde fu significa fração não ligada à proteína plasmática (72).

1.3.3 Composição proteica plasmática

Durante a gestação, ocorre diminuição da concentração plasmática de albumina (77,78). Esta mudança está relacionada ao “efeito de diluição” causado pela expansão do volume plasmático, pela redução da síntese de albumina e/ou pelo aumento no *clearance* da mesma. Outra explicação provável é que ocorra aumento da ligação das proteínas totais, especialmente da α 1-ácido glicoproteína, a muitas drogas básicas (79).

1.3.4 Metabolismo de drogas

O metabolismo hepático das drogas durante a gestação pode estar aumentado, diminuído ou permanecer inalterado, dependendo da droga e de sua via de metabolização, afetando assim o *clearance*.

O nível de estradiol é 100 vezes maior que em mulheres não grávidas (80,81). Por sua vez, a progesterona passa de concentrações de 30-40 ng/mL para níveis de 100-200 ng/mL, durante a gestação (82,83). Estas alterações hormonais podem afetar diretamente o metabolismo de diversas drogas.

Algumas enzimas do sistema CYP são estimuladas pelo estrogênio/progesterona, tendo por resultado taxa metabólica mais elevada e, conseqüentemente, maior velocidade de eliminação de drogas, necessitando aumento de dose administrada para obter efeito farmacológico adequado. Por outro lado, algumas isoenzimas possuem suas funções inibidas ou competidas pela progesterona e/ou pelo estradiol, prejudicando sua eliminação durante a gestação (27,44,53,54).

1.3.5 Excreção renal

O fluxo sanguíneo nos rins aumenta em torno de 50% durante a gestação, com conseqüente aumento das taxas de filtração glomerular (GFR) e do *clearance* de insulina e creatinina. Essa alteração inicia-se a partir da sexta semana de gestação e progride até o início do terceiro trimestre (84), quando começa a declinar até o parto. Por outro lado, o processo de reabsorção tubular parece não se alterar (85).

Como a excreção renal depende diretamente da taxa de filtração glomerular, da secreção tubular ativa e da reabsorção tubular, o aumento da razão de filtração glomerular eleva o *clearance* de drogas de excreção predominantemente renal, podendo ocasionar redução da concentração plasmática de muitos agentes, embora esporadicamente necessite de aumento de dosagem para manutenção do efeito clínico.

1.4 DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS DIFERENTES COMPARTIMENTOS MATERNO E FETAIS

1.4.1 Transferência Placentária

A placenta é um órgão desenvolvido a partir de uma porção de zigoto e contém a mesma carga genética do feto (86). Entre outras funções, atua como uma barreira protegendo o conceito de drogas ou produtos químicos administrados à mãe. Por outro lado, pode também atuar como via transportadora de drogas para tratamento fetal (72).

A pressão arterial materna injeta fluxo sanguíneo pulsátil, através das artérias espiraladas do endométrio, no espaço interviloso, localizado na porção superficial da placenta. A partir daí banha o vilo coriônico e transfere nutrientes, gases e produtos metabólicos para o feto.

A placenta humana é classificada como hemocorial, devido ao contato direto do sangue materno com a membrana coriônica fetal, que determina o que é transferido para o feto, por difusão passiva. Este transporte depende de alguns fatores como massa molecular, solubilidade lipídica, grau de ionização dos componentes da droga e presença ou não de transportadores (72,87).

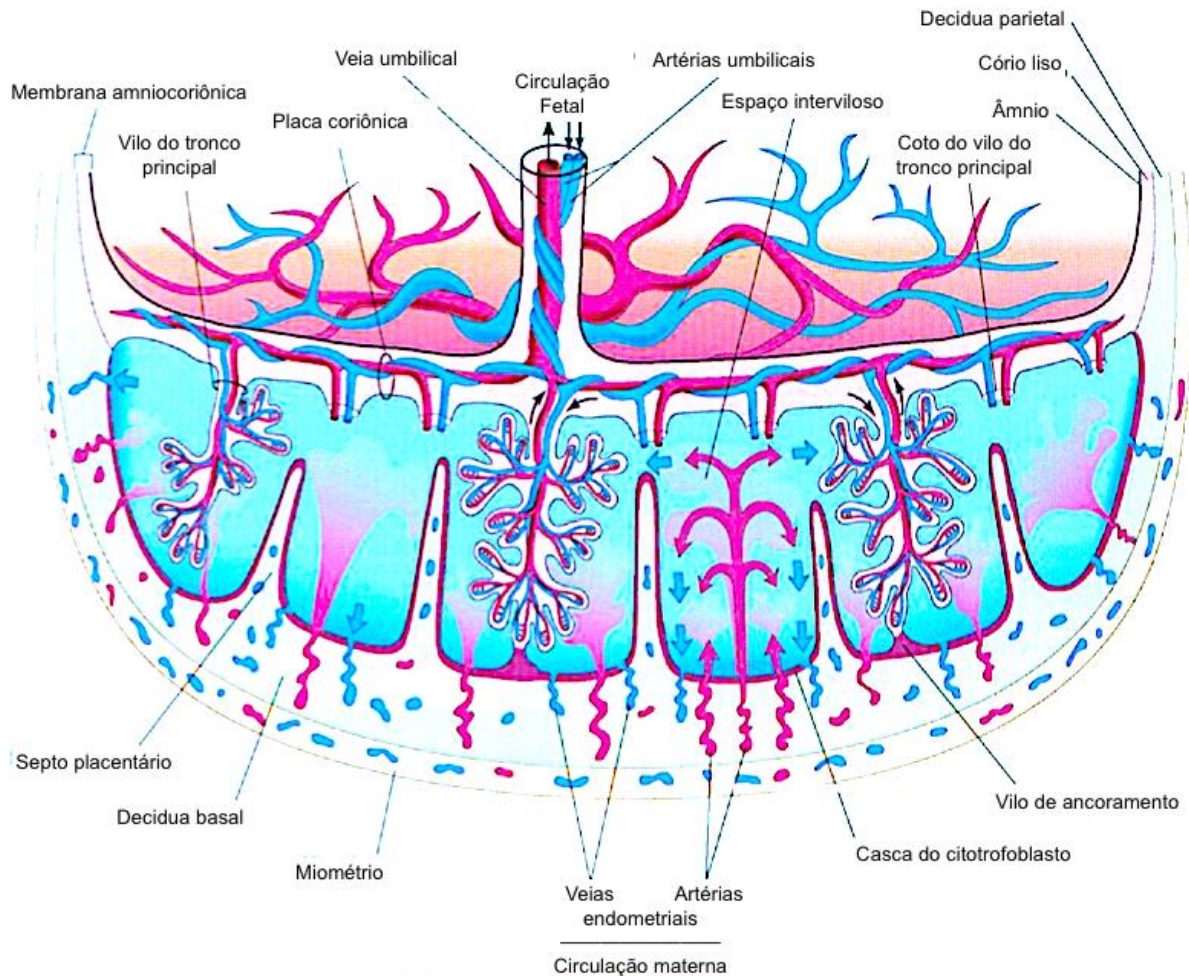


Figura 3. Estrutura esquemática da placenta humana. Mostrando a relação entre vilosidade corial, espaço intervilloso e as artérias espiraladas (Figura adaptada de Callen P.W., *Ultrasonography in obstetrics and Gynecology*, 4th Ed.) (88).

1.4.2 Líquido Amniótico

A extensão da exposição fetal depende das propriedades farmacocinéticas materna e da transferência placentária do fármaco. As principais vias de exposição fetal são através da circulação umbilical e do líquido amniótico (89,90).

A composição do líquido amniótico (LA) altera durante a gestação e de acordo com as trocas feto-materna. No início da gestação o LA é basicamente um ultrafiltrado de soro materno, com a evolução da gestação a urina fetal passa a ser o principal componente do LA. Por volta da 16 semana de gestação o feto engole aproximadamente 7mL/dia deste líquido, aumentando com as semanas de gestação, atingindo até o parto, um volume de no máximo 210-760 mL/dia (89,90).

1.4.3 Leite materno

Durante a amamentação, as mães alimentam seus recém-nascidos com leite composto por carboidratos complexos e proteínas, nutrientes específicos para o metabolismo do recém-nascido, que auxiliam no desenvolvimento do sistema imune e microbiota intestinal. Além de favorecer o vínculo feto-mãe, o aleitamento materno é muito importante para o desenvolvimento cognitivo e emocional da criança (91). Além disso, o aleitamento materno reduz a taxa de mortalidade infantil, protegendo as crianças de infecções respiratórias e gastrointestinais nos primeiros anos de vida (92–94).

O leite materno é composto por 87% água, macro e micronutrientes, entre eles os oligossacarídeos (HMOs), terceiro componente mais abundante, livre e conjugado com proteínas trazem inúmeros benefícios para o lactente. Sendo considerado essencial para o desenvolvimento dos bebês principalmente em seus primeiros meses de vida.

Avaliando-se os trabalhos descritos na literatura e conhecendo-se a elevada frequência de quadros depressivos durante o ciclo gravídico-puerperal, torna-se evidente a necessidade do estudo da farmacocinética dos fármacos antidepressivos utilizados em gestantes, no intuito de preencher esta lacuna de conhecimento.

Considerando-se o diagnóstico de depressão, associado ao fato de a gestação influenciar os sistemas enzimáticos e, conseqüentemente, sobre a farmacocinética de algumas drogas, a relevância da investigação dos parâmetros farmacocinéticos de drogas antidepressivas e de seus metabólitos em gestantes é indiscutível.

3. Objetivos

3.1 GERAL

Avaliar a farmacocinética, distribuição transplacentária e metabolismo enantiosseletivo da FLX e de seu principal metabólito ativo NorFLX em gestantes.

3.2 ESPECÍFICOS

- Descrever os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da FLX e da NorFLX em gestantes sem comorbidades.
- Avaliar a taxa de transferência placentária dos enantiômeros da FLX e da NorFLX em gestantes sem comorbidades.
- Analisar a influência das alterações fisiopatológicas decorrentes da gestação sobre os parâmetros farmacocinéticos e sobre a transferência placentária dos enantiômeros da FLX e de seu metabólito ativo.
- Avaliar a excreção fetal dos enantiômeros da FLX e da NorFLX em líquido amniótico.
- Avaliar a excreção materna e fetal da FLX e da NorFLX em leite materno.

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Aspectos éticos do projeto

O projeto de pesquisa “Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes portadoras de diabetes *mellitus* gestacional” foi cadastrado, analisado e APROVADO pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da mesma instituição - DGO-HCFMRP-USP (Anexo A). Também foi submetido, analisado e APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em sua 357ª Reunião Ordinária realizada em 03/12/2012, processo HCRP nº 14806/2012 (Anexo B).

Ressalta-se que esta pesquisa não interferiu na conduta obstétrica adotada para as pacientes selecionadas, sendo que a evolução da mesma seguiu os protocolos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (DGO-HCFMRP-USP).

Todas as pacientes que aceitaram participar desta pesquisa foram informadas, de forma clara e objetiva, com palavras simples, sobre os protocolos executados, dando-se seguimento aos mesmos apenas com a anuência espontânea da paciente. Foram obtidos os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) de todas as pacientes que participaram do estudo no momento da internação hospitalar. Foi garantida a liberdade dos sujeitos da pesquisa em recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

4.1.2 Seleção de pacientes

A casuística foi composta por nove gestantes sem comorbidades maternas e fetais que influenciem na farmacocinética e transferência placentária de drogas e que estejam em seguimento no Ambulatório de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP. A seleção foi aleatória e sem randomização. As gestantes não foram pareadas, mas com características semelhantes. O momento, a indicação e a via da resolução da gravidez foram determinados de acordo com os protocolos assistenciais do DGO-HCFMRP-USP.

4.1.3 Cálculo amostral

O estudo foi planejado através da comparação da variável contínua *Clearance* aparente entre pares de sujeitos, segundo estimativa feita com o auxílio do Software *Power and Sample Size Calculation Program*®. Dados de literatura indicam que a diferença desta

variável é considerada como distribuição normal com um desvio padrão 222,69. Se a real diferença na média de pares combinados for de 243,92 (diferença esperada entre as médias do *Clearance* aparente de 50%), teremos de estudar nove pares de indivíduos para ser capaz de rejeitar a hipótese zero, com poder de teste de 0,8. A probabilidade do Erro Tipo I associado a esta hipótese é de 0,05 (Figura 4).

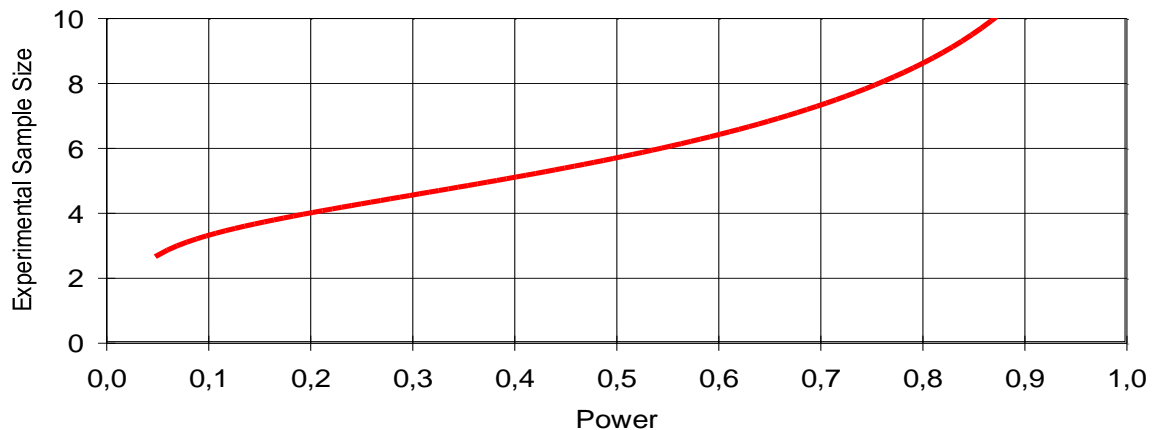


Figura 4. Cálculo amostral.

4.1.4 Critérios

4.1.4.1 Critérios de inclusão

- Gestantes que estejam em seguimento no Ambulatório de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP;
- Gravidez única no terceiro trimestre;

4.1.4.2 Critérios de exclusão

- Resolução de parto decorrente de urgência / emergência obstétrica;
- Presença de doenças maternas que influenciem na farmacocinética de fármacos;
- Uso crônico de medicação (exceto polivitamínicos);
- Alteração nos exames subsidiários do pré-natal;

4.1.4.3 Critério de descontinuidade

- Pacientes que desistiram de sua participação ao longo do estudo.
- Gestantes que necessitaram receber medicamentos que poderiam interferir na farmacocinética da FLX.

4.1.5 Tipo de estudo

Estudo observacional, descritivo, longitudinal.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Dados epidemiológicos

Os dados foram coletados em protocolo padrão, avaliando os seguintes parâmetros: idade, hábitos de vida, uso de medicamentos, dados antropométricos, paridade, idade gestacional, resultados laboratoriais dos exames pré-natais e informações ultrassonográficas sobre alterações fetais e/ou placentárias.

Para a avaliação antropométrica foram obtidos os seguintes parâmetros:

- Peso corporal (quilogramas);
- Estatura (metros);
- Índice de massa corporal (Kg/m²).

O peso corporal foi obtido através da utilização de balança eletrônica, do tipo plataforma com precisão de 100 gramas, tarada previamente à medição. As gestantes foram pesadas, sem sapatos e utilizando roupas leves.

A altura foi determinada com auxílio de uma haste vertical, graduada a cada 0,5 centímetros, fixada à balança supracitada.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Estatura}^2 \text{ (m}^2\text{)}}$$

Este índice, pela relação entre peso e altura, fornece dados mais precisos de alterações da massa corporal. Os valores considerados normais do IMC, para o período não gestacional, são de 19 a 24 kg/m² para mulheres (95). A avaliação do estado nutricional da gestante através do IMC utilizará a Curva de Atalah (96), a qual foi padronizada para a população chilena, considerando o IMC e a idade gestacional. Este autor classificou o estado nutricional nas categorias descritas a seguir:

- Baixo Peso (BP): IMC ≤ aos valores expostos na faixa correspondente a baixo peso;
- Adequado (A): IMC estiver compreendido na faixa de valores expostos na coluna correspondente a adequado;
- Sobrepeso (SP): IMC estiver compreendido na faixa de valores expostos na coluna correspondente a sobrepeso;
- Obesidade (O): IMC ≥ aos valores expostos na coluna correspondente a obesidade.

A função de filtração glomerular foi avaliada pelo cálculo do *clearance* de creatinina, estimado pela fórmula proposta por Cockcroft e Gault (1976)(97):

$$CCr = \frac{(140 - \text{idade})(\text{peso})}{72 \times \text{Creatinina}}$$

A idade foi calculada em anos, o peso em quilogramas e a creatinina em miligramas por decilitro. Para pacientes do gênero feminino, o valor calculado do *clearance* de creatinina deve ser reduzido em 15%.

Foram obtidas ainda as indicações de resolução da gravidez por parto via vaginal e/ou cesárea, as alterações macroscópicas placentárias e os dados de sexo, peso, estatura e Índice de Apgar referentes aos recém-nascidos.

4.2.2 Coleta de amostras biológicas

As pacientes selecionadas e que concordaram em participar do estudo receberam a administração de dose única oral de 20 mg de fluoxetina em duas ocasiões distintas. O primeiro momento ocorreu no início no 3º trimestre de gestação (a partir de 32 semanas de idade gestacional) e o segundo, no dia do parto.

Na primeira ocasião, as pacientes foram internadas na Unidade de Pesquisa Clínica para a coleta das primeiras 12 horas após de administração do fármaco. As coletas de amostras sanguíneas posteriores foram realizadas durante os retornos de pré-natal realizados pelas pacientes, evitando-se alterar a rotina diária das gestantes.

Antes da administração do fármaco, foi coletada uma amostra de sangue materno (5 mL) por punção única de veia periférica, para avaliação de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, glicemia, funções renal e hepática, albumina, proteínas totais e α 1glicoproteína ácida. Justifica-se a realização desses exames pela influência dos respectivos órgãos/sistemas avaliados na farmacocinética da FLX e seu metabólito ativo.

O acesso venoso foi mantido com escalpe salinizado para a coleta das amostras sanguíneas nas primeiras 12 horas pós-administração de 20 mg de fluoxetina via oral. Amostras seriadas de 10 mL de sangue materno foram coletadas para avaliação da concentração dos enantiômeros da FLX e NorFLX nos tempos de zero, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 e 672 horas, para posterior realização de curva de concentração plasmática em função do tempo e determinação das curvas de absorção, distribuição e eliminação do fármaco.

No dia da resolução da gestação, foi administrada nova dose de 20 mg de fluoxetina via oral, sendo realizada coleta de uma amostra sanguínea materna no momento do nascimento e de sangue de vasos umbilicais e espaço intervilo, além de amostra de líquido amniótico (LA) para avaliação de transferência placentária do fármaco.

Vinte e quatro horas após o parto, foi coletada uma amostra de 3 mL de leite materno por ordenha mamária, para avaliação de excreção do fármaco por esta via.

4.2.3 Sistema de coleta da transferência placentária e excreção fetal

Após o nascimento da criança, amostras do sangue de artéria umbilical, veia umbilical, LA e de espaço intervilo, segundo técnica descrita por Camelo Jr et al. (1995)(98), foram coletadas em seringa não heparinizada, para determinar as concentrações dos enantiômeros da FLX e analisar a taxa de transferência placentária do fármaco.

Vinte e quatro horas após o parto, foi coletada uma amostra de 3 mL de leite materno por ordenha mamária em recipientes apropriados.

Após o material coletado, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2800 g por 10 minutos e coletados os plasmas de cada uma. Os plasmas foram armazenados em tubo seco de plástico e congelados sob temperatura de -70 °C, sendo posteriormente encaminhados ao laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para dosagem da concentração plasmática dos enantiômeros da FLX e NorFLX.

4.2.4 Desenvolvimento do método de análise para determinação dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico

4.2.4.1 Reagentes

O cloridrato de fluoxetina (98% TRC, Toronto, Canadá), norfluoxetina (TRC, Toronto, Canadá) e o tartarato de metoprolol (97%, Sigma, St. Louis, MO, USA), foram obtidos como mistura racêmica e os enantiômeros, (S)-(+)-fluoxetina e (S)-(+)-norfluoxetina (TRC, Toronto, Canadá) foram obtidos separados. Os solventes, etanol (Panreac, Barcelona, Espanha), hexano (Panreac, Barcelona, Espanha), álcool isoamílico (Fisher Scientific), e metanol (Panreac, JT Baker, Xalostoc, Mexico) foram obtidos como grau HPLC. O acetato de amônio e o hidróxido de sódio (JT Baker, Xalostoc, Mexico) foram obtidos como grau analítico.

4.2.4.2 Solução padrão

A solução estoque FLX e NorFLX foram preparadas na concentração de 1mg para cada enantiômero por mL de metanol e posteriormente diluída nas concentrações de 0,2 a 400 ng para cada enantiômero de FLX e NorFLX por mL de metanol. A solução de metoprolol, usada como padrão interno (PI), foi preparada na concentração de 0,4 µg/mL de metanol e

posteriormente diluída em uma concentração de 8 ng/mL de metanol. Todas essas soluções foram estocadas a -20°C.

4.2.4.3 *Análise cromatográfica*

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) foi composto por bomba gradiente binária Waters 1525 μ , injetor automático 2777, forno de coluna TCM/CHM e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S, todos da Waters (Milford, EUA) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo. As temperaturas da fonte de dessolvatação foram mantidas a 150 e 350°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 900 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $1,68 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 25 V para os enantiômeros da FLX, NorFLX e para o PI. A energia de colisão foi de 7 eV para os enantiômeros da FLX e 3 eV para os enantiômeros da NorFLX. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão preparadas na fase móvel, na vazão de 10 mL/min.

As determinações foram executadas no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 310>44 para os enantiômeros da FLX, 296>134 para os enantiômeros da NorFLX e 268>116 para o PI. A aquisição e a quantificação dos dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido) também usado para registrar e integrar os picos.

A separação dos enantiômeros da FLX e NorFLX ocorreram em coluna *Astec Chirobiotic*® V 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m (Supelco, Bellefonte, PA), com uma pré-coluna *CN Lichosphe*® 100 4 x 4 mm e partículas de 5 μ m, (Merck, Darmstadt, Germany). A coluna foi mantida a 23°C. A fase móvel consistiu de etanol: acetato de amônio 15 mM (85:15 v/v), eluindo a um fluxo de 0,8 mL/min.

4.2.4.4 *Preparo das amostras*

A extração líquido-líquido ocorreu em tubos falcon plástico utilizando-se 500 μ L de plasma ou 1000 μ L, enriquecido com 25 μ L da solução de metoprolol 8 ng/mL(PI), 200 μ L de solução aquosa de NaOH 2M e 6 mL de hexano: álcool isoamílico (99:1 v/v). Após 30 min. de agitação horizontal (\pm 300 ciclos/min.) e 20 min. de centrifugação a 2800g, o extrato orgânico foi transferido para um tubo falcon plástico e concentrado até a secura. O resíduo foi reconstituído em 90 μ L de etanol: acetato de amônio 15mM (85:15 v/v), do qual 50 μ L foram injetados para análise cromatográfica.

4.2.4.5 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina

Ordem de eluição dos enantiômeros ((S)-(+)-FLX) e ((S)-(+)-NorFLX). Alíquotas de 25 µl das soluções padrão de (S)-(+)-FLX e (S)-(+)-NorFLX em metanol nas concentrações de 50 ng/mL, foram evaporadas a secura, reconstituída com fase móvel e submetidas a análise, conforme anteriormente descrito.

A ordem de eluição foi determinada comparando os tempos de eluição observados das soluções padrão dos enantiômeros (S)-(+)-FLX e (S)-(+)-NorFLX, separadamente, com soluções padrão da curva, na maior concentração, contendo os enantiômeros (S)-(+)-FLX e (R)-(-)-FLX e (S)-(+)-NorFLX e (R)-(-)-NorFLX, submetidas as mesmas condições de análise. Assim, comparando os tempos de eluição de ambos cromatogramas, pode-se determinar que os enantiômeros (S)-(+)-FLX e (S)-(+)-NorFLX eluem primeiro.

4.2.5 Validação dos métodos de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico

Os métodos foram desenvolvidos e validados em plasma e LA humano, com aplicação em estudo de disposição cinética e transferência placentária de dose única de 20 mg fluoxetina racêmica em nove parturientes, baseando-se no estudo do grupo Cardoso et al. (2012)(99), relativo a análise dos enantiômeros da fluoxetina, em plasma de ratos.

Foram avaliados os parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade e foram validados de acordo com as normas da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 para métodos bioanalíticos. (100).

4.2.5.1 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se amostras de 500 µL de plasma ou 1000 µL de LA, o plasma de oito originários voluntários diferentes, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas e para o líquido amniótico foram avaliadas seis amostras oriundas de parturientes diferentes. Os plasmas e LA brancos foram processados de acordo com o procedimento de extração descrito no item 4.2.4.4. O PI, a FLX e a NorFLX foram acrescentados após o processamento, nas mesmas concentrações das amostras de CQB (Controle de Qualidade de Baixa concentração) FLX e NorFLX 0,1 e 0,2 ng, respectivamente, de cada enantiômero/mL plasma e 0,02 e 0,1 ng, respectivamente, de cada enantiômero/mL de líquido amniótico) e CQA (Controle de Qualidade de Alta concentração) FLX e NorFLX 16 ng de cada enantiômero /mL de plasma e 8 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico.

O fator matriz normalizado (FMN) pelo PI foi calculado para cada amostra dividindo-se a razão área do pico do analito/área do pico do PI na presença e ausência da matriz.

O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos as amostras CQB e CQA devem ser inferior a 15%.

4.2.5.2 Linearidade

A linearidade de cada método de análise da FLX e NorFLX em plasma humano e LA foram avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (contendo apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 500 µL de plasma ou 1000 µL de líquido amniótico branco enriquecidas com 25 µL de solução padrão de FLX e NorFLX. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito no item 4.2.4.4.

As curvas analíticas para a FLX foram construídas nas concentrações 0,04; 0,1; 0,2; 0,4; 1; 4; 10 e 20 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2; 5 e 10 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. As curvas analíticas para a NorFLX foram construídas nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 1; 4; 10; e 20 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2; 5 e 10 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. Para aprovação das curvas analíticas, os padrões de calibração apresentaram um desvio de até 15% e o limite inferior de quantificação um desvio de até 20%. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

4.2.5.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas. As soluções foram preparadas nas concentrações de 0,04 ng para cada enantiômero/mL plasma e 0,005 ng para cada enantiômero/mL líquido amniótico da FLX e 0,1 ng para cada enantiômero/mL plasma e 0,05 ng para cada enantiômero/mL líquido amniótico da NorFLX (Limite Inferior de Quantificação – LIQ); 0,1 ng para cada enantiômero/mL plasma e 0,02 ng para cada enantiômero/mL líquido amniótico da FLX e 0,2 ng para cada enantiômero/mL plasma e 0,1 ng para cada enantiômero/mL líquido amniótico da NorFLX CQB; 5 ng para cada enantiômero/mL plasma e 4 ng para cada enantiômero/mL líquido amniótico da FLX e NorFLX respectivamente (Controle de Qualidade de Média Concentração - CQM); 16 ng para cada enantiômero/mL plasma e 8 ng para cada enantiômero/mL líquido amniótico da FLX e NorFLX respectivamente CQA e 80 (1:5) ng para cada enantiômero/mL plasma e 20 ng (1:20) para cada enantiômero/mL líquido amniótico da FLX e NorFLX (Controle de Qualidade de Diluição - CQD). Todas as soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise, sendo que o primeiro dia de análise ocorreu no mesmo dia da preparação das soluções.

Para avaliar a precisão e exatidão intracorrída foram analisadas cinco replicatas destas soluções através de uma única corrida analítica. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas cinco replicatas de cada uma das soluções durante três diferentes corridas.

A avaliação da precisão intra e intercorrida foram realizadas através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido como preciso, o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%, exceto para o LIQ, CV de até 20%. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de 20% do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

4.2.5.4 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades após três ciclos de congelamento e descongelamento, de curta duração e pós-processamento.

Para a avaliação da estabilidade foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com FLX e NorFLX nas concentrações CQB e CQA para plasma e líquido amniótico humano.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -70°C por 24 horas, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 horas, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 12°C por um período de 24 horas, sendo então, injetadas para análise cromatográfica.

Para a análise da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas em temperatura ambiente (23°C) por duas horas. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

Todos os resultados foram comparados com aqueles obtidos após a análise das amostras recém-preparadas e foram expressos em porcentagem de desvio e não ultrapassaram 15%.

4.2.6 Desenvolvimento do método de análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno

Método desenvolvido, validado e aplicado no Separare - Núcleo de Pesquisa em Cromatografia - Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela Dra Bianca Rebelo Lopes Simões sob supervisão da Profa Dra Quesia Bezerra Cass.

4.2.6.1 Generalidades

Todos os solventes orgânicos, grau HPLC, foram adquiridos da Mallinckrodt Baker (St Louis, EUA). A água usada para a fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). O padrão de FLX foi doado pelo Instituto de Vita Nova (Hortolândia, Brasil) e NorFLX foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções estoque padrão foram armazenadas a -20°C .

4.2.6.2 Desenvolvimento do método - Sistema 2D LC-MS/MS

Sistema cromatográfico de ultra eficiência Waters ACQUITY UPLC (Milford, USA) composto por uma bomba binária (BSM), uma quaternária (QSM), com injetor automático Waters 2777C e sistema de válvulas comutadoras de seis caminhos especialmente configuradas para extração *on-line* (duas válvulas Everflow® sendo uma para injeção e outra para acoplamento das duas dimensões) acoplado a um espectrômetro de massa modelo Xevo TQ-MS (Waters, Milford, USA) com ionização por *electrospray* (ESI) operando no modo positivo para análise da FLX e NorFLX.

Para a otimização das condições de ionização soluções aquosas, individuais de cada composto (100 ng/mL), foram infundidas no sistema no modo *combined* com vazão de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ de ACN:água (70:30 v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ da bomba seringa contendo as soluções aquosas. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 2,5 kV; voltagem do cone: 15 V; temperatura de dessolvatação: 400°C ; vazão do gás de dessolvatação: 600 L/h. As energias de colisão (EC) e voltagem do cone para cada um dos compostos foram otimizadas através do software MassLynx com a ferramenta de ajuste automático IntelliStart. O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM) e duas transições de cada analito foram selecionadas para quantificação e confirmação, $310,2 > 44,0$ (cone 12 V; EC = 10 eV) e $310,2 > 148,1$ (cone 18 V; EC = 8 eV) para FLX; $296,2 > 134,1$ (cone 12 V; EC = 6 eV) e $296,2 > 29,9$ (cone 12 V; EC = 6 eV) para NorFLX.

A coluna RAM-BSA C₁₈ foi usada na primeira dimensão do sistema cromatográfico com a finalidade de excluir as macromoléculas da matriz e fazer a pré concentração dos analitos. Para análise de FLX e NorFLX na segunda dimensão foi utilizada uma coluna Cortecs C₁₈₊ (2,7 µm, 2,1 x 100 mm).

4.2.6.3 Condições de ionização dos analitos

Tabela 2. Condições ideais de ionização e fragmentação obtidas para fluoxetina e norfluoxetina

Parâmetros de ionização (FLX e NorFLX)		Parâmetros de fragmentação					
		Composto	Íon precursor (m/z) [M+H] ⁺	Transição SRM (m/z)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)	Dwell (s)
Voltagem do capilar (kV)	2,50	FLX	310,1	44,0	12	10	0,5
Temperatura de dessolvatação (°C)	400		310,1	148,1	18	8	
Vazão do gás de dessolvatação (L/h)	600	NorFLX	296,1	29,9	12	6	0,5
Vazão do gás de colisão (mL/min)	0,15		296,1	134,1	12	6	

4.2.6.4 Condições de análise

O estudo de retenção dos analitos em função do pH não foi realizado neste trabalho, mesmo se tratando do modo reverso de eluição pois, FLX e NorFLX, têm pKas em torno de 9,5 e a faixa de pH permitida para uso nas colunas com suporte de sílica é de três a oito. A retenção dos compostos nas condições de exclusão das proteínas e a fase móvel de transferência foram avaliadas simultaneamente.

Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 4	água/ACN	95:5	Exclusão proteica
4 – 7	ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8)	55:45	Eluição dos analitos
7 – 9	ACN/água/isopropanol	75:10:15	Limpeza da RAM-BSA
9 – 12	água/ACN	95:5	Condicionamento da RAM-BSA

*vazão de 400 µL e volume de injeção de 20 µL.

Coluna analítica: ACN/tampão acetato de amônio (10 mM, pH 5,8) 65:35

4.2.6.5 Preparo das soluções de trabalho

Soluções estoque de FLX (15,0 µg/mL) e NorFLX (20,0 µg/mL) foram preparadas em ACN. Para as soluções de calibração e de controle de qualidade (CQ), 10 soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque, nas seguintes concentrações de calibração: 0,150; 0,750; 1,50; 2,25; 4,50; 6,75 e 7,50 µg/mL para o FLX e 0,200; 1,00; 2,00; 3,00; 6,00; 9,00 e 10,0 µg/mL para NorFLX; e amostras CQ: 0,300; 3,00 e 6,00 µg/mL para FLX e 0,400; 4,00 e 8,00 µg/mL para NorFLX. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C.

As concentrações das soluções de CQ foram definidas de acordo com o guia de validação de métodos bioanalíticos recentemente publicado pela *European Medicines Agency* (EMA)(101), onde CQ baixo deve ser de até três vezes o valor da concentração mais baixa da curva de calibração (LOQ), CQ médio deve estar entre 40 – 60% da concentração mais alta da curva de calibração e CQ alto encontra-se entre 75 – 95% da concentração mais alta da curva de calibração.

4.2.6.6 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras fortificadas alíquotas de 12,3 µL da solução de trabalho foram adicionadas a 200 µL de água ultrapura e 250 µL de colostro. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, mantidas em repouso por 10 min a temperatura ambiente, para que os analitos atingissem um estado de equilíbrio com os componentes da matriz, e em seguida foram acrescentados 150 µL de ACN, para precipitação parcial das proteínas e oligossacarídeos presentes no colostro, e 5,00 µL ácido fórmico, para melhorar a resposta do sinal. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm, 4°C por 15 min, resultando em uma camada fina de gordura, uma camada aquosa intermediária e um pequeno precipitado no fundo do tubo. Após este procedimento 200 µL da fração intermediária foram

transferidos para os vials e destes 10 µL foram injetados no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS. As amostras de calibração foram preparadas em triplicata enquanto as amostras CQ foram preparadas em quintuplicata.

4.2.7 Validação do método de análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno

A validação do método foi realizada de acordo com os critérios internacionalmente aceitos (102), considerando a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, recuperação, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), efeito de matriz.

A seletividade do método foi assegurada pela análise individual de amostras de colostro e leite materno branco e ambos fortificados com FLX e NorFLX.

Os LOD e LOQ foram determinados utilizando-se amostras de leite fortificado preparadas em triplicata. Foi considerado como LOD como sendo o mínimo de analito detectável com a relação sinal-ruído (S/N) de três. O LOQ foi considerado nível mais baixo de calibração e o critério aceito para sua determinação foi um CV entre 15 e 20%, entre as replicatas.

Para determinar a linearidade, seis amostras de colostro branco foram fortificadas em triplicata em sete níveis de concentração (3,0; 15,0; 30,0; 45,0; 90,0; 135 e 150 ng/mL para o FLX; 4,00; 20,0; 40,0; 60,0; 120; 180 e 200 ng/mL para NorFLX) e analisados.

Precisão e exatidão intra e inter lotes foram avaliadas em três lotes, utilizando-se as amostras de CQ (6,00; 60,0 e 120 ng/mL para FLX; 8,00; 80,0 e 160 ng/mL para NorFLX) preparadas em quintuplicata. A precisão foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) entre as replicatas. A exatidão do método, expressa em porcentagem, foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas para as replicatas e o valor das concentrações nominais.

A eficiência do processo de extração (recuperação) foi calculada através da comparação entre as áreas da banda cromatográfica das amostras de CQ baixo e alto, preparadas em água (100%) e em colostro.

O efeito de matriz foi avaliado apenas por extração *on-line* utilizando-se o método descrito no guia de validação da EMA (101). Neste procedimento oito amostras de indivíduos diferentes e em períodos de lactação distintos foram fortificadas nas concentrações estabelecidas para os CQ baixo e CQ alto. O efeito de matriz foi calculado através do coeficiente de variação (CV%) entre as áreas dos analitos nas amostras injetadas.

4.2.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de amostras de colostro livre dos analitos (leite branco), com análises da matriz biológica fortificada com os analitos.

4.2.7.2 Efeito de matriz

Como dito anteriormente, proteínas, lipídios e oligossacarídeos são componentes do leite materno que podem interferir tanto na extração dos analitos da matriz quanto na detecção dos mesmos. Além disso, existe o inconveniente da fonte de ionização sofrer um impacto negativo gerado pelo efeito de matriz. Devido à falta de protocolos estabelecidos para a eliminação ou redução deste problema, o efeito de matriz é sempre avaliado durante o desenvolvimento de métodos quantitativos que envolvem detecção por MS/MS (103).

Métodos para avaliar o efeito de matriz em sistemas com extração *on-line* não são preconizados pelos guias de validação. Apenas recentemente a *European Medicines Agency* preconizou que “... para o caso de preparo de amostras *on-line*, a variabilidade da resposta entre os lotes deve ser avaliado pela análise de seis lotes de matriz fortificada nos níveis de concentração dos controles baixo e alto. O coeficiente de variação total deve ser $\leq 15\%$ ” (104). Assim, neste estudo o efeito de matriz foi avaliado nos níveis de concentração das amostras de CQ baixo e CQ alto, fortificando-se amostras de colostro e leite materno brancos coletadas de nove indivíduos, sendo três nutrízes no período de cinco dias pós-parto, três nutrízes no período entre 20 e 60 dias pós parto e três nutrízes no período entre cinco e sete meses pós-parto, e calculando-se o CV entre as amostras.

4.2.7.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através das curvas de calibração construídas para FLX e NorFLX. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foi próxima a 15%, e a exatidão apresentou um desvio próximo de 15% do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação, onde o desvio encontrado foi de 15-20%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios de aceitação de métodos em fluidos biológicos (104).

4.2.7.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão intra-lote e inter-lotes foram avaliadas analisando-se as quintuplicatas dos três controles de qualidade, em um mesmo lote e em lotes diferentes. A exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na

curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as concentrações nominais e as quantificadas (101–103,105).

4.2.8 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo. Esses dados foram avaliados considerando modelo bicompartimental para a FLX e monocompartimental para a NorFLX, sem *lag time* e cinética de primeira ordem, empregando o programa Phoenix™ WinNonlin®, versão 6.3.0.393 (Pharsight, Certara L.P.).

A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, ($AUC^{0-\infty}$), foi determinada através do método dos trapezoides. O *clearance* total aparente (Cl/f) foi calculado através da equação $Cl/f = Dose / AUC^{0-\infty}$. O volume de distribuição aparente (Vd/f) foi determinado pela equação padrão do *software* (GABRIELSSON & WEINER, 2000). A concentração plasmática máxima (C_{max}), bem como o tempo para atingir essa concentração (T_{max}) foram determinados diretamente dos valores obtidos das concentrações plasmáticas.

4.2.9 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism® para obtenção da mediana, média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para a avaliação das razões isoméricas diferentes da unidade foi empregado o teste de Wilcoxon bicaudal para dados pareados. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

5.1 CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA

Foram investigadas nove gestantes. Os dados demográficos das gestantes investigadas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados clínicos das gestantes

Parâmetros	Unidade	9 Gestantes
Idade	anos	30,50 (22,5 – 35,5)
Idade gestacional	dias	236,50 (224,75 – 243,5)
Peso	kg	72,65 (68,67 – 76,4)
Estatura	m	1,60 (1,54 - 1,67)
IMC	kg/m ²	29,00 (25,00 - 32,00)

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75. IMC: Índice de Massa Corporal

Todas as pacientes realizaram pré-natal de maneira satisfatória, segundo critérios do Ministério da Saúde. A avaliação laboratorial de pré-natal foi considerada dentro dos padrões da normalidade.

Todas apresentaram sorologias negativas para o Vírus da Imunodeficiência Humana (anti-HIV I e II), para o vírus da Hepatite B (HBsAg), vírus da Hepatite C (anti-HCV) e para Sífilis (VDRL). Os resultados obtidos foram considerados dentro dos padrões de normalidade em sua maioria.

Foram realizados exames laboratoriais para a avaliação da normalidade funcional dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino, pela influência dos mesmos na farmacocinética de enantiômeros FLX e NorFLX.

Os valores dos referidos exames estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Dados Bioquímicos das gestantes investigadas

Parâmetros	Valor de referência	Gestantes (n=9)
Uréia (mg/dL)	10-50	12 (10,0 - 13,7)
Creatinina (mg/dL)	0,7-1,5	0,6 (0,6 - 0,7)
Alanino aminotransferase (U/L)	30-65	25,5 (23 - 27,75)
Aspartato aminotransferase (U/L)	15-37	20 (17 - 23)
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2-1,2	0,3 (0,3 - 0,4)
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,0-0,3	0,03 (0,02 - 0,05)
Proteínas totais (g/dL)	6,4-8,2	6,3 (6,0 - 6,6)
Albumina (g/dL)	3,5-5,0	2,7 (2,6 - 2,9)
α1 glicoproteína ácida (mg/dL)	50-120	44,0 (38,9 - 53,3)
Gamaglutamiltransferase (U/L)	5-85	17,5 (15,2 - 20,7)
Fosfatase alcalina (U/L)	50-136	216,5 (178,2 - 248,2)
Hemoglobina (g/dL)	12-16	10,5 (10,1 - 10,8)
Hematócrito (%)	37-47	31,5 (29,2 - 32,7)
Plaquetas ($10^3/\mu$L)	150-450	207,5 (196,5 - 245,5)
Hemoglobina glicosilada (%)	<6,3	4,7 (4,2 - 4,9)

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

Nenhum recém-nascido apresentou doenças diagnosticadas ao nascer. A mediana de peso ao nascer foi de 3220 g e a de estatura foi de 49,50 cm.

Todos os recém-nascidos apresentaram Índice de Apgar maior que sete no 1º minuto e 5º minuto, caracterizando bem estar ao nascer. Todos os recém-nascidos apresentaram evolução favorável no período pós-natal e receberam alta hospitalar no mesmo momento da alta materna.

Os dados das placentas das pacientes e as características de seus respectivos recém-nascidos estão demonstrado na Tabela 6. Nenhuma das placentas apresentou alterações macroscópicas relevantes.

Tabela 6. Dados clínicos referentes à resolução da gestação

Parâmetros	Unidade	Gestantes (n=9)
Peso do recém-nascido	g	3220 (3180 – 3305)
Estatura do recém-nascido	cm	49,50 (48 - 50)
Peso da placenta	g	500 (430 - 600)

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

Durante as 12 horas de internação na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC), para coleta de amostras seriadas de sangue, os parâmetros hemodinâmicos das gestantes foram monitorados através do registro da pressão arterial sistólica e diastólica de quatro em quatro horas. Todas as pacientes realizaram o exame de cardiotocografia, para monitorar a frequência cardíaca fetal. Todos os fetos encontraram-se ativos e reativos.

5.2 ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA

5.2.1 Análise dos métodos em plasma e líquido amniótico

A Figura 5 apresenta os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produto monitorados nas transições $310 > 44$ para os enantiômeros da FLX e a Figura 6 apresenta os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produto monitorados nas transições $296 > 134$ para os enantiômeros da NorFLX. A Figura 7 apresenta a ordem de eluição dos enantiômeros da FLX NorFLX e a Figura 8 estão cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros em plasma e líquido amniótico humano, dos fármacos acima citado.

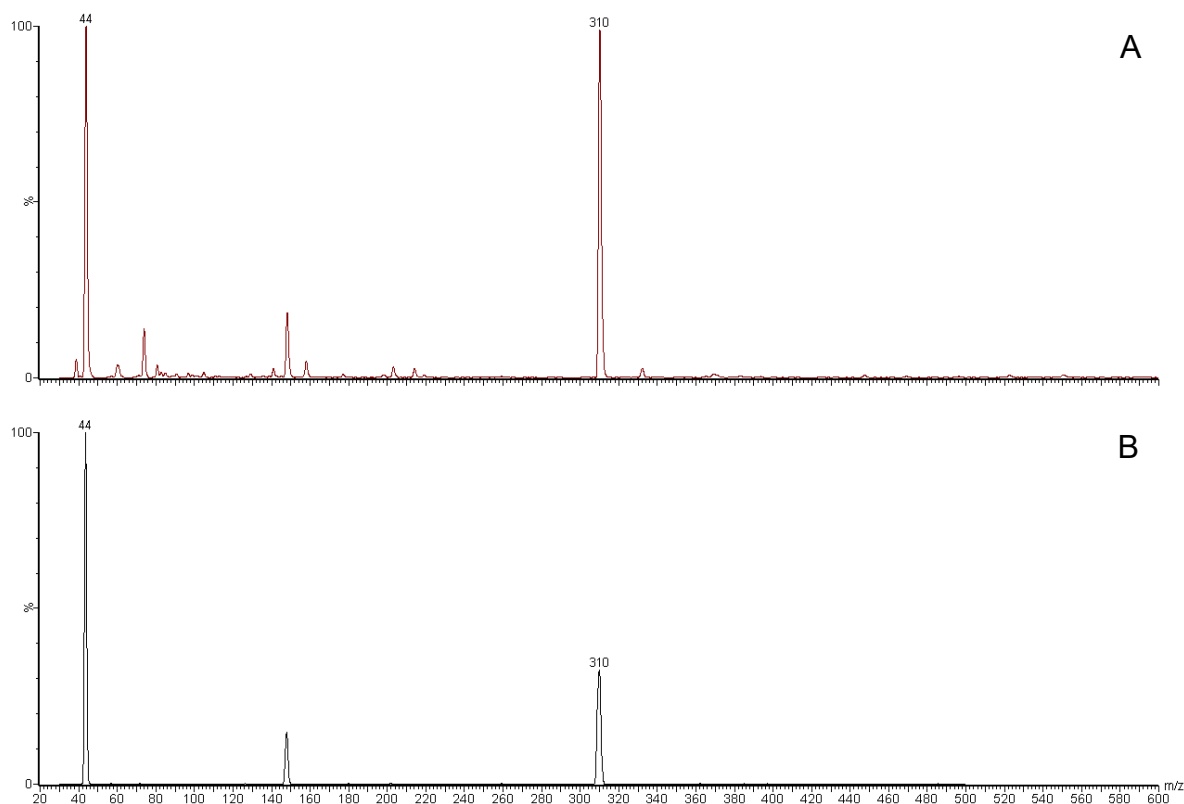


Figura 5. Espectro de massas do íon produto (A) e do íon protonado (B) da fluoxetina.

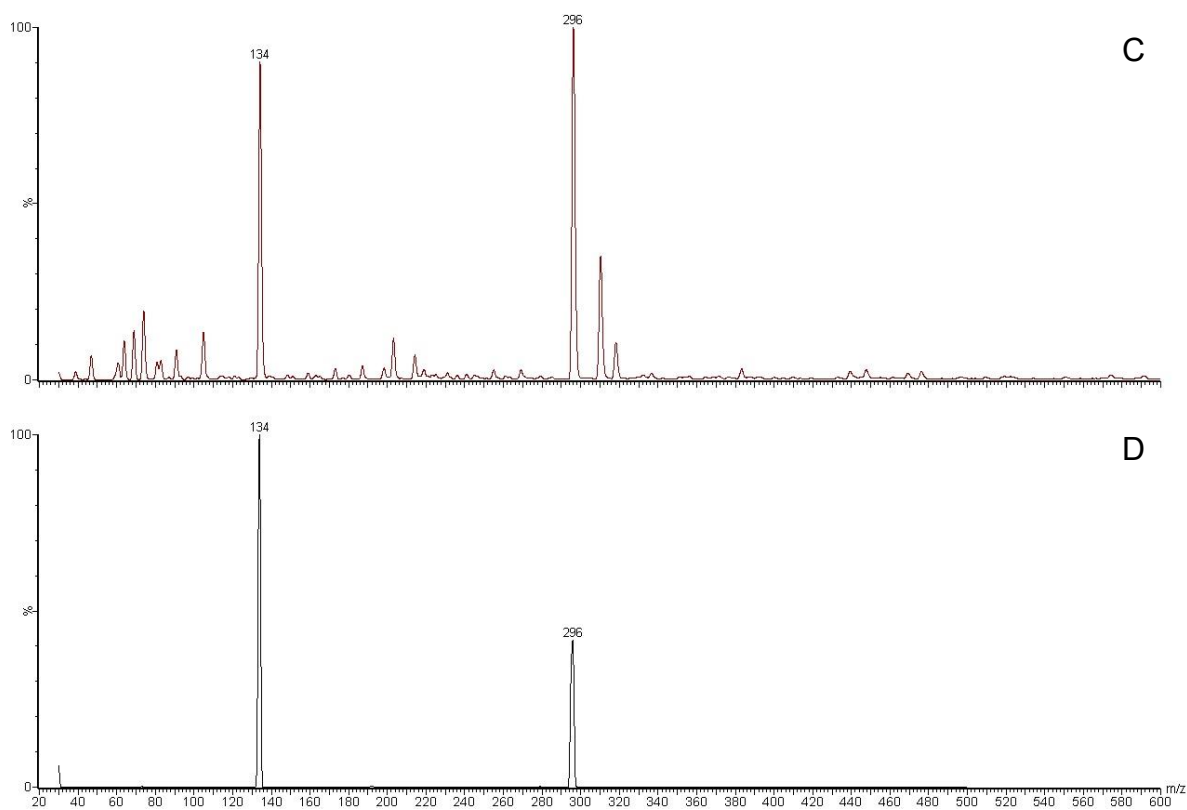


Figura 6. Espectro de massas do íon produto (C) e do íon protonado (D) da norfluoxetina.

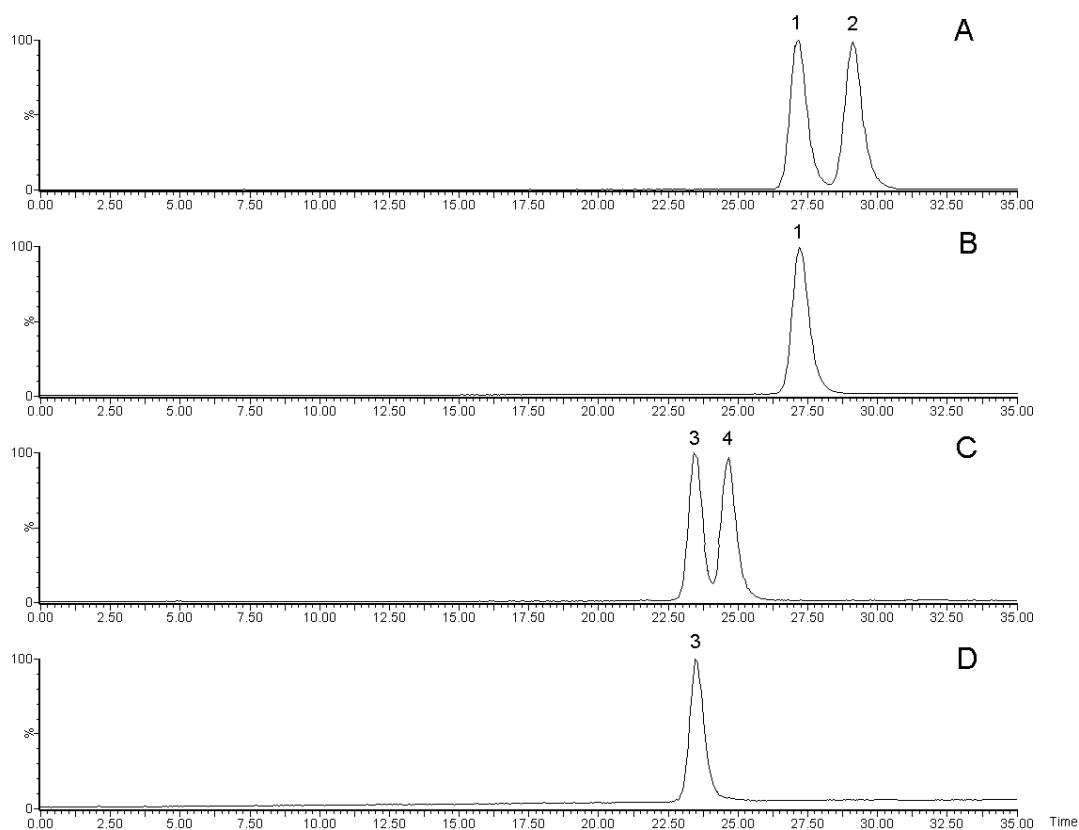


Figura 7. Cromatogramas referente à ordem de eluição da fluoxetina e norfluoxetina (50 ng/mL de metanol). Padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-fluoxetina (A), padrão do enantiômero (S)-(+)-fluoxetina (B), padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-norfluoxetina (C), padrão do enantiômero (S)-(+)-norfluoxetina (D). 1) (S)-(+)-FLX.; 2) (R)-(-)-FLX.; 3) (S)-(+)-NorFLX.; 4) (R)-(-)-NorFLX.

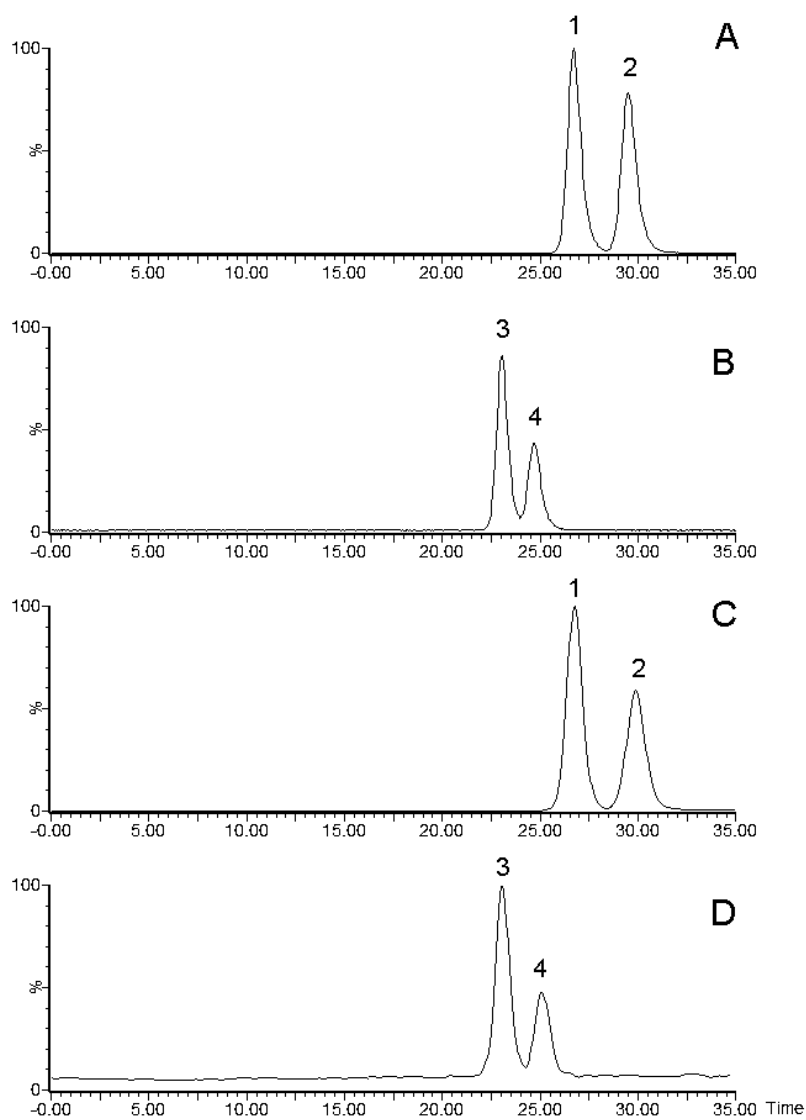


Figura 8. Cromatogramas da análise dos enantiômeros FLX e NorFLX no plasma humano e no fluido amniótico. Análise dos enantiômeros da FLX (A) e NorFLX (B) em plasma obtido após a administração de uma dose oral única de 20 mg FLX racêmica em gestante. Análise dos enantiômeros da FLX (C) e NorFLX (D) em fluido amniótico obtido após a administração de uma dose oral única de 20 mg FLX racêmica gestante. 1) (S)-(+)-FLX.; 2) (R)-(-)-FLX; 3) (S)-(+)-NorFLX; 4) (R)-(-)-NorFLX.

5.2.2 Análise do método em leite materno

A Figura 9 estão cromatogramas referentes à análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno.

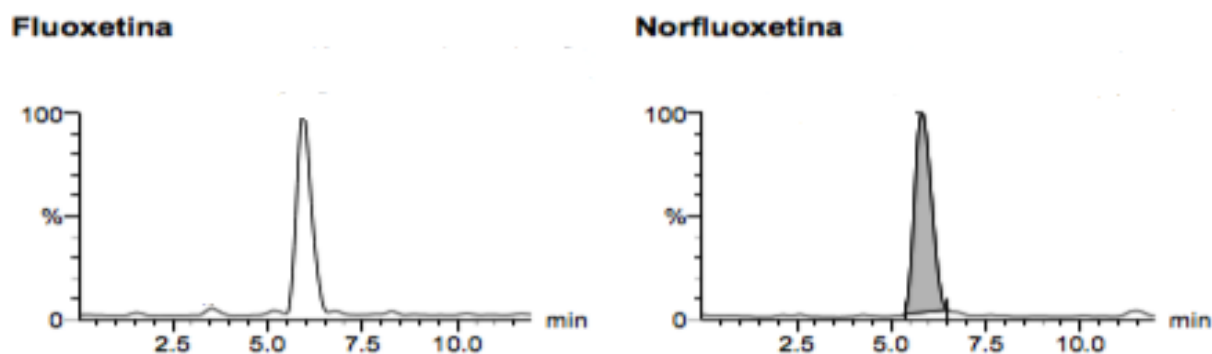


Figura 9. Cromatogramas referente à análise da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno.

5.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA

5.3.1 Plasma e líquido amniótico

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se oito amostras de diferentes plasmas, dentre essas amostras, quatro eram normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas e seis amostras de LA de diferentes doadores nas concentrações (CQB) 0,1 ng FLX e 0,2 ng NorFLX para cada enantiômero/mL de plasma da e 0,02 ng FLX e 0,1 ng NorFLX para cada enantiômero/mL de líquido amniótico da respectivamente e (CQA) 16 ng FLX e NorFLX para cada enantiômero/mL de plasma e 8 ng FLX e NorFLX para cada enantiômero/mL de líquido amniótico respectivamente. Os coeficientes de variação do FMN relativo a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15% (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito matriz para os enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano e líquido amniótico

	FMN (CV %)		FMN (CV %)	
	Plasma		Líquido amniótico	
	CQB	CQA	CQB	CQA
(S)-(+)- FLX	4,03	12,82	13,90	15,00
(R)-(-)- FLX	6,83	13,07	14,99	13,79
(S)-(+)- NorFLX	12,15	14,60	13,69	15,00
(R)-(-)- NorFLX	14,68	14,37	14,98	14,35

FMN: Fator da matriz normalizado por PI [(Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz)/ (Resposta do analito em solução padrão/Resposta do PI em solução padrão)]; Efeito matriz = FMN Matriz/ FMN solução*100;
 CV = coeficiente de variação [(SD FMN/ média FMN) x 100].

Os resultados obtidos na validação do método de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e LA humano estão demonstrado nas tabelas a seguir. O método apresentou limite de confiança adequado para a aplicação em estudos farmacocinéticos.

Tabela 8. Parâmetros de validação, Precisão e Exatidão, do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano por LC-MS/MS

	(S)-(+)- fluoxetina	(R)-(-)- fluoxetina	(S)-(+)- norfluoxetina	(R)-(-)- norfluoxetina
Linearidade (ng/mL)	0,04–20		0,1–20	
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9951	0,9927	0,9932	0,9948
Limite de quantificação (ng/mL)	0,04		0,1	
Precisão (CV %)	2,75	3,76	2,92	7,92
Exatidão (EPR %)	3,50	5,00	11,80	3,60
Intra corrida (CV %)				
LIQ (n = 5)	2,11	4,33	0,98	2,62
CQB (n = 5)	2,50	7,89	13,65	9,45
CQM (n = 5)	4,48	8,47	7,31	7,69
CQA (n = 5)	2,37	3,37	5,47	5,53
CQD (1:5) (n = 5)	5,47	5,28	6,45	6,09
Inter corrida (CV %)				
LIQ (n = 15)	3,72	3,46	7,38	6,89
CQB (n = 15)	7,28	6,44	11,63	13,46
CQM (n = 15)	8,74	7,33	6,85	6,67
CQA (n = 15)	5,69	6,03	5,45	5,62
CQD (1:5) (n = 15)	4,58	3,64	6,53	7,73
Intra-corrida (EPR%)				
LIQ (n = 5)	11,52	10,49	14,19	0,05
CQB (n = 5)	9,50	6,50	-4,40	-11,60
CQM (n = 5)	-10,20	-4,60	-2,00	-2,40
CQA (n = 5)	10,83	9,80	11,53	6,28
CQD (1:5) (n = 5)	5,93	3,33	-0,11	-2,15
Inter corrida (EPR %)				
LIQ (n = 15)	8,14	5,40	9,21	2,97
CQB (n = 15)	3,66	3,33	-1,60	-0,07
CQM (n = 15)	-6,86	-4,13	3,30	3,50
CQA (n = 15)	6,52	4,62	7,35	2,51
CQD (1:5) (n = 15)	3,00	1,50	-1,43	-5,40

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Tabela 9. Parâmetros de validação, Precisão e Exatidão, do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em líquido amniótico humano por LC-MS/MS

	(S)-(+)- fluoxetina	(R)-(-)- fluoxetina	(S)-(+)- norfluoxetina	(R)-(-)- norfluoxetina
Linearidade (ng/mL)	0,005–10		0,05–10	
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9956	0,9949	0,9932	0,9941
Limite de quantificação (ng/mL)	0,005		0,05	
Precisão (CV %)	11,87	11,19	11,19	10,79
Exatidão (EPR %)	-10,00	-7,50	-7,50	-5,75
Intra corrida (CV %)				
LIQ (n = 5)	0,00	8,60	10,18	14,05
CQB (n = 5)	6,58	4,14	10,97	7,55
CQM (n = 5)	3,18	2,38	4,12	5,36
CQA (n = 5)	3,99	4,02	8,66	6,55
CQD (1:20) (n = 5)	5,28	3,35	5,70	6,82
Inter corrida (EPR %)				
LIQ (n = 15)	14,08	13,09	11,59	10,58
CQB (n = 15)	6,47	4,14	9,44	6,85
CQM (n = 15)	7,80	8,69	4,30	7,92
CQA (n = 15)	10,56	12,48	8,02	6,73
CQD (1:20) (n = 15)	8,77	10,32	11,70	11,33
Intra corrida (CV %)				
LIQ (n = 5)	0,00	4,00	2,00	6,80
CQB (n = 5)	2,00	1,00	5,80	-0,80
CQM (n = 5)	-5,05	-4,70	0,96	-1,90
CQA (n = 5)	-11,66	-12,86	-8,95	-11,65
CQD (1:20) (n = 5)	-5,64	-7,42	-5,60	-6,76
Inter corrida (EPR %)				
LIQ (n = 15)	-4,00	1,73	2,67	5,73
CQB (n = 15)	0,68	4,00	0,27	-2,53
CQM (n = 15)	2,35	7,05	1,56	-5,04
CQA (n = 15)	2,20	4,19	-1,29	-9,04
CQD (1:20) (n = 15)	0,35	1,34	-1,00	-2,99

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Tabela 10. Teste estabilidade para análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico humano

Concentração	Estabilidade curta duração (2 h à 23°C)				Congelamento/descongelamento (3 ciclos à 23° e -70°C)				Estabilidade pós-processamento (24 h à 12°C)			
	Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)		Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)		Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)	
	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA
CQB												
(S)-(+)- FLX	8,44	3,27	-0,67	-11,67	10,26	3,20	-7,01	-12,72	6,99	3,39	-2,67	-11,76
(R)-(-)- FLX	7,21	3,31	-5,67	-11,96	5,77	3,29	-10,0	-11,60	6,46	3,41	0,67	-12,01
CQA												
(S)-(+)- FLX	1,61	4,09	7,08	-14,69	1,60	4,58	1,42	-13,95	2,49	4,93	8,12	-14,77
(R)-(-)- FLX	1,95	4,62	7,44	-13,90	2,64	4,60	1,16	-13,11	2,62	4,77	6,24	-13,99
CQB												
(S)-(+)- NorFLX	10,15	7,51	-3,00	-11,33	9,50	7,80	2,50	-11,42	3,67	7,84	-4,33	-12,33
(R)-(-)- NorFLX	5,52	6,76	-3,33	-10,0	2,86	6,67	-6,00	-12,51	1,67	6,91	5,16	-10,09
CQA												
(S)-(+)- NorFLX	1,59	5,59	-7,60	-7,49	2,52	6,09	-7,60	-7,93	2,08	5,98	6,80	-7,89
(R)-(-)- NorFLX	0,97	5,49	-12,7	-7,99	3,49	5,87	-8,92	-8,01	2,53	5,54	-3,68	-8,05

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

5.3.2 Leite Materno

Neste estudo o efeito de matriz foi avaliado nos níveis de concentração das amostras de CQ baixo e CQ alto, fortificando-se amostras de colostro e leite materno branco coletado de nove indivíduos, calculando-se o CV entre as amostras.

A linearidade do método foi avaliada através das curvas de calibração construídas para FLX e NorFLX. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear para ambos, com intercepto = 0 para FLX.

Tabela 11. Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação do método

Analito	Faixa de concentração (ng/mL)	Equação da curva	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
FLX	3 – 150	$Y = 41,40428X$	0,997	1	3
NorFLX	4 – 200	$Y = -25,5334 + 40,97914X$	0,990	2	4

Avaliadas as amostras controles de qualidade foram preparadas em quintuplicata, em três níveis de concentrações (baixo, médio e alto), em relação às concentrações da curva de calibração. Os LOQs foram as primeiras concentrações das curvas de calibração e os valores obtidos foram de 3,0 e 4,0 ng/mL para FLX e NorFLX, respectivamente. Os valores de LOD foram de 1,0 ng/mL para FLX e de 2,0 ng/mL para NorFLX. Estes valores são inferiores aos reportados na literatura para estes analitos em amostras de plasma.

Estes dados estão representados na Tabela a seguir, onde a precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as concentrações nominais e as quantificadas.

Tabela 12. Precisão e exatidão, média intra lotes (n=5), inter lotes (n=5) e eficiência do processo de extração (EP)

Composto (ng/mL)	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média (3 lotes)		P (%)
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	
FLX									
6	104	15,4	120	11,1	100	12,4	108	12,9	68,9
60	92,8	12,1	119	5,83	97,4	3,69	103	7,21	60,2
120	99,9	16,0	120	7,94	94,0	8,30	105	10,7	61,3
NorFLX									
8	94,4	16,8	115	10,4	89,1	14,8	99,5	14,0	88,1
80	94,9	10,7	120	8,40	100	6,73	104	8,61	69,5
160	99,3	14,1	120	7,87	97,5	4,06	105	8,68	71,9

A precisão das replicatas dos compostos apresentou CV entre 3,69 e 16,8 considerando-se os resultados obtidos para todos os compostos. Os valores de exatidão variaram entre 89,1 e 120% das concentrações nominais. Portanto, os valores estão dentro dos critérios de aceitação para validação de métodos bioanalíticos, considerando especialmente que o preparo da amostra inclui uma etapa de standby permitindo que o estado estacionário entre analitos e matriz seja alcançado.

Os dados da eficiência de extração também compreendem uma faixa de 60,2 – 88,1%, para ambos analitos. Estes resultados foram determinados através da razão entre as áreas das amostras preparadas em colostro (n=5) e as áreas das amostras preparadas em água (n=5), nos três níveis de CQ. Estes resultados demonstraram uma pequena influência na extração das concentrações mais baixas que pode estar relacionado à etapa de standby ou ao efeito de matriz. A estabilidade das amostras fortificadas foi avaliada por cinco ciclos de degelo e se mostraram estáveis por 60 dias.

5.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA EM GESTANTES

5.4.1 Análise farmacocinética dos enantiômeros da FLX e NorFLX

A farmacocinética da fluoxetina foi avaliada em nove gestantes incluídas no estudo. As curvas de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas nas Figuras 10, 11 e 12 e os parâmetros farmacocinéticos apresentados nas Tabelas 13 e 14.

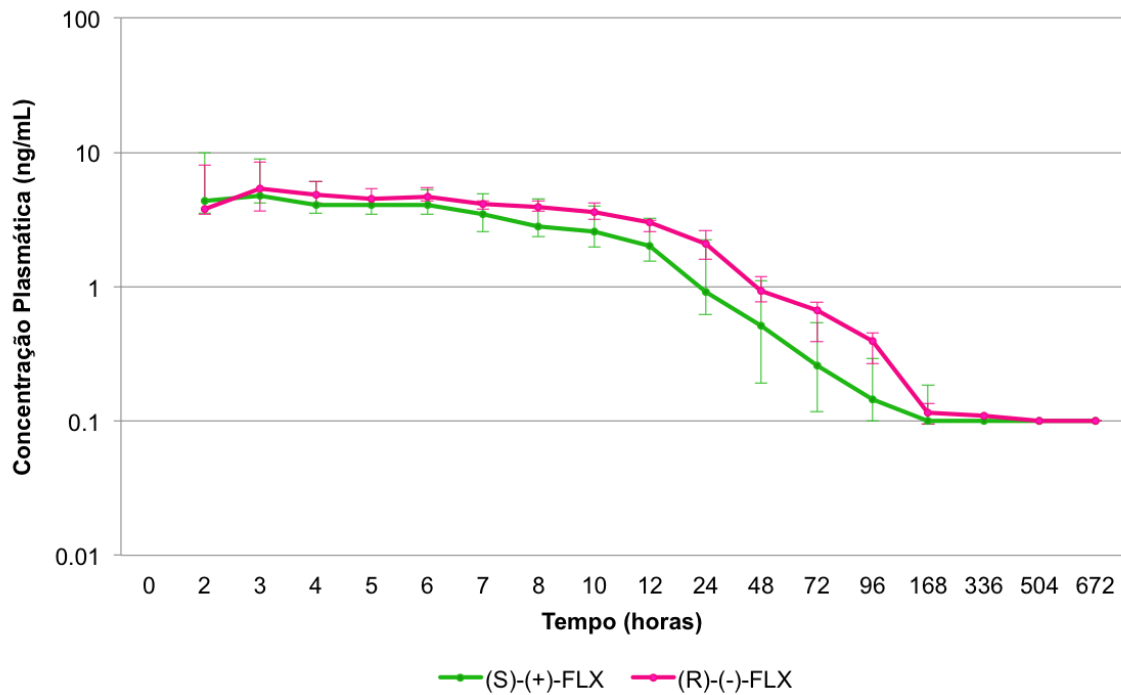


Figura 10. Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros da fluoxetina em gestantes após administração de 20 mg de cloridrato de fluoxetina racêmico em dose única. Dados expressos em Mediana, Percentil 25 e Percentil 75.

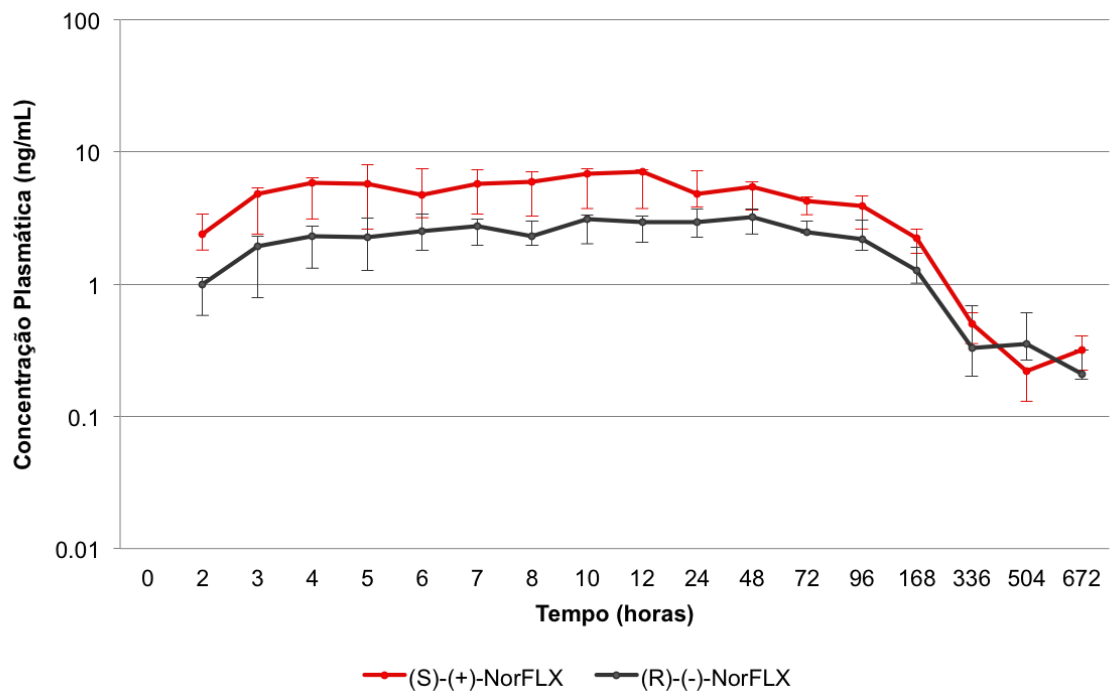


Figura 11. Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros da norfluoxetina em gestantes após a administração de 20 mg de cloridrato de fluoxetina racêmico em dose única. Dados expressos em Mediana, P25 e P75.

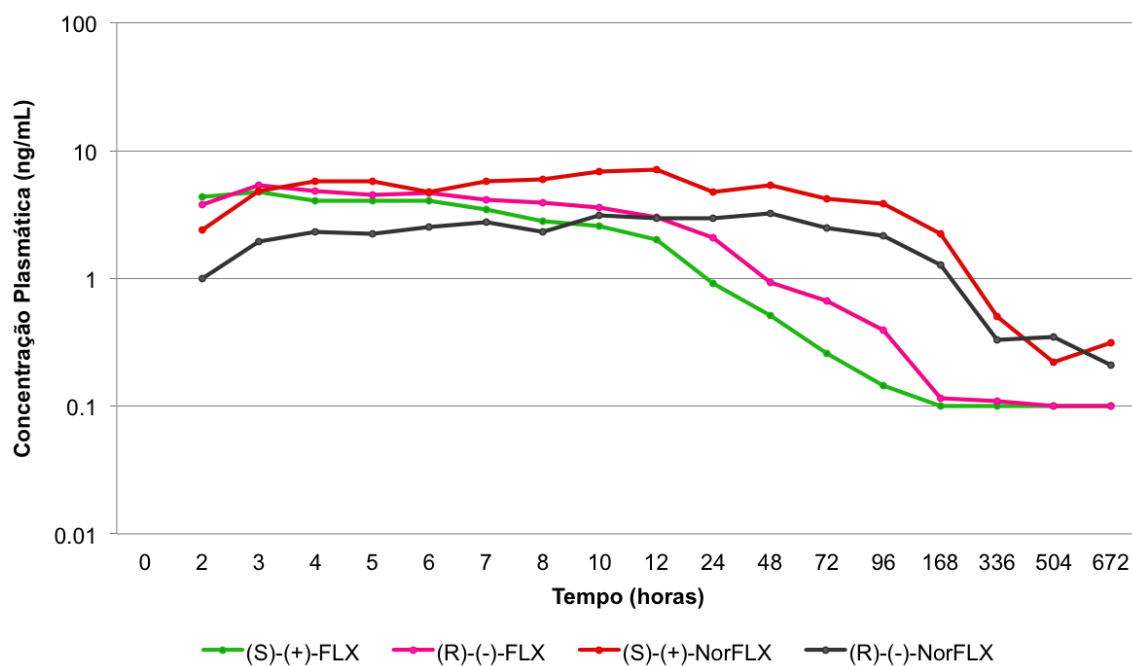


Figura 12. Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em gestantes. Dados expressos em Mediana.

Tabela 13. Parâmetros farmacocinéticos da fluoxetina em gestantes (n=9)

	(S)-(+)-Fluoxetina	(R)-(-)-Fluoxetina	p*
C_{max} (ng/mL)	6,05 4,04 - 11,46	5,94 5,14 - 9,16	0,7344
T_{max} (h)	2,35 1,62 - 3,59	4,41 2,39 - 5,26	*0,0039
AUC^{0-∞} (ng.h/mL)	97,81 39,54 - 258,20	209,20 113,90 - 263,00	0,1289
K_a (h ⁻¹)	0,16 0,11 - 0,36	0,18 0,11 - 0,30	0,9102
t_{1/2α} (h)	1,94 1,32 - 4,47	2,33 1,07 - 4,14	0,9102
K_{el} (h ⁻¹)	0,04 0,03 - 0,07	0,03 0,02 - 0,04	*0,0078
t_{1/2β} (h)	17,19 9,73 - 22,20	24,72 18,07 - 34,56	*0,0117
V_{d/f} (L/h/Kg)	19,00 17,24 - 28,18	23,25 20,22 - 24,55	0,5703
Cl/f (L/h/Kg)	1,45 0,63 - 3,24	0,66 0,52 - 1,16	*0,0117

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos da norfluoxetina em gestantes (n=9)

	(S)-(+)-Norfluoxetina	(R)-(-)-Norfluoxetina	p*
C_{max} (ng/mL)	6,29 5,76 - 8,02	3,29 2,83 - 3,67	*0,0039
T_{max} (h)	13,66 7,47 - 26,95	21,65 12,46 - 24,57	0,3594
AUC^{0-∞} (ng.h/mL)	942,70 746,40 - 1483,00	498,60 464,40 - 1259,00	*0,0273
K_{el} (h ⁻¹)	0,008 0,005 - 0,011	0,007 0,004 - 0,009	0,3594
t_{1/2} (h)	83,48 62,18 - 156,50	95,15 78,93 - 207,60	0,1289

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

5.4.2 Análise da distribuição entre os diferentes compartimentos maternos e fetais dos enantiômeros da FLX e NorFLX

5.4.2.1 Transferência placentária no plasma e excreção fetal no líquido amniótico

Os dados apresentados nas Tabelas 15 e 16 representam as concentrações dos enantiômeros da FLX E NorFLX nas amostras de plasma materno, plasma da veia, da artéria do cordão umbilical, plasma do espaço intervilososo e LA.

Tabela 15. Concentrações da fluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9)

	(S)-(+)-Fluoxetina	(R)-(-)-Fluoxetina	p*
Plasma materno (ng/mL)	1,95 1,06 - 2,93	1,87 1,00 - 2,86	0,5703
Plasma Veia Umbilical (ng/mL)	0,89 0,31 - 1,57	0,50 0,26 - 1,11	0,1289
Plasma Artéria Umbilical (ng/mL)	0,63 0,27 - 1,43	0,35 0,26 - 0,99	0,0977
Plasma Espaço Intervilososo (ng/mL)	2,28 1,04 - 4,08	2,59 1,15 - 3,62	0,7344
Líquido Amniótico (ng/mL)	0,22 0,03 - 0,80	0,18 0,02 - 0,56	0,1250

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

Tabela 16. Concentrações da norfluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9)

	(S)-(+)-Norfluoxetina	(R)-(-)-Norfluoxetina	p*
Plasma materno (ng/mL)	1,85 0,54 - 3,89	0,86 0,33 - 1,29	*0,0117
Plasma Veia Umbilical (ng/mL)	0,47 0,19 - 1,07	0,25 0,06 - 0,36	*0,0039
Plasma Artéria Umbilical (ng/mL)	0,40 0,17 - 0,94	0,25 0,06 - 0,33	*0,0039
Plasma Espaço Intervilososo (ng/mL)	1,40 0,59 - 3,64	0,85 0,31 - 1,42	*0,0117
Líquido Amniótico (ng/mL)	0,42 0,26 - 0,59	0,14 0,11 - 0,18	0,5000

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

As relações entre os sítios vasculares maternos, placentários e fetais foram estabelecidas para a avaliação da taxa de metabolismo e extração fetal dos enantiômeros da FLX e da NorFLX. Foram determinadas suas concentrações no plasma da veia materna,

veia umbilical fetal, da artéria umbilical fetal, do espaço interviloso e do LA no momento do parto e estabelecido as relações entre as mesmas (Tabelas 17 e 18, Figuras 13 e 14).

Tabela 17. Relação da transferência placentária da fluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9)

Razão	(S)-(+)-Fluoxetina	(R)-(-)-Fluoxetina	<i>p</i> *
Veia umbilical / Veia materna	0,440 0,310 - 0,500	0,330 0,270 - 0,380	*0,0039
Veia umbilical / Espaço interviloso	0,390 0,250 - 0,400	0,270 0,190 - 0,320	*0,0039
Espaço interviloso / Veia materna	1,300 1,030 - 1,400	1,280 1,100 - 1,630	0,3008
Artéria umbilical / Veia umbilical	0,740 0,680 - 1,070	0,860 0,690 - 1,060	0,6523
Líquido amniótico / Veia materna	0,084 0,013 - 0,154	0,078 0,011 - 0,139	0,1250
Líquido amniótico / Veia umbilical	0,202 0,097 - 0,120	0,238 0,028 - 0,489	1,000

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

Tabela 18. Relação da transferência placentária da norfluoxetina em amostras coletadas no momento do parto (n=9)

Razão	(S)-(+)-Norfluoxetina	(R)-(-)-Norfluoxetina	<i>p</i> *
Veia umbilical / Veia materna	0,37 0,23 - 0,46	0,32 0,24 - 0,42	0,1289
Veia umbilical / Espaço interviloso	0,345 0,235 - 0,392	0,275 0,189 - 0,374	*0,0273
Espaço interviloso / Veia materna	0,95 0,79 - 1,24	1,06 0,97 - 1,35	0,1289
Artéria umbilical / Veia umbilical	0,96 0,76 - 1,09	0,87 0,75 - 1,03	0,4961
Líquido amniótico / Veia materna	0,109 0,097 - 0,120	0,085 0,057-0,114	0,6250
Líquido amniótico / Veia umbilical	0,360 0,288 - 0,432	0,351 0,144 - 0,558	1,0000

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75.

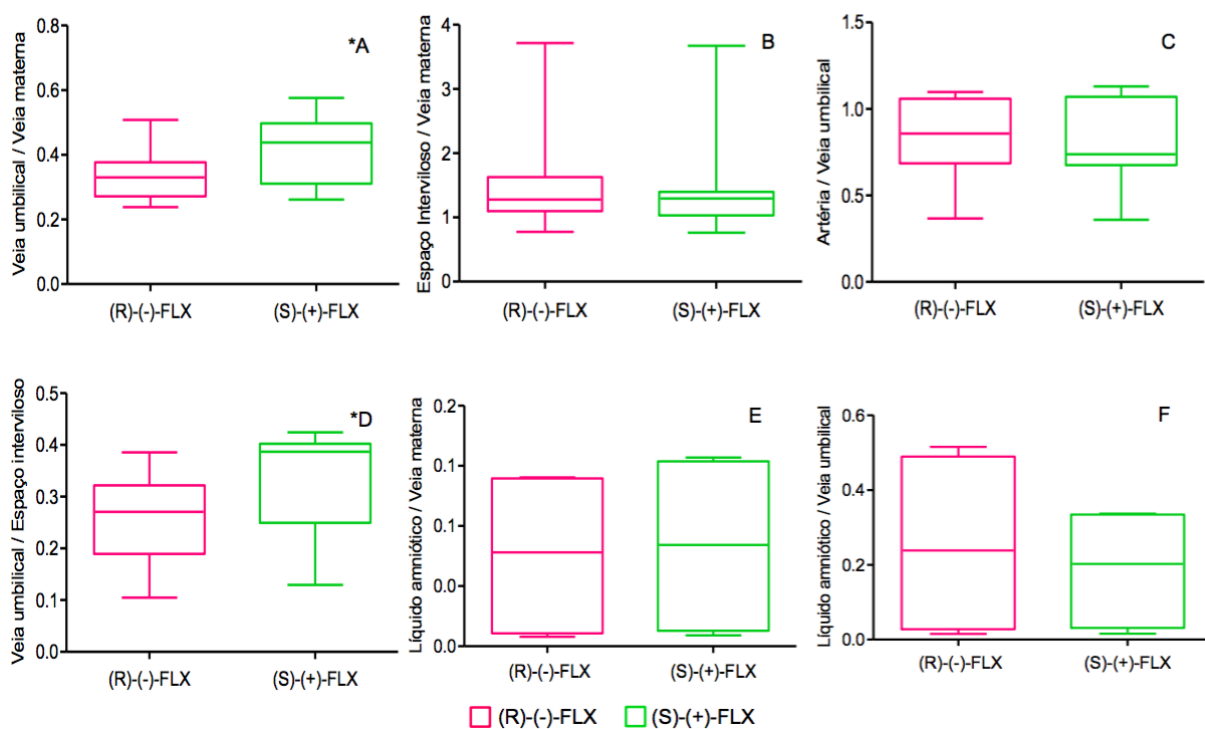


Figura 13. Avaliação comparativa das medianas, percentil 25 e 75 e os valores mínimo e máximo de (A) relação feto/mãe, (B) relação espaço intervilloso/mãe, (C) artéria umbilical/veia umbilical, (D) veia umbilical/espaço intervilloso, (E) líquido amniótico/veia materna; (F) líquido amniótico/veia umbilical dos enantiômeros da fluoxetina em nove gestante.

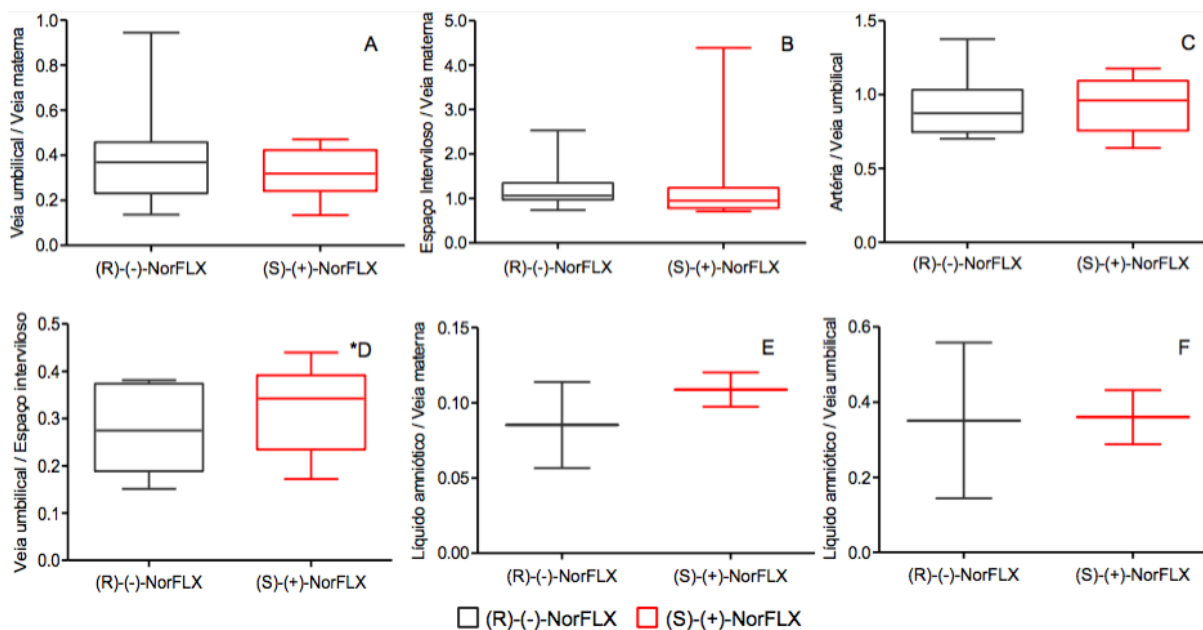


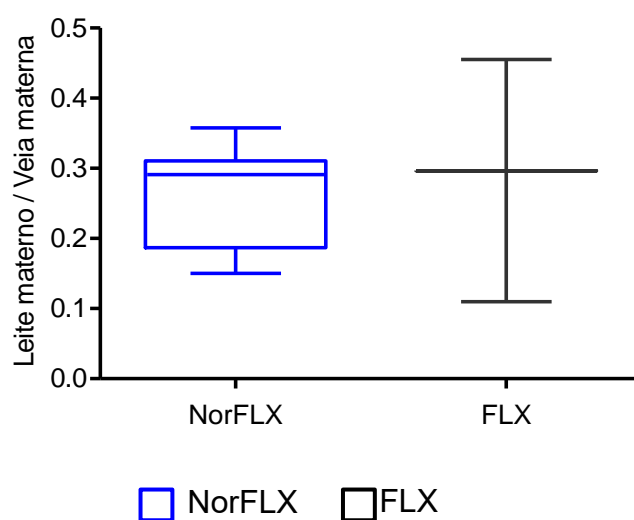
Figura 14. Avaliação comparativa das relações das medianas, percentil 25 e 75 e os valores mínimo e máximo de (A) feto/ mãe, (B) espaço intervilloso/mãe, (C) artéria umbilical/veia umbilical, (D) veia umbilical/espaço intervilloso, (E) líquido amniótico/veia materna; (F) líquido amniótico/veia umbilical dos enantiômeros da norfluoxetina em nove gestante.

5.4.2.2 Excreção no leite materno

Tabela 19. Concentrações da fluoxetina e norfluoxetina e da relação feto/mãe dos mesmos fármacos em amostras coletadas 24 horas após o parto

	Fluoxetina	Norfluoxetina	<i>p</i> *
Leite Materno (ng/mL)	1,20 1,10 – 1,60	2,45 2,27 – 2,65	-
Leite Materno/Veia Materna	0,07 0,02 – 0,83	0,66 0,17 – 1,16	*0,042

Dados expressos em Mediana, Percentil 25, Percentil 75. – Não realizado estatística

**Figura 15.** Avaliação comparativa das relações das medianas, percentil 25 e 75 e os valores mínimo e máximo de leite materno/mãe da norfluoxetina e fluoxetina em oito gestantes.

Os estudos têm apontado um alto índice de incidência de doenças mentais relacionadas ao humor, durante o período gravídico-puerperal, período em que as mulheres passam por várias mudanças hormonais e até mesmo socioeconômicas, incluindo fatores exógenos e endógenos, corroborando para o desenvolvimento de depressão nesta fase. A classe dos ISRS tem sido a mais indicada para tratar as gestantes acometidas, dentre os fármacos desta classe terapêutica, a FLX tem sido o medicamento de escolha na prática clínica (20,38).

Devido à precariedade de estudos neste campo da ciência e a preocupação com possíveis efeitos adversos para mãe e bebê, mesmo com diagnóstico da doença, ainda há falhas em seu tratamento durante esta fase da vida da mulher. Em casos mais severos, considerando a atual prevalência em ascensão e avaliando os riscos e benefícios do tratamento, conclui-se que os efeitos da depressão podem ser muito mais prejudiciais, afetando principalmente o vínculo materno-fetal (19,25–27,29).

Este é o primeiro estudo de farmacocinética da FLX e de seu metabólito ativo realizado em gestantes com uma curva de observação de 672 horas, permitindo a análise da curva completa. Torna-se evidente a lacuna existente na literatura sobre estudos de eficácia e segurança medicamentosa durante a gestação, principalmente de medicamentos que atuam no SNC, como os ISRS. Além da Farmacocinética, analisamos a distribuição dos enantiômeros da FLX e NorFLX nos compartimentos materno-fetais, avaliando a taxa de transferência do fármaco em estudo e suas vias de excreção pelo LA e pelo leite materno. Assim observamos possíveis alterações decorrentes da gestação, tanto na farmacocinética como na distribuição placentária e excreção dos enantiômeros da FLX e NorFLX em gestantes.

6.1 CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA

Participaram deste estudo nove gestantes sem comorbidades e que não estavam em tratamento medicamentoso que interferissem na farmacocinética e análise de distribuição entre os compartimentos materno-fetal dos enantiômeros da FLX e NorFLX, seu único metabólito ativo.

As pacientes realizaram pré-natal de maneira satisfatória, segundo critérios do Ministério da Saúde (96,106). A avaliação laboratorial de pré-natal foi considerada dentro dos padrões da normalidade (Tabela 4 e 5). Todas as investigadas receberam dose única, oral, de 20mg de fluoxetina racêmica (Prozac®) em dois diferentes momentos da mesma pesquisa. A primeira dose foi administrada no primeiro dia de coleta com a gestante

internada para as 12 horas de coleta para avaliação da farmacocinética. A coleta foi iniciada, o tempo zero foi colhido, o medicamento foi administrado e após duas horas foram coletadas amostras seriadas até 672h. A segunda dose foi administrada pelo menos duas horas antes do parto da mesma gestante com quantidade suficiente para ingestão do comprimido, a via de parto foi dependente da evolução obstétrica de cada paciente.

Segundo a curva de IMC em relação à idade gestacional, por volta de 32 – 34 semanas de gestação, para serem consideradas adequadas, as pacientes deveriam estar com seu respectivo IMC no máximo 28,40 Kg/m² (104,105). Portanto, as gestantes deste estudo foram classificadas com sobrepeso, devido ao valor da mediana de IMCs 29,00 Kg/m² (Tabela 4), no entanto não houve interferência nos resultados do estudo, considerando-se que todas tiveram sua função metabólica investigada e não foram encontradas alterações significativas. Os dados antropométricos são importantes, pois podem alterar a farmacocinética de medicamentos, alterando desta forma o volume de distribuição do fármaco e o *clearance*, através de alterações nas enzimas do CYP. Considerando que a gestação é um momento em que várias alterações fisiopatológicas ocorrem no organismo materno, os dados de IMC são relevantes, podendo haver uma infiltração de gordura no fígado, um dos fatores que alteram a ação de medicamentos (107), fator considerável que aponta a necessidade de estudos realizados em gestantes. Sendo de suma importância o conhecimento de como se comportam os medicamentos no organismo de uma gestante, já que estes podem não apresentar nem efeito benéfico a pacientes tratadas ou ainda produzir efeito pior, como intoxicação medicamentosa.

As parturientes possuem uma elevação na taxa da fosfatase alcalina, produzida por vários órgãos, inclusive a placenta, provável motivo para essa taxa mais elevada (108).

O peso placentário foi homogêneo e para a avaliação da taxa de transferência da FLX e NorFLX, foram avaliados fatores placentários e fetais que pudessem interferir sobre a mesma. A reavaliação dos exames de pré-natal no dia do parto confirmou achados prévios de normalidade já citados. Não foram encontradas alterações macroscópicas significativas, nas placentas, que pudessem alterar o transporte de fármaco. A idade gestacional poderia afetar a razão de transferência de medicamentos ao feto, já que a espessura do epitélio trofoblástico decresce com o evoluir da gravidez, porém o efeito desta variável foi controlado, uma vez que todas as pacientes do estudo apresentavam gravidez a termo (109).

O índice de Apgar dos recém-nascidos, após o parto foram considerados condizentes com boas condições de nascimento, mostrando que não houve comprometimento devido a pesquisa (Tabela 6).

6.2 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA EM PLASMA, LÍQUIDO AMNIÓTICO E LEITE MATERNO

Para a análise proposta pelo estudo, foi necessário o desenvolvimento e validação dos métodos de análise do fármaco e seu metabólito em plasma, LA e leite materno. O presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação de métodos enantiosseletivos de análise sequencial da FLX e NorFLX em plasma e LA, empregando LC-MS/MS acoplado à coluna de fase estacionária quiral Chirobiotic V. É o primeiro método desenvolvido, validado e aplicado para quantificar os enantiômeros da FLX e NorFLX em LA.

Os LIQs foram compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética clínica e distribuição em LA dos enantiômeros da FLX e NorFLX. Desenvolvido e validado para análise sequencial do mesmo fármaco em plasma de gestante, pela primeira vez neste desenho, que permite aplicação em estudos em farmacocinética clínica, com maior sensibilidade que o descrito por Kim et al. 2006 (27). Considerando que o presente estudo foi realizado em dose única de fluoxetina racêmica, e as alterações que ocorrem no organismo materno a concentração plasmática e em LA de gestantes, dos enantiômeros da FLX e NorFLX é baixa. Devido a estas baixas concentrações do fármaco, foi necessário o desenvolvimento de métodos de análises, em ambas matrizes biológicas bem sensíveis, exigindo LIQs baixos, mas sendo precisos e exatos como demonstrado, permitindo-nos considerar o método mais sensível da literatura. Os LIQs foram de 0,04 ng de cada enantiômero da FLX/mL e de 0,1 ng cada enantiômero da NorFLX /mL, empregando alíquotas de 500 µL plasma (Tabela 8 e 9). O método é mais sensível do que o descrito por Kim et al. (2006) (27) com relatos de LIQs de 0,1 ng de cada enantiômero da FLX/mL e de 0,5 ng cada enantiômero da NorFLX /mL de plasma.

Os métodos de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e LA, empregando LC-MS/MS, foram validados de acordo com as normas da ANVISA, com demonstração de ausência de efeito matriz e ausência de efeito residual, o que mostra que as concentrações em ambas matrizes biológicas não sofreram nenhuma influência proveniente das mesmas matrizes, apresentando valores inferiores a 15% (Tabela 7). Foram extraídos do plasma e LA humano em pH básico, usando como solvente extrator a mistura álcool isoamílico:hexano (1:99, v/v). A linearidade de cada método de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX foram avaliadas através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (contendo apenas padrão interno), com coeficiente de correlação linear superiores a 0,98. Os intervalos lineares abrangeram todas as concentrações experimentadas (Tabelas 8 e 9).

As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 500 µL de plasma branco ou 1000 µL de LA e enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de FLX e NorFLX. As curvas analíticas para a FLX foram construídas nas concentrações 0,04; 0,1; 0,2; 0,4; 1; 4; 10 e 20 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2; 5 e 10 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. As curvas analíticas para a NorFLX foram construídas nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 1; 4; 10; e 20 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2; 5 e 10 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. As curvas analíticas foram aprovadas quando os controles de qualidade apresentaram desvio de, no máximo 15%, e de até 20% para o LIQ. Os métodos analíticos em ambas matrizes biológicas mostraram valores de CV e EPR inferiores a 15%, nos estudos de precisão e exatidão intra e intercorridas, podendo assim ser utilizados como um trabalho de referência para outros estudos que envolvam a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e LA (Tabelas 8 e 9). As amostras de plasma e LA permaneceram estáveis no processo de congelamento e descongelamento, pós-processamento e curta duração (Tabela 10).

Ressalta-se que os métodos de análise da FLX em plasma que também empregaram LC-MS/MS descritos previamente não fazem nenhuma referência relativa à fase estacionária da coluna quiral, empregada no processo de resolução dos enantiômeros.

Outros métodos descritos para a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma humano ou em plasma de ratos, empregam derivatização com o reagente enantiomericamente puro isocianato de (R)-1-(1-naftila) etila (110) ou colunas de fases estacionárias quirais, tais como ODR (41,111–113) Chirobiotic V (20,99) ou AGP (114). Os enantiômeros da FLX e NorFLX são detectados em sistemas GC-MS (27,115) ou em sistemas HPLC com detector UV (20,110–113), HPLC com detecção por fluorescência (41) ou LC-MS/MS em plasma humano (27) ou plasma de ovelhas (114) O estudo de Kim et al. (2006) (27) cita a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma, empregando LC-MS/MS com relatos de LIQ de 0,1ng/mL e 0,5ng/mL, respectivamente, para ambos os enantiômeros da FLX e NorFLX.

Não há descrição de desenvolvimento e validação do método de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em LA humano por LC-MS/MS, pois somente Kim et al. (2004)(115) descreve a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em LA de ovinos por CG-MS (116). As baixas concentrações de fármacos no LA exigiram o desenvolvimento de um método analítico mais sensível do que aqueles reportados para o plasma. No presente estudo, o método analítico dos enantiômeros da FLX e NorFLX em LA mostrou LIQ de 0,005 ng de cada enantiômero da FLX/mL e de 0,05 ng de cada enantiômero da NorFLX/mL de líquido amniótico (Tabela 9). Em matrizes biológicas de parturientes o LIQ é de extrema relevância, devido aos altos valores de distribuição e *clearance*, os quais encontram-se

aumentados durante a gestação. Os baixos valores de LIQs permitiram a quantificação da FLX e NorFLX em amostras de plasma coletadas até 672 h após a administração de dose única oral de 20 mg do fármaco racêmico (Figuras 11,12 e 13). As medianas dos valores de concentração plasmática máxima (C_{max}) foram de (S)-(+)-FLX 6,05 ng/mL e (R)-(-)-FLX 5,94 ng/mL e para o (S)-(+)-NorFLX 6,29 ng/mL e (R)-(-)-NorFLX 3,29 ng/mL (Tabela 13 e 14), apresentando linearidades compatíveis com estudos de aplicação em disposição cinética clínica

Os enantiômeros da FLX e NorFLX foram resolvidos na coluna Astec Chirobiotic® V (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA) com pré-coluna CN Lichospher® 100 (4 x 4 mm e partículas de 5 μ m) (Merck, Darmstadt, Germany) e fase móvel constituída por mistura de etanol:acetato de amônio 15 mM (85:15 v/v) na vazão de 0,8 mL/min. A coluna foi mantida a 23°C.

As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta da solução padrão de FLX e NorFLX na concentração de 1ng de cada enantiômero/mL de fase móvel, na vazão de 10 mL/min. As determinações foram executadas no modo MRM. Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos, foram monitorados nas transições 310>44 para os enantiômeros da FLX, 296>134 para os enantiômeros da NorFLX e 268>116 para o PI (Figuras 5 e 6). A ordem de eluição na sequência (S)-(+)-NorFLX, (S)-(+)-FLX, (R)-(-)-NorFLX, (R)-(-)-FLX foi determinada usando os enantiômeros puros (S)-(+)-FLX e (S)-(+)-NorFLX (Figura 7). Os enantiômeros da FLX separados na coluna de fase quiral apresentaram um tempo de retenção aproximado de 31 min da corrida total (Figura 8), os enantiômeros (S)-(+)-FLX e (R)-(-)-FLX tiveram o tempo de corrida de 25,4 e 30,6 min, respectivamente, e para (S)-(+)-NorFLX e (R)-(-)-NorFLX foram 24,5 e 25,9 min, respectivamente. O método descrito por Kim et al. (2006)(27) reporta a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX, empregando LC-MS/MS acoplado à coluna CHIRAL-AGP® com tempo de corrida inferior a 10 min, no entanto os autores não deixam claro a matriz aplicada no estudo, pois referem-se a dados anteriores não publicados pelo grupo de pesquisa. Outro estudo Gatti et al. 2002(111) apresenta uma corrida de, no máximo 21,3 min, para o enantiômero (R)-(-)-FLX, o último a ser eluído, por LC-MS/MS com detector de UV acoplado à coluna ODR, porém após um complexo processo de derivatização e com alto valor de LIQ de 10 ng/mL.

6.3 FARMACOCINÉTICA DOS ENANTIÔMEROS DA FLUOXETINA E NORFLUOXETINA

A FLX é um antidepressivo da classe dos ISRS, permitindo assim que a serotonina fique mais disponível na fenda sináptica aumentando sua atividade no cérebro. Esta é a classe de medicamentos mais prescrito para depressão durante a gestação, sendo a FLX o mais indicado na clínica, devido sua eficácia, pouco efeitos adversos e baixa toxicidade (3).

A ampla variedade na resposta clínica, pode estar relacionada as diferenças nas concentrações plasmáticas de cada enantiômero tanto da FLX quanto da NorFLX. É um fármaco de alta biodisponibilidade (90%), alta eliminação pré-sistêmica e altamente ligado as proteínas do plasmáticas com valores de aproximadamente 94,5% (68).

Os parâmetros farmacocinéticos durante a gestação podem ser avaliados com um número relativamente pequeno de pacientes, podendo ser realizado tanto no período peri quanto pós-parto (117,118).

Os resultados deste estudo apresentaram diferença estatística, na comparação enantiomérica de alguns parâmetros farmacocinéticos da FLX e NorFLX.

Os parâmetros V_d e Cl , dependem da biodisponibilidade do fármaco, a FLX fica próxima a 90% (119) que corresponde ao fármaco em sua forma inalterada na circulação sistêmica, foram calculados de maneira mais precisa como valores aparentes, ou seja, *clearance* total aparente (Cl/f) e volume de distribuição aparente (V_d/f). Não encontramos dados na literatura nesta população estudada, somente em não gestantes com valores de V_d/f de 12-43 L/Kg (60), sugerindo uma extensa distribuição para os órgãos (120,121).

Os parâmetros V_d e Cl alteram devido às mudanças fisiológicas que ocorrem no organismo materno durante a gestação. O V_d/f pode estar aumentado em até 50%, devido ao aumento do volume plasmático e a presença de mais um compartimento, fetal. A perfusão sanguínea útero-placentária atinge 36 a 42 L/h a termo, sendo 80% segue para a placenta e 20% para o miométrio. O volume corporal aumenta cerca de 8 L, 60% é distribuído entre a placenta, feto e LA e 40% para os tecidos maternos (54,122). Cerca de 11% da dose de FLX é excretada na urina em sua forma inalterada, 7% como NorFLX e 7-8% como conjugados da FLX e NorFLX (45).

Os parâmetros farmacocinéticos apresentados na Tabela 9 mostram maiores valores de T_{max} (2,35 vs 4,41 h) e $t_{1/2\beta}$ (17,19 vs 24,72 h) para o enantiômero (R)-(-)-FLX quando comparado ao (S)-(+)-FLX. Ressalta-se ainda uma redução maior que 50% no Cl/f do enantiômero (R)-(-)-FLX comparado ao (S)-(+)-FLX quando os valores foram corrigidos pelo peso corporal (1,45 vs 0,66 L/h/kg), apesar da não observação de diferença estatística no parâmetro AUC dos enantiômeros (97,81 ng.h/mL vs 263,00 ng.h/mL, respectivamente para (S)-(+)-FLX e (R)-(-)-FLX), inferindo que pode ter havido falha no cálculo amostral, pois este é o primeiro estudo de farmacocinética da fluoxetina em gestantes ou devido a grande variabilidade interindividual decorrente, entre outros fatores, como polimorfismo genético do CYP2D6 (123). No entanto, analisando-se o perfil das concentrações plasmáticas vs tempo

dos enantiômeros da FLX (Figura 10) fica evidente a enantiosseletividade com preponderância plasmática do enantiômero (R)-(-)-FLX.

O estudo de Kim et al. (2006)(27) reporta razões enantioméricas (S)-(+)/(R)-(-) de concentrações plasmáticas da FLX próximas a 2, ou seja, com evidência de maiores concentrações plasmáticas do enantiômero (S)-(+), enquanto no presente estudo observamos preponderância plasmática do enantiômero (R)-(-). No entanto, os dados apresentados no estudo de Kim et al. (2006)(27) são oriundos de parturientes no terceiro trimestre de gestação tratadas com 20 mg/dia de FLX, em regime de dose múltipla, durante pelo menos três semanas antes da gestação. As diferenças observadas entre o estudo de Kim et al. (2005)(27) de administração de doses múltiplas com o presente estudo de administração de dose única podem ser explicadas com base em estudos *in vitro* que reportam que a FLX e seu metabólito NorFLX são potentes inibidores do CYP2D6 e do CYP2C9. Os estudos ainda relatam que os enantiômeros (S)-(+) são aproximadamente dez vezes mais potentes como inibidores das referidas isoformas CYP (123). Avaliando-se separadamente as vias metabólicas dos enantiômeros da FLX, observa-se que o (S)-(+)-FLX é metabolizado pelo CYP2D6 (52,65,66) e o (R)-(-)-FLX pelo CYP2D6 e CYP2C9 (61). Logo, as maiores concentrações plasmáticas do enantiômero (S)-(+)-FLX observadas nos estudos de doses múltiplas são decorrentes do fato de que a FLX age como inibidor do CYP2D6 e não do CYP2C9.

O estudo realizado por Little (1999)(124) aponta que há uma diminuição da meia-vida de eliminação para a maioria dos fármacos durante a gestação devido ao aumento do CI, o que provavelmente ocorreu neste estudo, pois a literatura relata meia-vida de eliminação de aproximadamente 1-4 dias para a FLX em não gestantes (60), enquanto no presente estudo foram encontrados valores de 17,19 e 24,72 h, respectivamente para os enantiômeros (S)-(+) e (R)-(-)-FLX (menos que 1dia) Tabela 13.

A literatura reporta inúmeros artigos relatando o metabolismo da FLX a NorFLX, sendo o (S)-(+)-NorFLX 20 vezes mais potente como inibidor da receptação de serotonina que o (R)-(-)-NorFLX, tanto *in vitro* como *in vivo* (48,49). A razão metabólica NorFLX/FLX é relatada como aproximadamente 60% maior em gestantes que em puérperas após dois meses do parto, sugerindo indução do CYP2D6 durante a gestação (44).

No presente estudo, os valores de AUC são maiores para o enantiômero (S)-(+)-NorFLX quando comparado ao enantiômero (R)-(-)-NorFLX, inferindo que o enantiômero (S)-(+)-FLX é o preferencialmente metabolizado a NorFLX. As razões enantioméricas (S)-(+)/(R)-(-) de AUC obtidas no presente estudo são próximas a 2 (Tabela 17) e estão de acordo com o estudo de administração de doses múltiplas de FLX reportado por Kim et al. (2006)(27) com valores de aproximadamente 2,5.

O presente estudo reporta dados completos de parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da FLX e NorFLX pela primeira vez em gestantes tratadas com dose única do antidepressivo, fato que impossibilita a comparação com dados da literatura.

Devido a alta variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos da FLX nas gestantes investigadas, serão realizadas análises de fenotipagem, afim de elucidar melhor esse resultado, permitindo que as pacientes sejam classificadas de acordo com seu fenótipo do CYP2D6, rápido ou lento (125). Considerando que a FLX é metabolizada principalmente pelo CYP2D6, mas possui características de ser um fármaco inibidor deste mesmo CYP, somado ao fato de que na gestação o CYP2D6 encontra-se induzido, não desconsiderando as alterações fisiopatológicas que ocorrem no organismo materno e que por si só podem alterar a farmacocinética de medicamentos administrados no período gestacional.

6.4 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS DIFERENTES COMPARTIMENTOS MATERNOS E FETAIS DOS ENANTIÔMEROS DA FLX E NORFLX

Os antidepressivos podem atravessar a barreira placentária, expondo o feto ao medicamento que pode ser eliminado via artéria umbilical, devolvendo-o à circulação materna, ou via diurese fetal, permanecendo no líquido amniótico. A extensão da exposição fetal depende das propriedades farmacocinéticas materna e da transferência placentária do fármaco(72).

Alguns fármacos que atravessam a barreira placentária podem também atuar como via transportadora para o tratamento fetal, quando necessário. A membrana coriônica fetal é o que determina o que será transferido através de difusão passiva. Transporte este que depende de alguns fatores característicos do fármaco como, massa molecular, solubilidade, grau de ionização e também depende da disponibilidade dos transportadores responsáveis pelo transporte de determinadas substâncias (72).

As principais vias de exposição fetal ocorrem por meio da circulação umbilical e do LA, sendo esse último um fluido biológico de extrema relevância a ser estudado (89,90).

A pressão arterial materna é que injeta fluxo sanguíneo através das artérias espiraladas do endométrio, no espaço intervuloso, que banha o vilo coriônico transferindo nutrientes, gases e produtos metabólicos para o feto. A P-gp é um destes transportadores ativos encontrados em vários órgãos (126), incluindo a placenta, neste órgão a P-gp é expressa nas células trofoblásticas (127,128). Este transportador é muito relevante na interação de vários fármacos (126), atua protegendo o feto de drogas administradas a mãe, devolvendo-as de volta para a corrente sanguínea materna (129). Porém existem fármacos

substratos e inibidores da P-gp e podem ter seu transporte alterado se administrados concomitantemente (130).

Estudos tem pesquisado a interação da P-gp com os inibidores seletivos de recaptação da serotonina e sugerem que a FLX tem características de um inibidor desta P-gp (131). Um inibidor da P-gp, se administrado em conjunto com um substrato da P-gp, permitirá que este atravesse a barreira placentária chegando ao feto, proposta do estudo de Pinto et al. (2015)(132).

A transferência de medicamentos para a placenta é demonstrada através de cinco modelos, porém os modelos *ex vivo* e *in vivo* são os mais utilizados para avaliar a exposição fetal, pois comparam a razão sangue do cordão umbilical e plasma materno (F:M), podendo estimar assim, a porcentagem desta exposição (133–135). No entanto, modelos *in vivo* com animais não podem ser extrapolados para mulheres gestantes (136).

A biodisponibilidade e fatores farmacocinéticos podem influenciar a exposição dos fetos a fármacos administrados a mãe. FLX é um fármaco de meia-vida longa, o que pode levar a uma alta concentração de medicamento na circulação fetal por um tempo prolongado (136). Uma gestante classificada como metabolizadora lenta tem essa exposição ainda mais aumentada, o oposto também pode ocorrer caso a classificação seja de uma metabolizadora ultra rápida. Atualmente os clínicos tem um melhor conhecimento sobre essa diferença interindividual de metabolização, devido aos estudos de genótipo e fenótipo, ainda faltam estudos clínicos de antidepressivos, que tem sua prevalência em ascensão nos dias de hoje.

No presente estudo, avaliamos as razões entre as concentrações dos enantiômeros da FLX e os enantiômeros da NorFLX nos compartimentos materno-fetais. A mediana das razões ou seja a relação entre as concentrações plasmáticas oriundas da veia umbilical/veia materna, foram 0,44 para enantiômero (S)-(+)-FLX; 0,33 para enantiômero (R)-(-)-FLX; 0,37 para enantiômero (S)-(+)-NorFLX e 0,32 para enantiômero (R)-(-)-NorFLX (Tabelas 17 e 18), indicando uma transferência placentária deste medicamento, no máximo de 44% destacando que esta pesquisa foi realizada com dose única da fluoxetina racêmica, mas esta droga é acumulativa, atingindo seu estado de equilíbrio por volta de 23 dias de tratamento diário. As razões veia umbilical/espaco intervilosos foram 0,39 para o enantiômero (S)-(+)-FLX; 0,27 para enantiômero (R)-(-)-FLX e 0,34 para o enantiômero (S)-(+)-NorFLX e 0,27 para enantiômero (R)-(-)-NorFLX (Tabelas 17 e 18). No espaco intervilosos/veia materna foram observadas razões de 1,30 para o (S)-(+)-FLX; 1,28 para o (R)-(-)-FLX; 0,95 para o (S)-(+)-NorFLX e 1,06 para o (R)-(-)-NorFLX, com observação de proximidade das concentrações na veia materna e no espaco intervilosos (Figuras 13 e 14). Esta observação está de acordo com o estudo de Moisés et al. (2008)(137) de que o espaco intervilosos é uma região contínua da veia materna, pois o este fica localizado no sincitiotrofoblasto. Os

referidos autores reportaram para a lidocaína razões espaço interviloso/veia materna de 1,01 para gestantes normais e 0,88 para gestantes diabéticas.

As razões artéria umbilical/veia umbilical, calculadas para avaliar o metabolismo fetal, apresentaram valores de 0,74 para o enantiômero (S)-(+)-FLX; 0,86 para o (R)-(-)-FLX; 0,96 para o (S)-(+)-NorFLX e 0,87 para enantiômero (R)-(-)-NorFLX, mostrando não haver metabolismo fetal devido a uma relativa imaturidade hepática. Foram observadas diferenças estatísticas para os enantiômeros da FLX apenas nas razões veia umbilical/veia materna e veia umbilical/espaço interviloso e para os enantiômeros da NorFLX somente na razão veia umbilical/espaço interviloso, inferindo que provavelmente o tempo não foi suficiente para o metabolito se formar (Tabelas 17, 18 e Figuras 13, 14).

Pode-se também comparar a distribuição materno-fetais pela quantificação da razão enantiomérica das concentrações de FLX e NorFLX em LA e plasma materno. As amostras coletadas no momento do parto permitiram avaliar a transferência placentária destes fármacos (136). As razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno foram de aproximadamente 11% para ambos os enantiômeros da FLX e NorFLX em amostras de plasma e LA coletadas simultaneamente após a administração da dose única oral de 20 mg de fluoxetina racêmica (Tabelas 17, 18 e Figuras 13, 14). Não existem dados de concentrações enantiosseletivas de FLX e NorFLX em líquido amniótico humano para comparação dessa razão.

Durante o aleitamento materno, as mães suprem seus recém-nascidos com leite composto de nutrientes apropriados para o metabolismo do bebê, essenciais para o desenvolvimento do sistema imune e consequente prevenção de doenças. Além de favorecer o vínculo feto-mãe, muito importante para o desenvolvimento cognitivo e emocional. No entanto, mulheres em tratamento medicamentoso tem receio ou são desaconselhadas a amamentar, pelo fato de que o fármaco possa ser excretado no leite materno e passar para o bebê, outra matriz biológica importante a ser pesquisada (37,95,138).

O presente estudo mostrou que houve a excreção em baixas concentrações da FLX e NorFLX no leite materno coletado 24 horas após o parto, provavelmente devido ao desenho do estudo (Tabela 19 e Figura 15). As razões das concentrações leite materno/plasma materno, avaliadas como mistura enantiomérica, foram de 0,07 para a FLX e 0,66 para a NorFLX, demonstrando que há maior excreção do metabolito ativo por esta via, mas que a exposição do recém-nascido por meio do leite é relativamente baixa. Os achados de Heikkinen et al. (2003)(44), estudo realizado do quarto ao 14º dias após o parto com regime de dose múltipla de FLX (20-40 mg/dia), reportam maiores valores para a razão leite materno/plasma materno para a FLX (aproximadamente 0,6) e menores valores para a

NorFLX (aproximadamente 0,3) (44), confirmando que a administração de FLX em doses múltiplas inibe o seu próprio metabolismo (Tabela 19 e Figura 15).

- Os métodos de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e líquido amniótico empregando LC-MS/MS apresentaram LIQ compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética de dose única em gestantes. As concentrações plasmáticas dos enantiômeros de ambos os analitos foram quantificadas até 672 h após a administração de dose única de 20 mg do fármaco racêmico.
- A farmacocinética da FLX é enantiosseletiva em gestantes tratadas com dose única do fármaco racêmico com observação de maiores valores do tempo para atingir a concentração plasmática máxima (2,35 vs 4,41 h) e de meia-vida de eliminação (17,19 vs 24,72 h) e menores valores de *clearance* total aparente (1,45 vs 0,66 L/h/kg) para o enantiômero (R)-(-)-FLX.
- O metabolismo da FLX é enantiosseletivo em gestantes tratadas com dose única do fármaco racêmico com observação de maiores valores da área sob a curva concentração plasmática em função do tempo para o enantiômero (S)-(+)-NorFLX.
- A transferência placentária da FLX é enantiosseletiva com observação de maiores valores da razão veia umbilical/veia materna para o enantiômero (S)-(+)-FLX (0,44 vs 0,33).
- A transferência placentária do metabólito NorFLX não é enantiosseletiva com observação de razões veia umbilical/veia materna de 0,37 e 0,32, respectivamente para os enantiômeros (S)-(+) e (R)-(-).
- A distribuição dos enantiômeros da FLX e NorFLX no líquido amniótico é baixa com observação de razões de concentrações líquido amniótico/veia materna inferiores a 1%.
- A excreção no leite materno é favorecida para o metabólito NorFLX com observação de razões de concentrações leite/veia materna aproximadamente dez vezes maiores para o metabólito (0,66) quando comparado com o fármaco inalterado (0,07).

8. Referências Bibliográficas

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. In: APA, editor. DSM-IV-TR. 4th ed. Arlington VA; 2002.
2. Oberlander TF, Bonaguro RJ, Misri S, Papsdorf M, Ross CJD, Simpson EM. Infant serotonin transporter (SLC6A4) promoter genotype is associated with adverse neonatal outcomes after prenatal exposure to serotonin reuptake inhibitor medications. *Mol Psychiatry*. 2008 Jan;13(1):65–73.
3. Kari Laine, MD, PhD; Tuija Heikkinen, MD; Ulla Ekblad, MD, PhD; Pentti Kero, MD P. Effects of Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors During Pregnancy on Serotonergic Symptoms in Newborns and Cord Blood Monoamine. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(7):720–6.
4. Oberlander TF, Misri S, Fitzgerald CE, Kostaras X, Rurak D, Riggs W. Pharmacologic factors associated with transient neonatal symptoms following prenatal psychotropic medication exposure. *J Clin Psychiatry*. 2004 Feb;65(2):230–7.
5. Zeskind PS, Stephens LE. Maternal selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and newborn neurobehavior. *Pediatrics*. 2004 Feb;113(2):368–75.
6. Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*. 1967 Nov;113(504):1237–64.
7. Association AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. 2013.
8. Earls MF. Incorporating recognition and management of perinatal and postpartum depression into pediatric practice. *Pediatrics*. 2010 Nov 1;126(5):1032–9.
9. Smith T, Kipnis G. “Implementing a perinatal mood and anxiety disorders program.” *MCN Am J Matern Nurs*. 2012;37(3):199.
10. Burke KC, Burke JD, Rae DS, Regier DA. Comparing age at onset of major depression and other psychiatric disorders by birth cohorts in five US community populations. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 Sep;48(9):789–95.
11. Bergstrom et al RF. Relative bioequivalence of a fluoxetine oral solution versus the marketed capsule. *Pharm Res*. 1988;7(3):158.
12. Gemmel M, Rayen I, van Donkelaar E, Loftus T, Steinbusch HW, Kokras N, et al. Gestational stress and fluoxetine treatment differentially affect plasticity, methylation and serotonin levels in the PFC and hippocampus of rat dams. *Neuroscience*. 2016 Jul 7;327:32–43.
13. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*. 2003 Jun 18;289(23):3095–105.
14. Aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ*. 2009 Feb 3;180(3):305–13.

15. Nonacs R, Cohen LS. Depression during pregnancy: diagnosis and treatment options. *J Clin Psychiatry*. 2002 Jan;63 Suppl 7:24–30.
16. Cooper PJ, Murray L. Postnatal depression. *BMJ*. 1998 Jun 20;316(7148):1884–6.
17. Bloch M, Daly RC, Rubinow DR. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. *Compr Psychiatry*. 2003;44(3):234–46.
18. Gaynes BN, Gavin N, Meltzer-Brody S, Lohr KN, Swinson T, Gartlehner G, et al. Perinatal depression: prevalence, screening accuracy, and screening outcomes. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*. 2005 Feb;(119):1–8.
19. Menon SJ. Psychotropic medication during pregnancy and lactation. *Arch Gynecol Obstet*. 2008 Jan;277(1):1–13.
20. Sit D, Perel JM, Luther JF, Wisniewski SR, Helsel JC, Wisner KL. Disposition of chiral and racemic fluoxetine and norfluoxetine across childbearing. *J Clin Psychopharmacol*. 2010 Aug;30(4):381–6.
21. Bennett HA, Einarson A, Taddio A, Koren G, Einarson TR. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. *Obstet Gynecol*. 2004 Apr;103(4):698–709.
22. Cantilino A, Zambaldi CF, Sougey EB, Rennó Jr. J. Postpartum psychiatric disorders. *Arch Clin Psychiatry (São Paulo). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*; 37(6):288–94.
23. Figueiredo FP, Parada AP, Araujo LF de, Silva WA, Del-Ben CM. The Influence of genetic factors on peripartum depression: A systematic review. *J Affect Disord*. 2015 Mar 1;172:265–73.
24. Lancaster CA, Gold KJ, Flynn HA, Yoo H, Marcus SM, Davis MM. Risk factors for depressive symptoms during pregnancy: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Jan;202(1):5–14.
25. Flynn HA, Davis M, Marcus SM, Cunningham R, Blow FC. Rates of maternal depression in pediatric emergency department and relationship to child service utilization. *Gen Hosp Psychiatry*. 2004;26(4):316–22.
26. Simon GE, Cunningham ML, Davis RL. Outcomes of prenatal antidepressant exposure. *Am J Psychiatry*. 2002 Dec;159(12):2055–61.
27. Kim J, Riggs KW, Misri S, Kent N, Oberlander TF, Grunau RE, et al. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. *Br J Clin Pharmacol*. 2006 Feb;61(2):155–63.
28. Cornish a. M, McMahon C a., Ungerer J a., Barnett B, Kowalenko N, Tennant C. Postnatal depression and infant cognitive and motor development in the second postnatal year: The impact of depression chronicity and infant gender. *Infant Behav Dev*. 2005 Dec;28(4):407–17.
29. Berle JØ, Spigset O. Antidepressant Use During Breastfeeding. *Curr Womens Health*

- Rev. 2011 Feb;7(1):28–34.
30. ACOG Committee Opinion No. 343: psychosocial risk factors: perinatal screening and intervention. *Obstet Gynecol.* 2006 Aug;108(2):469–77.
 31. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA.* 1998 Apr 15;279(15):1200–5.
 32. Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jul;5(7):545–52.
 33. Spindelegger C, Lanzenberger R, Wadsak W, Mien LK, Stein P, Mitterhauser M, et al. Influence of escitalopram treatment on 5-HT 1A receptor binding in limbic regions in patients with anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 2009 Nov;14(11):1040–50.
 34. Olivier B, van Oorschot R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. *Eur J Pharmacol.* 2005 Dec 5;526(1-3):207–17.
 35. Gilman AG. Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 10th ed. Joel G. Hardman LEL, editor. Rio de Janeiro: MCGraw-Hill; 2005.
 36. Sahu PK, Wang C-H, Lee S-L. Interaction of serotonin and fluoxetine: toward understanding the importance of the chirality of fluoxetine (S form and R form). *J Phys Chem B.* 2009 Oct 29;113(43):14529–35.
 37. Moses-Kolko EL, Horner MS, Phillips ML, Hipwell AE, Swain JE. In search of neural endophenotypes of postpartum psychopathology and disrupted maternal caregiving. *J Neuroendocrinol.* 2014 Oct;26(10):665–84.
 38. Dott M, Rasmussen S a, Hogue CJ, Reefhuis J. Association between pregnancy intention and reproductive-health related behaviors before and after pregnancy recognition, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Matern Child Health J.* 2010 May;14(3):373–81.
 39. Wen SW, Yang Q, Garner P, Fraser W, Olatunbosun O, Nimrod C, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Apr;194(4):961–6.
 40. Pubchem. Fluoxetine - Compound Summary (CID 62857) [Internet]. 2005 [cited 2012 Oct 3]. Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=62857&loc=ec_rcs
 41. Bueno JS, Silva BJ., Queiroz MEC. Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Braz Chem Soc. Brazilian Chemical Society;* 2011 Jul;22(7):1221–8.
 42. Sommi RW, Crismon ML, Bowden CL. Fluoxetine: a serotonin-specific, second-generation antidepressant. *Pharmacotherapy.* 7(1):1–15.

43. Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2000 Jan;85(1):11–28.
44. Heikkinen T. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. *Clin Pharmacol Ther.* 2003 Apr;73(4):330–7.
45. DeVane CL. Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cell Mol Neurobiol.* 1999 Aug;19(4):443–66.
46. McConathy J, Owens MJ. Stereochemistry in Drug Action. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2003 Apr;5(2):70–3.
47. DeVane CL, Boulton DW. Great expectations in stereochemistry: focus on antidepressants. *CNS Spectr.* 2002 Apr;7(4 Suppl 1):28–33.
48. Wong DT, Fuller RW, Robertson DW. Fluoxetine and its two enantiomers as selective serotonin uptake inhibitors. *Acta Pharm Nord.* 1990 Jan;2(3):171–80.
49. Fuller RW, Snoddy HD, Krushinski JH, Robertson DW. Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neuropharmacology.* 1992 Oct;31(10):997–1000.
50. Margolis JM, O'Donnell JP, Mankowski DC, Ekins S, Obach RS. (R)-, (S)-, and Racemic Fluoxetine N-Demethylation by Human Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2000 Oct 1;28(10):1187–91.
51. Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, Binkley SN, VandenBranden M, Wrighton SA. Identification of the Human Cytochromes P450 Responsible for in Vitro Formation of R- and S-Norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Jun 1;297(3):1044–50.
52. Eap CB, Bondolfi G, Zullino D, Savary-Cosendai L, Powell-Golay K, Kosel M, et al. Concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine after multiple doses of fluoxetine in cytochrome P4502D6 poor and extensive metabolizers. *J Clin Psychopharmacol.* 2001 Jun;21(3):330–4.
53. Tanaka E, Hisawa S. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with psychoactive drugs: antidepressants and antipsychotics and the cytochrome P450 system. *J Clin Pharm Ther.* 1999 Feb;24(1):7–16.
54. Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. *Clin Pharmacokinet.* 2005 Jan;44(10):989–1008.
55. Wisner KL, Perel JM, Wheeler SB. Tricyclic dose requirements across pregnancy. *Am J Psychiatry.* 1993 Oct;150(10):1541–2.
56. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther.* 1997 Oct;62(4):400–7.
57. Rochat B, Amey M, Gillet M, Meyer UA, Baumann P. Identification of three cytochrome P450 isozymes involved in N-demethylation of citalopram enantiomers in human liver microsomes. *Pharmacogenetics.* 1997 Feb;7(1):1–10.

58. Sit DK, Perel JM, Helsel JC, Wisner KL. Changes in antidepressant metabolism and dosing across pregnancy and early postpartum. *J Clin Psychiatry*. 2008 Apr;69(4):652–8.
59. Freeman MP, Nolan PE, Davis MF, Anthony M, Fried K, Fankhauser M, et al. Pharmacokinetics of sertraline across pregnancy and postpartum. *J Clin Psychopharmacol*. 2008 Dec;28(6):646–53.
60. Altamura AC, Moro AR, Percudani M. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin Pharmacokinet*. 1994 Mar;26(3):201–14.
61. Scordo MG, Spina E, Dahl M-L, Gatti G, Perucca E. Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005 Nov;97(5):296–301.
62. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, Schmider J, Wright CE, Harmatz JS, et al. Human cytochromes mediating N-demethylation of fluoxetine in vitro. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997 Aug;132(4):402–7.
63. Henry ME, Schmidt ME, Hennen J, Villafuerte RA, Butman ML, Tran P, et al. A comparison of brain and serum pharmacokinetics of R-fluoxetine and racemic fluoxetine: A 19-F MRS study. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Aug;30(8):1576–83.
64. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, Mayle DA, Krushinski JH, Robertson DW. Norfluoxetine enantiomers as inhibitors of serotonin uptake in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 1993 Jun;8(4):337–44.
65. Fjordside L, Jeppesen U, Eap CB, Powell K, Baumann P, Brøsen K. The stereoselective metabolism of fluoxetine in poor and extensive metabolizers of sparteine. *Pharmacogenetics*. 1999 Feb;9(1):55–60.
66. Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, Binkley SN, VandenBranden M, Wrighton SA. Identification of the human cytochromes p450 responsible for in vitro formation of R- and S-norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jun;297(3):1044–50.
67. Caccia S, Cappi M, Fracasso C, Garattini S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990 Jan;100(4):509–14.
68. Mårtensson B, Nyberg S, Toresson G, Brodin E, Bertilsson L. Fluoxetine treatment of depression. Clinical effects, drug concentrations and monoamine metabolites and N-terminally extended substance P in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatr Scand*. 1989 Jun;79(6):586–96.
69. Lundmark J, Reis M, Bengtsson F. Serum concentrations of fluoxetine in the clinical treatment setting. *Ther Drug Monit*. 2001 Apr;23(2):139–47.
70. Bergstrom RF, Lemberger L, Farid NA, Wolen RL. Clinical pharmacology and

- pharmacokinetics of fluoxetine: a review. *Br J Psychiatry Suppl.* 1988 Sep;(3):47–50.
71. Beasley CM, Bosomworth JC, Wernicke JF. Fluoxetine: relationships among dose, response, adverse events, and plasma concentrations in the treatment of depression. *Psychopharmacol Bull.* 1990 Jan;26(1):18–24.
 72. Stika CS, Frederiksen MC. Drug Therapy in Pregnant and Nursing Women. In: *Principles of Clinical Pharmacology.* 2007. p. 339–56.
 73. Hunt JN, Murray FA. Gastric function in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1958 Feb;65(1):78–83.
 74. Parry E, Shields R, Turnbull AC. Transit time in the small intestine in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1970 Oct;77(10):900–1.
 75. Dawes Bsc M, Chowienczyk Bsc PJ. Pharmacokinetics in pregnancy Lecturer in Clinical Pharmacology.
 76. Lund CJ, Donovan JC. Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. *Am J Obstet Gynecol.* 1967 Jun 1;98(3):394–403.
 77. Mendenhall HW. Serum protein concentrations in pregnancy. I. Concentrations in maternal serum. *Am J Obstet Gynecol.* 1970 Feb 1;106(3):388–99.
 78. Frederiksen MC, Ruo TI, Chow MJ, Atkinson AJ. Theophylline pharmacokinetics in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther.* 1986 Sep;40(3):321–8.
 79. Wood M, Wood AJ. Changes in plasma drug binding and alpha 1-acid glycoprotein in mother and newborn infant. *Clin Pharmacol Ther.* 1981 Apr;29(4):522–6.
 80. Buster JE, Abraham GE. The applications of steroid hormone radioimmunoassays to clinical obstetrics. *Obstet Gynecol.* 1975 Oct;46(4):489–99.
 81. Devroey P, Camus M, Palermo G, Smitz J, Van Waesberghe L, Wisanto A, et al. Placental production of estradiol and progesterone after oocyte donation in patients with primary ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Jan;162(1):66–70.
 82. Tulchinsky D, Hobel CJ. Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1973 Dec 1;117(7):884–93.
 83. Schneider MA, Davies MC, Honour JW. The timing of placental competence in pregnancy after oocyte donation. *Fertil Steril.* 1993 May;59(5):1059–64.
 84. Davison JM, Hytten FE. Glomerular filtration during and after pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1974 Aug;81(8):588–95.
 85. Davison JM, Hytten FE. The effect of pregnancy on the renal handling of glucose. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975 May;82(5):374–81.
 86. Morgan DJ. Drug disposition in mother and foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997 Nov;24(11):869–73.
 87. Thornburg KL, Faber JJ. The steady state concentration gradients of an electron-

- dense marker (ferritin in the three-layered hemochorial placenta of the rabbit. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1976 Oct;58(4):912–25.
88. Callen PW. *Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology*. 4th ed. W.B. S, editor. London: Elsevier Health Sciences; 2000. 1104 p.
 89. Hostetter A, Ritchie JC, Stowe ZN. Amniotic fluid and umbilical cord blood concentrations of antidepressants in three women. *Biol Psychiatry*. 2000 Nov;48(10):1032–4.
 90. Loughhead AM, Fisher AD, Newport DJ, Ritchie JC, Owens MJ, DeVane CL, et al. Antidepressants in amniotic fluid: another route of fetal exposure. *Am J Psychiatry*. American Psychiatric Publishing; 2006 Jan 1;163(1):145–7.
 91. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, et al. Human milk secretory immunoglobulin a and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J Nutr*. 2013 Dec;143(12):1906–12.
 92. Kramer MS. “Breast is best”: The evidence. *Early Hum Dev*. 2010 Nov;86(11):729–32.
 93. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2005 Feb 1;115(2):496–506.
 94. Ito S, Lee A. Drug excretion into breast milk—Overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Apr;55(5):617–27.
 95. Thomas AE, McKay DA, Cutlip MB. A nomograph method for assessing body weight. *Am J Clin Nutr*. 1976 Mar;29(3):302–4.
 96. ATALAH SE et al. Propuesta de um nuevo estandar de evaluación nutricional em embarazadas. *Rev Med Chile*. 1997;125:1429–36.
 97. Wilhelm SM, Kale-Pradhan PB. Estimating creatinine clearance: a meta-analysis. *Pharmacotherapy*. 2011 Jul;31(7):658–64.
 98. Camelo Júnior JS, Martinez FE, Jorge SM, de Sala MM. A new method for sampling maternal blood in the placental intervillous space. *Fetal Diagn Ther*. 1995;10(5):322–5.
 99. Cardoso JLC, Lanchote VL, Pereira MPM, Capela JMV, Lepera JS. Influence of gasoline inhalation on the enantioselective pharmacokinetics of fluoxetine in rats. *Chirality*. 2013 Mar;25(3):206–10.
 100. Ministério da Saúde. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Brasília - DF: ANVISA; 2012 p. 93.
 101. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA, Comm Med Prod Hum Use. 2012;44(July 2011):1–23.
 102. Guidance for Industry:bioanalytical method validation. Food and Drug Administration. 2001.
 103. Truffelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. Jan;30(3):491–509.

104. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv. 2001;(May):4–10.
105. Food and Drug Administration. Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues. Guid Ind. 2003;118.
106. Brasil MDS. Atenção ao pré-natal de baixo risco. Editora do Ministério da Saúde, 2012. 2012. 318 p.
107. Claus BOM, Hoste EA, Colpaert K, Robays H, Decruyenaere J, De Waele JJ. Augmented renal clearance is a common finding with worse clinical outcome in critically ill patients receiving antimicrobial therapy. *J Crit Care*. 2013 Oct;28(5):695–700.
108. Darby RAJ, Callaghan R, McMahon RM. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. *Curr Drug Metab*. 2011 Oct;12(8):722–31.
109. Santos AC, O’Gorman DA FM. Obstetric Anesthesia. In: Barash PG, Cullen BF SR, editor. *Clinical Anesthesia*. 4th ed. Philadelphia; 2001.
110. Unceta N, Barrondo S, Ruiz de Azúa I, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Sallés J, et al. Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Jun 1;852(1-2):519–28.
111. Gatti G, Bonomi I, Marchiselli R, Fattore C, Spina E, Scordo G, et al. Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2002 Feb 5;784(2):375–83.
112. Jannuzzi G, Gatti G, Magni P, Spina E, Pacifici R, Zuccaro P, et al. Plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine: sources of variability and preliminary observations on relations with clinical response. *Ther Drug Monit*. 2002 Oct;24(5):616–27.
113. Pichini S, Pacifici R, Altieri I, Pellegrini M, Zuccaro P. Stereoselective Determination of Fluoxetine and Norfluoxetine Enantiomers in Plasma Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. Taylor & Francis Group; 1996 Jul 23;19(12):1927–35.
114. Chow TW, Szeitz A, Rurak DW, Riggs KW. A validated enantioselective assay for the simultaneous quantitation of (R)-, (S)-fluoxetine and (R)-, (S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Elsevier B.V.; 2011 Feb 15;879(5-6):349–58.
115. Kim J, Riggs KW, Rurak DW. Stereoselective pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in pregnant sheep. *Drug Metab Dispos*. 2004

- Feb;32(2):212–21.
116. Kim J, Axelson J, Kerns G, Yin W, Rurak D. Stereoselective determination of fluoxetine and norfluoxetine by gas chromatography with mass selective detection. In: *Pharm Res*. 1995. p. 12:S22.
 117. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Sep;4(9):764–74.
 118. Ke AB, Rostami-Hodjegan A, Zhao P, Unadkat JD. Pharmacometrics in pregnancy: An unmet need. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:53–69.
 119. Perez-Caballero L, Torres-Sanchez S, Bravo L, Mico JA, Berrocoso E. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov*. 2014 May;9(5):567–78.
 120. Aronoff GR, Bergstrom RF, Pottratz ST, Sloan RS, Wolen RL, Lemberger L. Fluoxetine kinetics and protein binding in normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther*. 1984 Jul;36(1):138–44.
 121. Lemberger L, Farid NA, Bergstrom RF, Wolen RL. Fluoxetine, pharmacology and physiologic disposition. *Int J Obes*. 1987 Jan;11 Suppl 3:157–61.
 122. Frishman WH, Elkayam U, Aronow WS. Cardiovascular drugs in pregnancy. *Cardiol Clin*. 2012 Aug;30(3):463–91.
 123. Sager JE, Lutz JD, Foti RS, Davis C, Kunze KL, Isoherranen N. Fluoxetine- and norfluoxetine-mediated complex drug-drug interactions: in vitro to in vivo correlation of effects on CYP2D6, CYP2C19, and CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Jun;95(6):653–62.
 124. Little BB. Pharmacokinetics during pregnancy: evidence-based maternal dose formulation. *Obstet Gynecol*. 1999 May;93(5 Pt 2):858–68.
 125. Shi S, Liu Y, Wu J, Li Z, Zhao Y, Zhong D, et al. Comparative bioavailability and tolerability of a single 20-mg dose of two fluoxetine hydrochloride dispersible tablet formulations in fasting, healthy Chinese male volunteers: an open-label, randomized-sequence, two-period crossover study. *Clin Ther*. 2010 Oct;32(11):1977–86.
 126. Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *J Clin Pharmacol*. 1999 Dec;39(12):1203–11.
 127. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5337–9.
 128. St-Pierre M V, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Oct;279(4):R1495–503.
 129. Ushigome F, Takanaga H, Matsuo H, Yanai S, Tsukimori K, Nakano H, et al. Human

- placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol*. 2000 Nov 10;408(1):1–10.
130. Weiss J, Dormann S-MG, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyavash N, Haefeli WE. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Apr;305(1):197–204.
 131. Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, Dormann S-MG, Haefeli WE. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Oct;307(1):262–7.
 132. Pinto LS. Influência da inibição da glicoproteína-P pela fluoxetina na disposição cinética dos enantiômeros da fexofenadina em parturientes e suas relações com a transferência placentária. 2015;105.
 133. Prouillac C, Lecoœur S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos*. 2010 Oct;38(10):1623–35.
 134. Etwel F, Hutson JR, Madadi P, Gareri J, Koren G. Fetal and perinatal exposure to drugs and chemicals: novel biomarkers of risk. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:295–315.
 135. Staud F, Ceckova M. Regulation of drug transporter expression and function in the placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015 Apr;11(4):533–55.
 136. Ewing G, Tatarchuk Y, Appleby D, Schwartz N, Kim D. Placental transfer of antidepressant medications: implications for postnatal adaptation syndrome. *Clin Pharmacokinet*. 2015 Apr;54(4):359–70.
 137. Moisés ECD, Duarte LDB, Cavalli RDC, Marques MP, Lanchote VL, Duarte G, et al. Pharmacokinetics of lidocaine and its metabolite in peridural anesthesia administered to pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Dec;64(12):1189–96.
 138. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, et al. Human milk secretory immunoglobulin a and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J Nutr*. 2013 Dec 1;143(12):1906–12.

ANEXO A - Aprovação do departamento de ginecologia e obstetrícia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



Ribeirão Preto, 01 de novembro de 2012.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Elaine Christine Dantas Moisés

Prezada Professora,

O projeto intitulado "Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes portadoras de diabetes mellitus gestacional", protocolado sob nº 386 de sua autoria foi analisado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Informamos que o projeto foi APROVADO no dia 01/11/12 para ser desenvolvido em nosso Departamento, devendo ser enviado à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para análise, antes do início da coleta de dados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira
Presidente da Comissão de Pesquisa do Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP

ANEXO B – Aprovação do comitê de ética e pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 05 de dezembro de 2012

Ofício nº 4306/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 14806/2012

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **"ESTUDO FARMACOCINÉTICO E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO TRANSPLENTÁRIA DA FLUOXETINA E SEU METABÓLITO EM GESTANTES PORTADORAS DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 357ª Reunião Ordinária realizada em 03/12/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

DANIELA MIARELLI CARVALHO
PROFª DRª ELAINE CHRISTINE DANTAS MOISÉS (Orientadora)
Depto. de Ginecologia e Obstetria

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do estudo: Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes portadoras de diabetes *mellitus* gestacional.

Nome da Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo–HCFMRP-USP -
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Nome completo da paciente: _____

Registro da paciente na instituição: _____

Pesquisadores: Orientadora: Profa Dra Elaine Christine Dantas Moisés – (16) 3602-2587
Pós-graduanda: Daniela Miarelli Carvalho (FMRP-USP) – (16) 3602-2583/98126-6663

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente Termo de Consentimento Pós-informado tem a finalidade de convidá-la a participar do estudo “**Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes portadoras de diabetes *mellitus* gestacional**” e de solicitar a sua autorização para a administração de medicamentos, realização de procedimentos e exames complementares, conforme texto a seguir:

A senhora, se encontra sob seguimento de pré-natal em um dos ambulatórios de Gestação de Alto Risco do Setor de Obstetrícia do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), onde será internada no momento oportuno para o parto de seu (sua) filho (a) pela via mais adequada.

Alguns remédios utilizados podem ser permanecer por um tempo maior ou menor no organismo da mulher durante a gravidez e podem ou não atravessar a placenta. O objetivo deste trabalho é avaliar a quantidade de fluoxetina, medicamento utilizado durante a gestação para tratamento de depressão, no seu organismo e se é transferido para o (a) seu (sua) filho (a) através da placenta. O estudo pretende verificar a influência que a gravidez e o diabetes *mellitus* podem causar nas ações deste remédio. Para isso, iremos comparar a passagem pela placenta da fluoxetina em parturientes portadoras ou não de diabetes *mellitus* gestacional.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, nós iremos colher uma amostra de sangue da veia do seu braço para realização de exames que avaliam a função de órgãos do seu corpo, relacionados com as ações deste medicamento. Posteriormente, iremos administrar um comprimido de 20 mg de fluoxetina via oral (pela boca), e realizar coletas de amostras de urina (3 mL) e de sangue (medida de uma colher de sopa) da veia do seu braço em tempos predeterminados por 672 horas (28 dias) para dosagem do agente citado, sendo as primeiras 12 horas realizadas de maneira sequencial com a senhora internada, e as demais coletas em retornos ambulatoriais após 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 e 28 dias.

No dia do seu parto, será administrada outra dose 20 mg de fluoxetina e coletadas amostras do sangue do cordão umbilical, após nascimento do seu filho (a) e saída da placenta, para dosar a quantidade deste medicamento presente na criança, além de amostras de líquido amniótico. Serão coletadas amostras de urina e leite materno 24 horas após a ingestão do remédio.

Os únicos inconvenientes desta pesquisa serão a permanência no hospital nas primeiras 12 horas, a necessidade de comparecimento nos retornos agendados e as picadas da agulha para a coleta das amostras. A pesquisa não interferirá na conduta clínica a ser conduzida no caso da senhora e não ocasionará riscos adicionais à senhora e ao (à) seu (sua) filho (a), uma vez que doses únicas e baixas de fluoxetina apresentarão concentrações no sangue abaixo de algum efeito terapêutico e/ou adverso observável.

Eu me comprometo a identificar os dados coletados a respeito da senhora de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso os seus registros serão identificadas por meio do número do seu prontuário médico. A senhora me passará todos os dados de como posso lhe encontrar e garanto fornecer as informações de seu interesse. Agradeço a colaboração, colocando-me à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessário.

Atenciosamente,

Daniela Miarelli Carvalho

HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3900, Telefone (16) 3602-2583/8126-6663

Certificado de Consentimento

Eu, _____

_____, Prontuário: _____, moradora na rua _____, nº _____, bairro _____, cidade _____, telefone _____, abaixo assinado, declaro que os objetivos e detalhes deste estudo foram explicados a mim. Eu entendo que não sou obrigada a participar do estudo e que posso desistir de continuar nele a qualquer momento, sem que isso prejudique meu atendimento médico. Meu nome não será utilizado nos documentos deste estudo e a confidencialidade dos meus registros médico garantida.

Tendo recebido as informações acima, concordo em participar do estudo “Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da fluoxetina e seu metabólito em gestantes portadoras de diabetes *mellitus* gestacional” e estou ciente da liberdade de me expressar durante o mesmo, favorável ou contrariamente aos procedimentos e de desistir do estudo em qualquer fase do mesmo.

Declaro que em/...../..... concordei voluntariamente em participar do projeto de pesquisa acima referido e que fui devidamente informado de todos os detalhes.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura da paciente

Assinatura do responsável legal (se aplicável)

APÊNDICE B – Características individuais das gestantes investigadas.**Tabela I** – Características individuais das nove gestantes

Gestantes	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	IG durante a coleta (s;d)	IG no dia do parto (s;d)	Medicamentos Associados
1	30	28	34s	40s6d	1,2
2	18	32	34s6d	41s	1,2
3	36	32	37s	40s5d	2
4	40	28	34s	38s3d	1,2
5	19	22	35s	40s	1,2
6	31	30	31s	40s6d	1,2
7	30	24	32s4d	40s	1,2,3
8	34	24	31s1d	39s1d	1,2
9	40	32	32s	38s	1,2

IMC: índice de massa corporal; IG: idade gestacional (s: semanas; d: dias); fármacos associados:
 1: ácido fólico; 2: sulfato ferroso; 3: Espiramicina

APÊNDICE C – Parâmetros bioquímicos e hematológicos utilizados para a avaliação da normalidade dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino.

Tabela II – Dados bioquímicos individuais das nove gestantes

Gestantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ureia (mg/dL)	11,00	-	13,00	20,00	13,00	7,00	12,00	17,00	9,00
Creatinina (mg/dL)	0,61	-	0,58	0,45	0,54	0,59	0,50	0,42	0,55
Clearance creatinina	161,69	-	154,32	174,46	171,95	157,91	198,82	193,33	172,04
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,40	-	1,10	0,79	0,62	0,50	0,23	0,26	0,26
Bilirrubina Direta(mg/dL)	0,10	-	0,19	0,18	0,17	0,11	0,08	0,06	0,09
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,30	-	0,91	0,61	0,46	0,39	0,15	0,20	0,17
TGO/AST (U/L)	20,20	-	12,20	15,00	12,80	17,90	14,70	10,60	15,60
TGP/ALT (U/L)	8,10	-	4,50	10,80	17,50	15,00	15,10	7,90	11,60
Albumina (g/dL)	3,60	-	3,50	4,10	3,90	3,60	3,70	3,60	3,80
Glicemia (mg/dL)	82,00	-	74,00	89,00	68,00	91,00	84,00	72,00	74,00
Hb glicosilada (%)	-	-	5,70	5,10	4,50	5,20	5,40	4,60	5,20
Gama-GT (mg/dL)	10,00	-	13,00	13,00	12,00	10,00	13,00	6,00	42,00
Alfa1-glicoproteína ácida(mg/dL)	45,70	-	31,60	59,60	45,00	45,10	72,40	74,30	54,60
Fosfatase Alcalina (U/L)	266,00	-	267,00	192,00	264,00	246,00	176,00	157,00	248,00
Proteínas totais(g/dL)	5,80	-	6,00	7,50	6,70	5,80	6,40	6,10	6,40
Hemoglobina (g/dL)	11,30	8,60	10,60	13,30	13,00	12,40	10,70	10,90	12,10
Hematócrito (%)	34,00	26,00	32,00	40,00	38,00	36,00	31,00	32,00	35,00
Plaquetas (x10 ³ /μL)	196,00	269,00	188,00	343,00	167,00	246,00	283,00	130,00	229,00

APÊNDICE D – Características dos recém-nascidos das gestantes investigadas.**Tabela III - Características individuais dos recém-nascidos das nove gestantes.**

Gestantes	Peso do RN (kg)	Estatura (cm)	Peso da placenta (g)	Apgar (1/5 minutos)
1	3,81	53,50	855	9/10
2	3,00	47,00	500	9/10
3	3,35	49,50	600	9/9
4	2,40	45,00	420	10/10
5	3,30	51,50	750	10/10
6	3,20	50,00	430	9/10
7	3,22	49,00	430	10/10
8	3,18	50,00	495	9/10
9	3,30	48,00	550	10/10

APÊNDICE G – Dados individuais do enantiômero (S)-(+)-Norfluoxetina após a ingestão oral, de dose única 20 mg fluoxetina racêmica nas nove gestantes investigadas.

Tabela VI – Valores individuais das concentrações plasmática *versus* tempo do enantiômero (S)-(+)-Norfluoxetina

(S)-(+)-Norfluoxetina (ng/mL)	Gestante 1	Gestante 2	Gestante 3	Gestante 4	Gestante 5	Gestante 6	Gestante 7	Gestante 8	Gestante 9
T2	1,84	0,04	2,65	1,52	6,39	3,38	4,13	1,30	3,45
T3	3,43	0,11	3,02	3,01	10,56	4,82	10,36	2,07	5,90
T4	3,92	0,33	3,89	3,59	8,60	5,79	12,46	2,77	6,12
T5	5,34	0,84	5,62	4,58	8,11	-	15,33	2,95	5,32
T6	5,47	1,38	5,32	4,13	8,85	4,77	12,78	2,60	8,19
T7	4,94	1,47	5,54	5,42	7,82	5,76	14,26	2,98	7,18
T8	5,45	1,65	5,90	4,46	5,99	5,97	14,20	3,19	4,55
T10	5,82	1,73	6,76	3,62	7,53	7,27	10,91	4,12	4,55
T12	5,03	1,62	6,13	5,11	7,33	8,26	10,97	3,64	5,89
T24	4,74	2,18	6,39	5,33	8,40	4,87	9,15	5,08	5,11
T48	4,42	3,04	4,22	5,02	5,82	5,69	5,33	5,89	3,63
T72	3,21	2,75	5,15	5,63	4,68	4,23	4,07	5,59	3,19
T96	2,92	2,94	5,27	4,00	3,87	4,61	3,34	4,83	1,90
T168	1,39	1,90	3,66	3,13	2,00	2,50	1,04	4,26	0,48
T336	0,28	0,98	-	0,86	0,33	0,53	-	2,57	0,09
T504	-	0,28	-	0,35	-	0,12	-	1,79	-
T672	-	0,13	-	-	-	-	-	0,60	-

APÊNDICE H – Dados individuais do enantiômero (R)-(-)-Norfluoxetina após a ingestão oral, de dose única 20 mg fluoxetina racêmica nas nove gestantes investigadas.

Tabela VII – Valores individuais das concentrações plasmática *versus* tempo do enantiômero (R)-(-)-Norfluoxetina

(R)-(-)-Norfluoxetina (ng/mL)	Gestante 1	Gestante 2	Gestante 3	Gestante 4	Gestante 5	Gestante 6	Gestante 7	Gestante 8	Gestante 9
T2	0,66	0,04	0,69	0,66	2,57	2,02	1,45	0,83	1,11
T3	1,32	0,12	0,82	1,39	4,25	2,91	4,14	1,29	2,07
T4	1,58	0,38	1,21	1,62	3,50	3,35	5,27	1,65	2,15
T5	2,30	1,04	1,95	2,07	3,13	-	7,17	1,69	2,12
T6	2,47	1,75	1,88	1,87	3,52	2,51	6,49	1,51	3,20
T7	2,32	1,86	1,92	2,44	3,13	3,04	7,60	1,64	2,78
T8	2,65	2,07	2,04	2,07	2,30	3,02	7,97	1,74	1,81
T10	2,93	1,96	2,19	1,68	3,13	3,61	6,59	2,22	1,84
T12	2,63	1,66	1,99	2,24	2,94	4,07	6,75	2,00	2,76
T24	2,71	1,86	2,55	2,56	3,66	2,59	7,48	2,75	2,73
T48	3,04	2,01	1,89	2,35	2,70	2,94	5,72	3,29	2,09
T72	2,37	1,75	2,44	2,81	2,48	2,41	5,51	3,26	1,73
T96	2,20	1,69	2,53	1,87	1,99	2,18	5,44	2,90	0,97
T168	1,09	0,83	1,75	1,41	1,02	1,26	3,15	2,69	0,22
T336	0,21	0,26	-	0,20	0,18	0,22	0,96	1,59	-
T504	-	0,08	-	0,10	-	-	0,27	1,14	-
T672	-	0,14	-	-	-	-	0,11	0,41	-

APÊNDICE I – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da fluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica.

Tabela VIII – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da fluoxetina

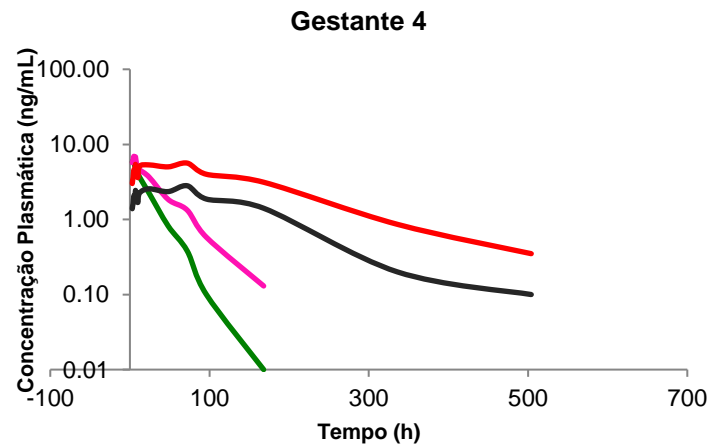
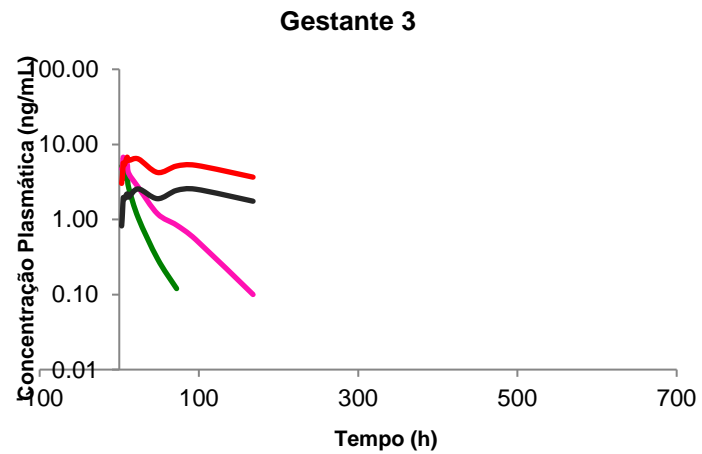
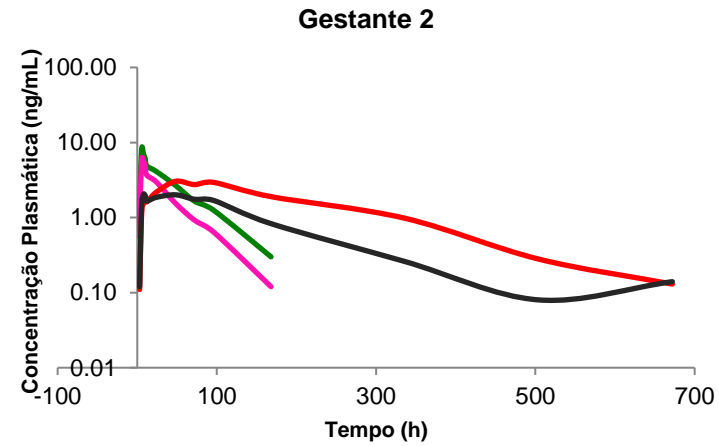
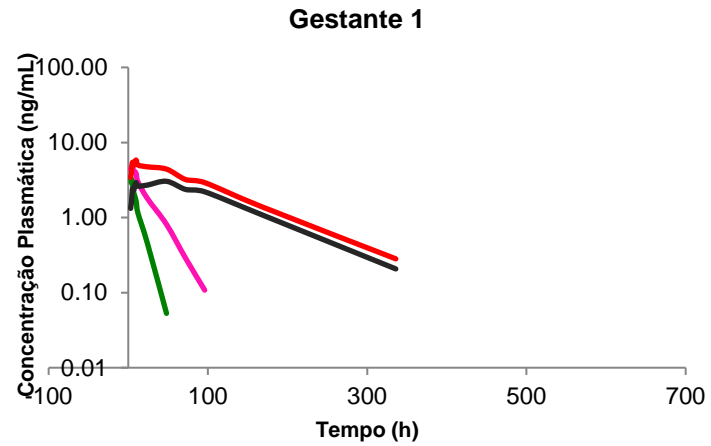
Gestantes Parâmetros Farmacocinéticos	(S)-(+)-Fluoxetina									(R)-(-)-Fluoxetina								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C_{max} (ng/mL)	3.13	6.82	6.05	5.94	11.40	11.53	2.11	11.77	4.95	4.53	5.09	5.94	6.24	8.93	9.38	5.19	10.79	5.68
T_{max} (h)	3,01	8,18	1,86	4,17	1,39	0,81	2,70	2,35	2,04	5,08	9,14	4,51	5,44	1,61	1,94	4,41	2,83	3,16
AUC^{0-∞} (ng.h/mL)	40,42	377,19	94,64	148,15	97,81	165,20	21,03	351,22	38,66	124,50	233,86	209,24	265,18	152,65	260,75	103,26	476,64	84,85
K_a (h ⁻¹)	0,45	0,15	0,11	0,36	0,63	0,16	0,39	0,63	0,23	0,30	0,13	0,11	0,25	0,78	0,76	0,24	0,56	0,36
T_{1/2α} (h)	1,54	4,66	6,45	1,94	1,10	4,29	1,78	1,09	3,01	2,33	5,37	6,13	2,76	0,89	0,92	2,91	1,23	1,93
K_{el} (h ⁻¹)	0,09	0,01	0,04	0,04	0,06	0,04	0,05	0,03	0,10	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04	0,03	0,04	0,02	0,04
t_{1/2β} (h)	8,07	48,08	19,04	17,19	11,38	17,22	13,74	25,35	7,24	17,53	42,38	32,84	30,66	18,93	24,72	17,59	36,28	18,55
V_d/f/Kg (L/Kg)	31,15	18,37	25,20	22,28	19,00	16,10	57,47	14,31	18,80	23,93	22,71	26,28	23,25	24,18	17,73	22,96	15,39	24,92
Cl/f/Kg (L/h/Kg)	3,26	0,31	1,45	1,02	1,57	0,84	6,21	0,42	3,23	1,06	0,50	0,66	0,57	1,01	0,53	1,27	0,31	1,47

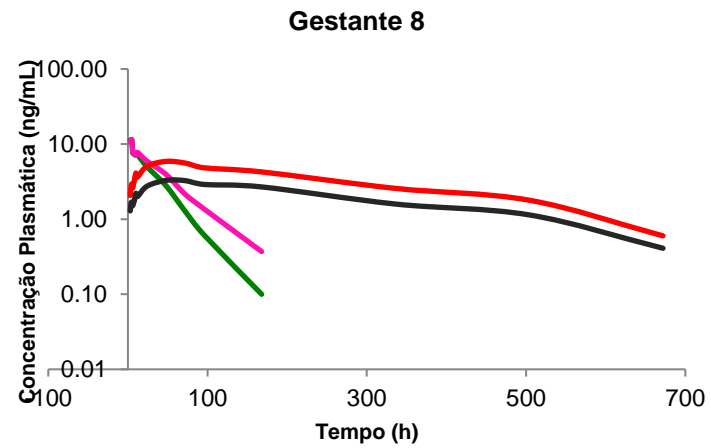
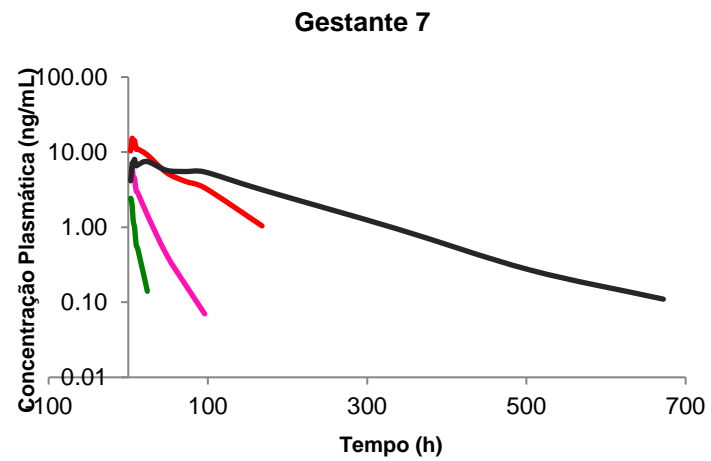
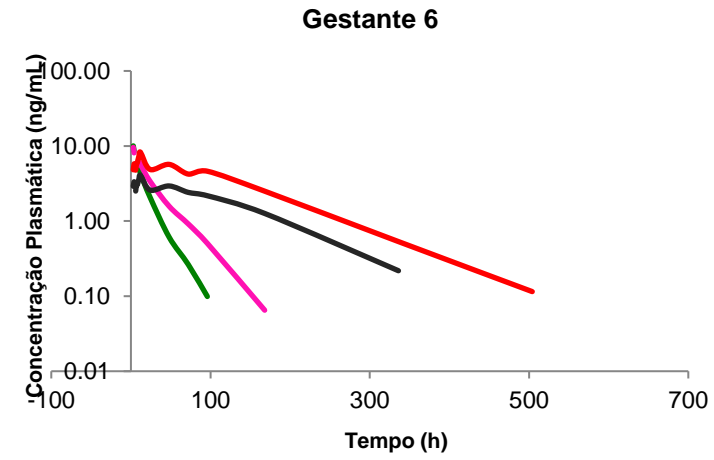
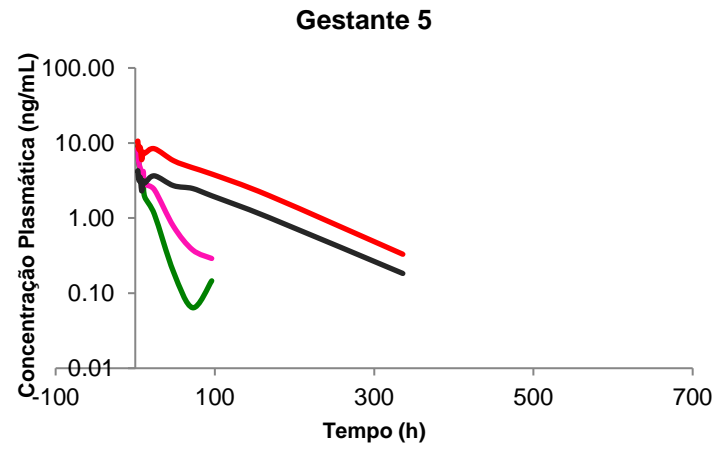
APÊNDICE J – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da norfluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica.

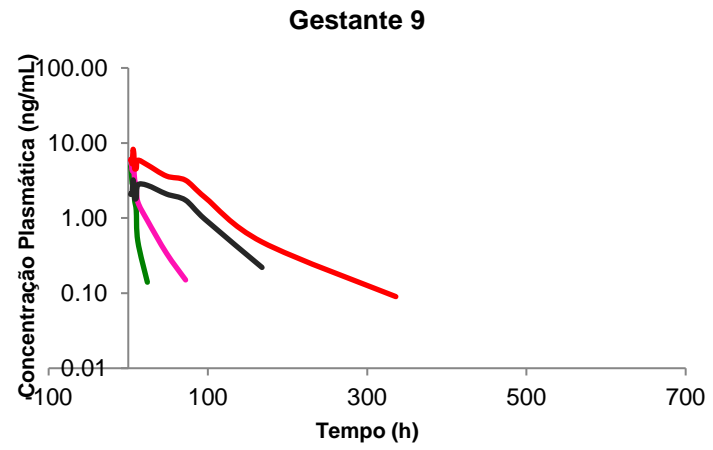
Tabela IX – Dados individuais dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da norfluoxetina

		(S)-(+)-Norfluoxetina									(R)-(-)-Norfluoxetina								
Gestante		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Parâmetros Farmacocinéticos																			
C_{max} (ng/mL)		5,72	3,25	6,42	6,22	8,65	7,39	12,72	5,80	6,29	3,53	2,06	2,57	3,10	3,64	3,69	8,00	3,29	3,23
T_{max} (h)		13,66	49,90	17,17	20,81	4,61	13,64	7,69	33,10	7,26	23,18	21,65	25,96	22,86	5,69	10,71	16,35	32,16	14,21
AUC^{0-∞} (ng.h/mL)		689,93	802,81	1794,1	1172,1	942,70	996,34	888,78	2171,3	520,39	477,53	498,55	1179,1	502,09	451,28	498,58	1338,1	1360,3	246,12
K_{el} (h ⁻¹)		0,009	0,005	0,004	0,006	0,010	0,008	0,016	0,003	0,013	0,009	0,005	0,002	0,007	0,008	0,008	0,007	0,003	0,017
T_{1/2β} (h)		73,43	131,57	181,41	115,21	72,30	83,48	42,75	235,42	52,06	75,99	152,13	299,61	95,15	81,87	85,85	103,94	263,11	41,69

APÊNDICE K – Gráficos individuais das concentrações versus o tempo para os enantiômeros da FLX e NorFLX das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica.







— (S)-(+)-FLX — (S)-(+)-NorFLX
— (R)-(-)-FLX — (R)-(-)-NorFLX

APÊNDICE L – Dados individuais da distribuição entre os diferentes compartimentos maternos e fetais dos enantiômeros da fluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.

Tabela X – Dados individuais da excreção fetal dos enantiômeros da fluoxetina em plasma e líquido amniótico

		(S)-(+)-Fluoxetina									(R)-(-)-Fluoxetina								
Gestantes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Compartimentos Materno-Fetais																			
Plasma materno (ng/mL)		1,95	3,40	2,45	1,41	1,25	0,08	0,87	8,11	2,03	2,48	2,03	1,87	1,09	1,49	0,08	0,90	5,54	3,23
Plasma veia umbilical (ng/mL)		1,00	1,96	1,17	0,44	0,39	0,04	0,23	3,48	0,89	0,82	1,03	0,50	0,30	0,44	0,03	0,21	1,89	1,17
Plasma artéria umbilical (ng/mL)		0,87	1,98	0,76	0,31	0,29	0,01	0,26	3,92	0,63	0,70	1,08	0,35	0,28	0,30	0,01	0,24	2,04	0,91
Plasma espaço intervilososo (ng/mL)		2,59	4,96	3,19	1,48	0,95	0,30	1,13	8,21	2,28	2,99	3,82	2,59	1,42	1,15	0,29	1,15	6,29	3,43
LA (ng/mL)		-	0,02	0,41	-	0,03	-	-	0,94	-	-	0,01	0,33	-	0,03	-	-	0,63	-

APÊNDICE M – Dados individuais da distribuição entre os diferentes compartimentos maternos e fetais dos enantiômeros da norfluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.

Tabela XI – Dados individuais da excreção fetal dos enantiômeros da norfluoxetina em plasma e líquido amniótico

		(S)-(+)-Norfluoxetina									(R)-(-)-Norfluoxetina								
Gestantes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Compartimentos Materno-Fetais																			
Plasma materno (ng/mL)		2,66	0,51	5,11	0,58	1,96	0,02	1,54	1,84	6,04	0,96	0,55	1,61	0,20	0,86	0,02	0,45	0,97	2,60
Plasma veia umbilical (ng/mL)		0,98	0,25	1,15	0,17	0,47	0,02	0,21	0,77	2,34	0,31	0,24	0,33	0,06	0,24	0,01	0,06	0,38	1,05
Plasma artéria umbilical (ng/mL)		1,02	0,27	0,86	0,11	0,40	0,02	0,24	0,74	1,79	0,32	0,24	0,25	0,04	0,19	0,01	0,08	0,33	0,76
Plasma espaço intervilo (ng/mL)		2,74	0,74	4,53	0,45	1,39	0,08	1,23	1,76	5,82	1,11	0,85	1,72	0,22	0,63	0,04	0,40	1,03	2,74
LA (ng/mL)		-	-	0,59	-	-	-	-	0,26	-	-	-	0,18	-	-	-	-	0,11	-

APÊNDICE N – Dados individuais das razões feto-mãe dos enantiômeros da fluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.

Tabela XII – Dados individuais das relações materno e fetais dos enantiômeros da fluoxetina

		(S)-(+)-Fluoxetina									(R)-(-)-Fluoxetina								
Gestantes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Compartimentos Materno-Fetais																			
Veia umbilical/ Veia materna		0,52	0,58	0,48	0,31	0,31	0,48	0,26	0,43	0,44	0,33	0,51	0,27	0,28	0,30	0,39	0,24	0,34	0,36
Veia umbilical/ Espaço interviloso		0,39	0,39	0,37	0,30	0,41	0,13	0,20	0,42	0,39	0,27	0,27	0,19	0,21	0,39	0,10	0,19	0,30	0,34
Espaço interviloso/ Veia materna		0,86	1,01	0,64	0,71	0,74	0,36	1,13	1,13	0,71	1,20	1,88	1,38	1,30	0,77	3,71	1,28	1,14	1,06
Artéria umbilical/ Veia umbilical		1,33	1,46	1,30	1,05	0,76	3,67	1,30	1,01	1,12	0,86	1,04	0,70	0,92	0,67	0,37	1,10	1,08	0,77
Líquido amniótico/ Veia materna		-	0,01	0,16	-	0,03	-	-	0,12	-	-	0,01	0,18	-	0,02	-	-	0,11	-

APÊNDICE O – Dados individuais das razões feto-mãe dos enantiômeros da norfluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.

Tabela XIII – Dados individuais das relações materno e fetais dos enantiômeros da norfluoxetina

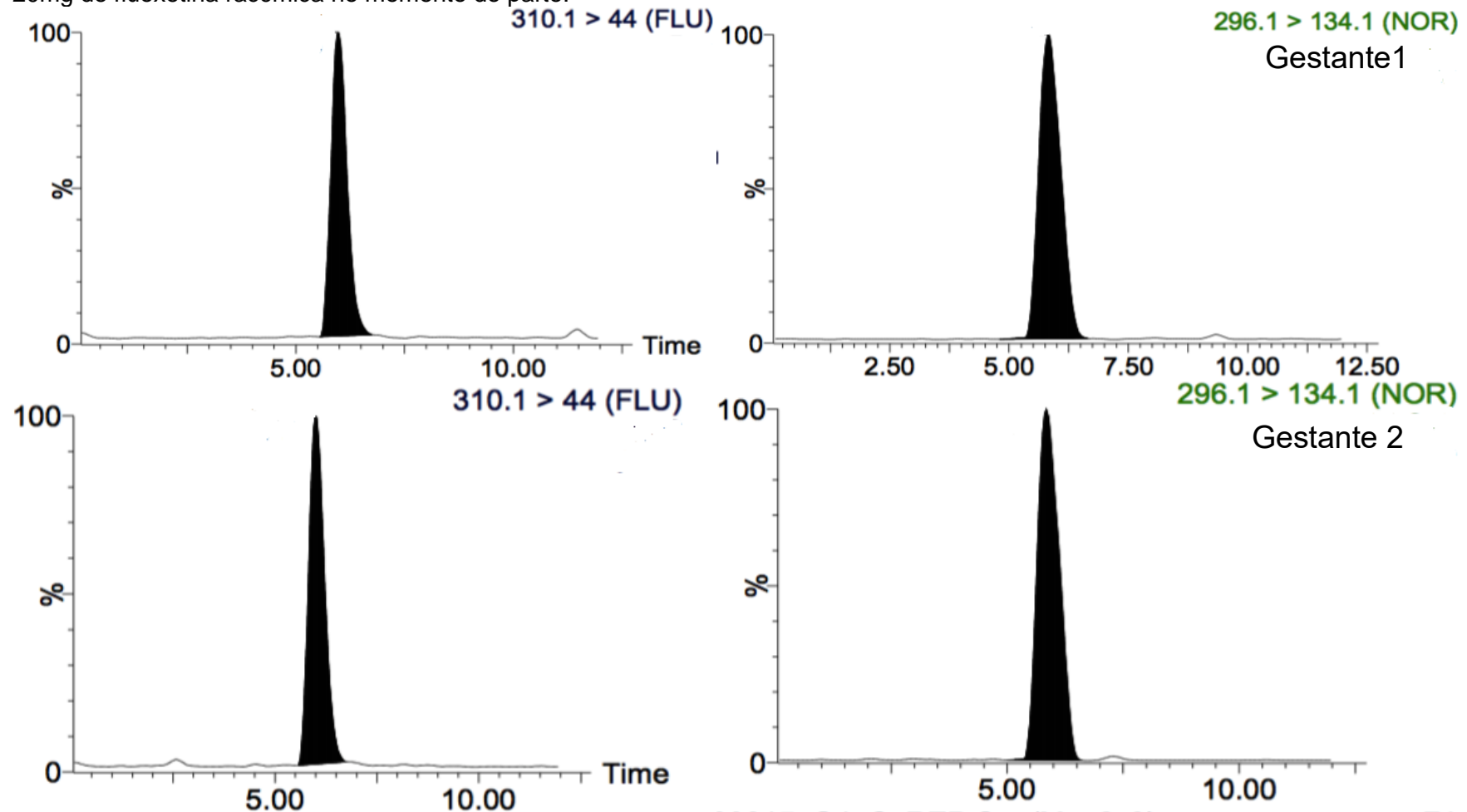
		(S)-(+)-Norfluoxetina									(R)-(-)-Norfluoxetina								
Gestantes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Compartimentos Materno-Fetais																			
Veia umbilical/ Veia materna		0,37	0,50	0,23	0,30	0,24	0,94	0,14	0,42	0,39	0,32	0,44	0,20	0,28	0,28	0,47	0,13	0,39	0,32
Veia umbilical/ Espaço intervilo		0,36	0,34	0,25	0,38	0,33	0,22	0,17	0,44	0,40	0,27	0,29	0,19	0,26	0,38	0,19	0,15	0,37	0,27
Espaço intervilo/ Veia materna		2,79	2,92	3,93	2,62	2,99	4,65	5,80	2,28	2,49	1,16	1,54	1,06	1,09	0,74	2,53	0,89	1,06	1,16
Artéria umbilical/ Veia umbilical		1,04	1,08	0,75	0,64	0,86	1,18	1,11	0,96	0,76	1,06	1,01	0,76	0,70	0,80	0,88	1,38	0,87	1,06
Líquido amniótico/ Veia materna		-	-	0,12	-	-	-	-	0,14	-	-	-	0,11	-	-	-	-	0,19	-

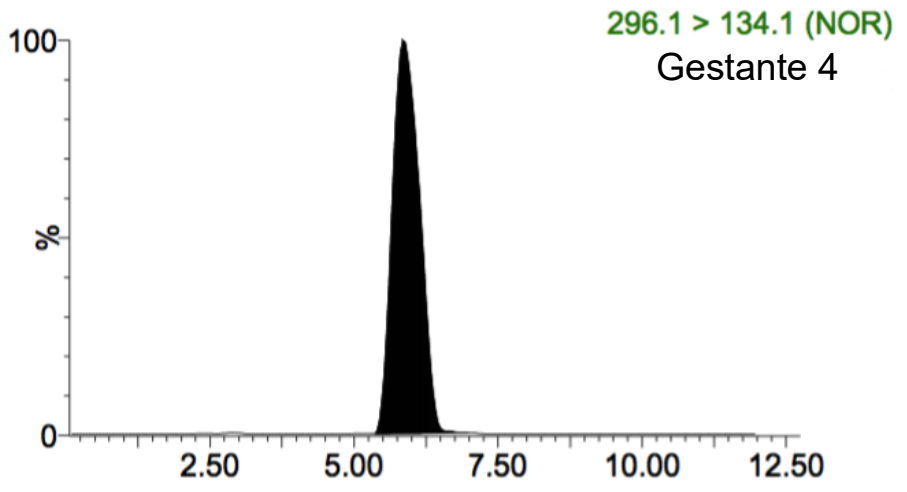
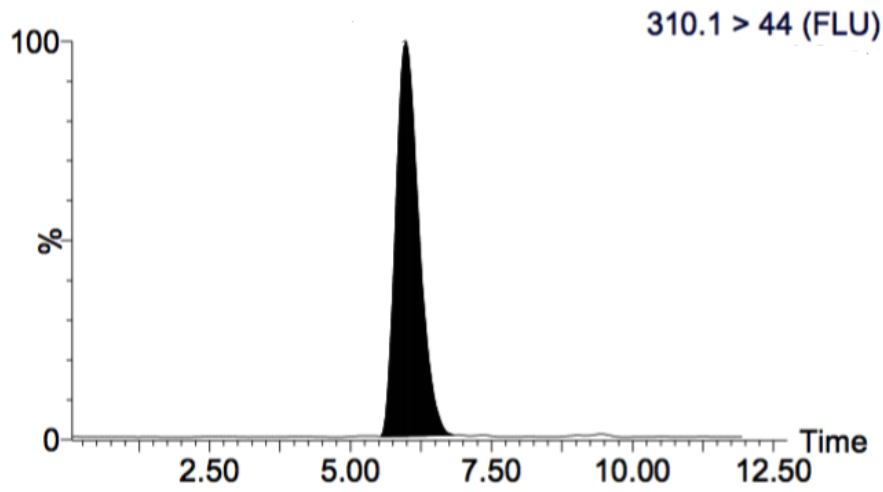
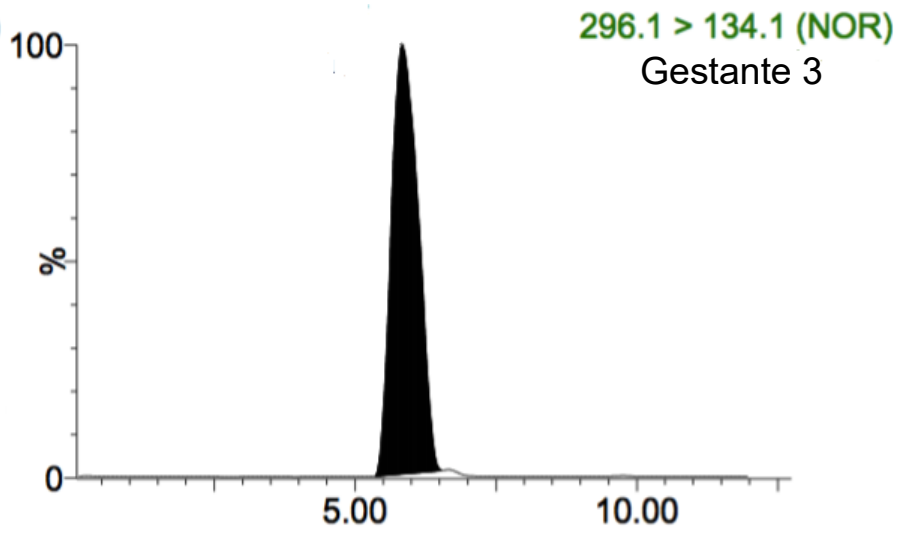
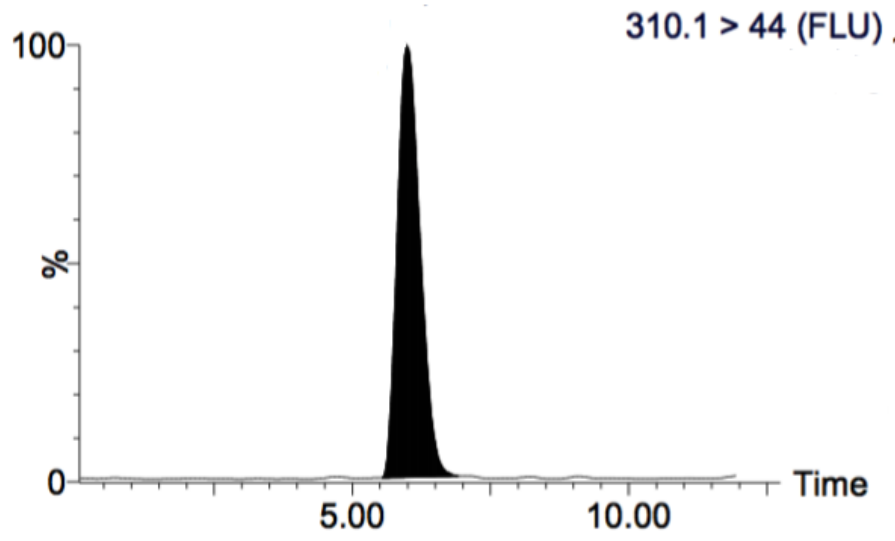
APÊNDICE P – Dados individuais em leite materno da fluoxetina e norfluoxetina das nove gestantes tratadas com dose única, oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.

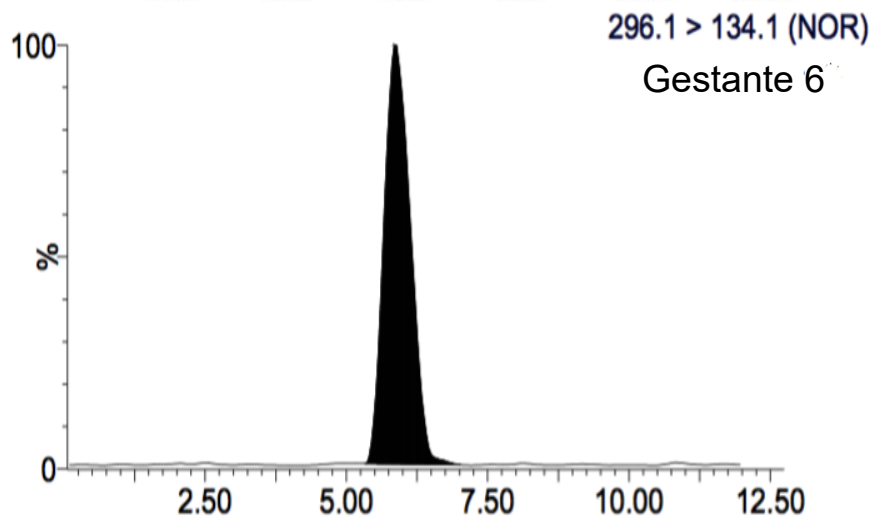
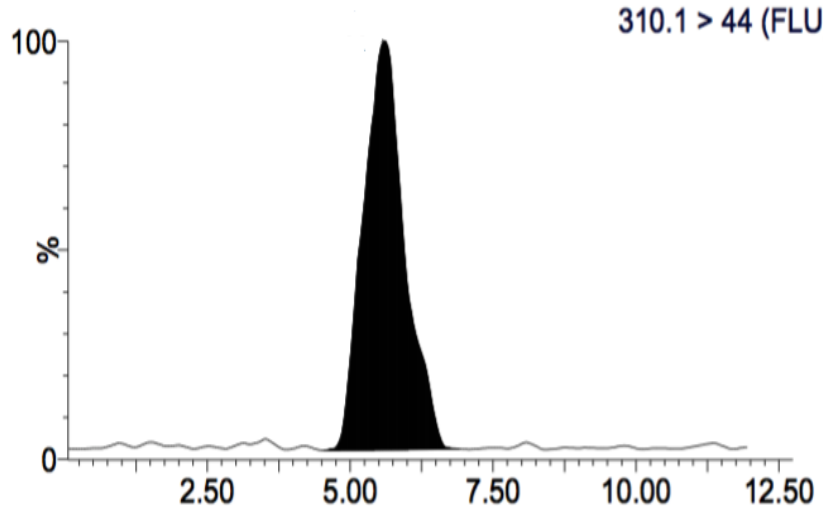
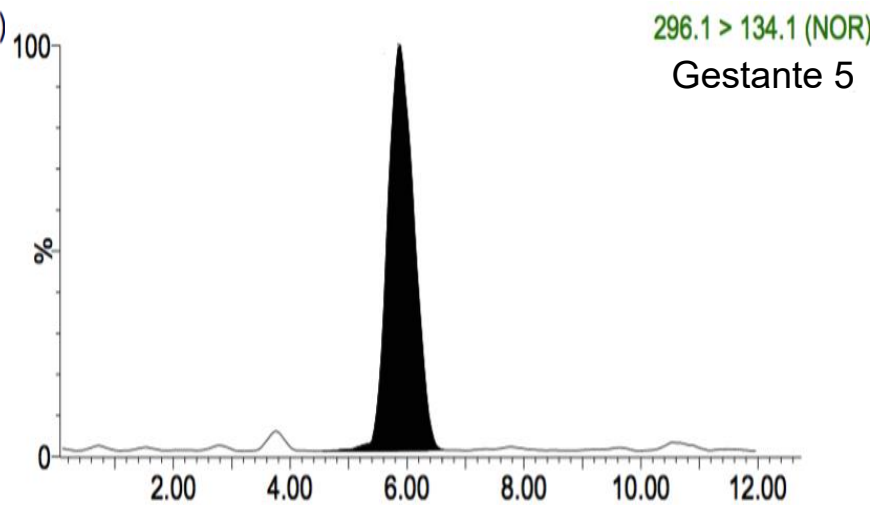
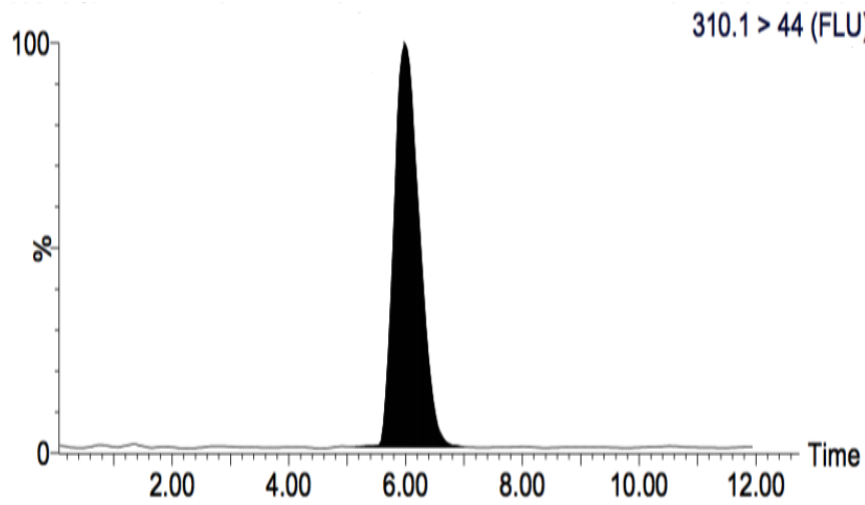
Tabela XIV- Concentrações da fluoxetina e norfluoxetina em amostras coletadas 24 horas após o parto

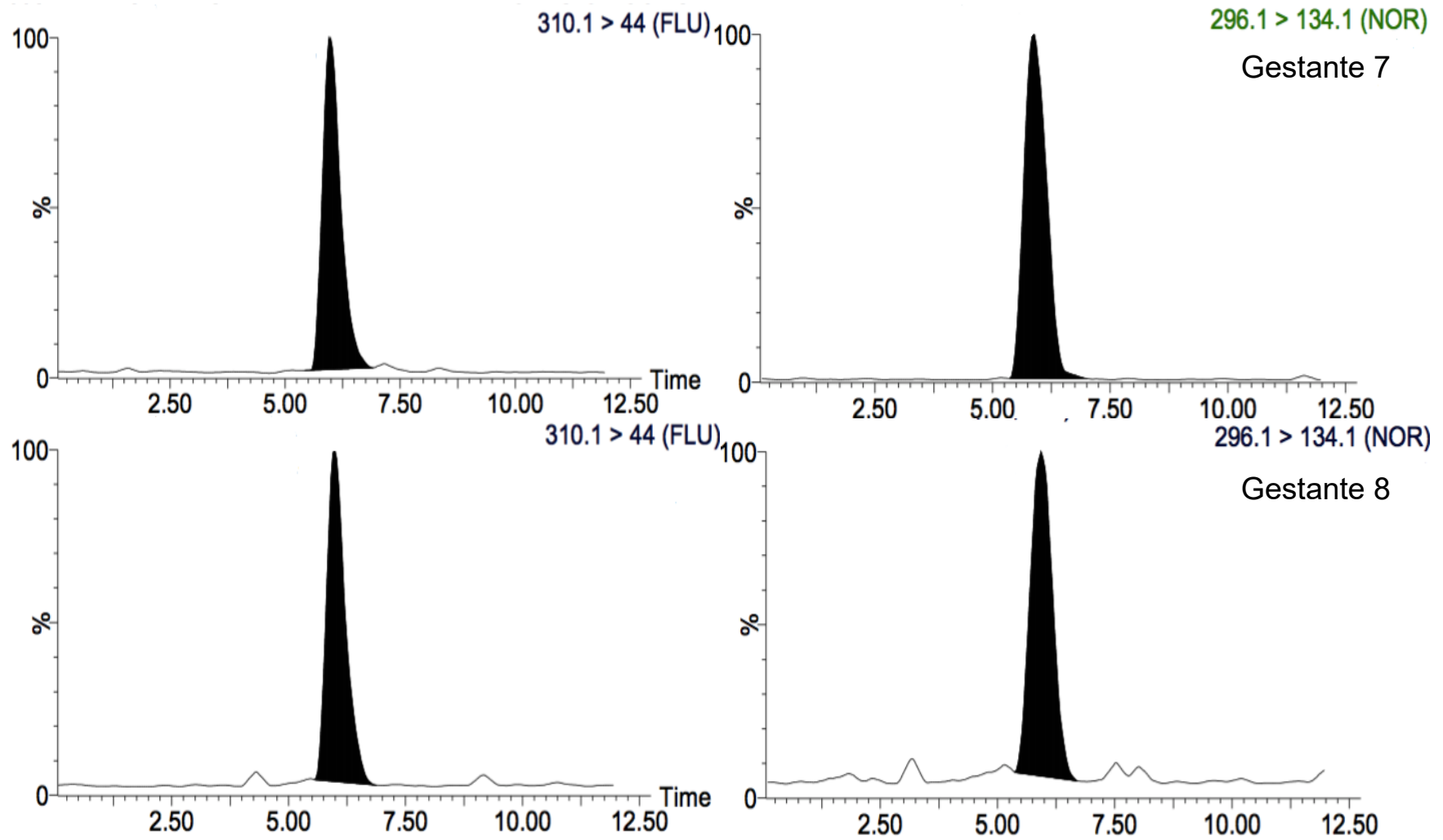
Gestante	Fluoxetina	Norfluoxetina	Tempo coleta (h)
1	-	-	24
2	-	-	54
3	1,10	2,60	26
4	-	2,30	24
5	1,60	2,40	24
6	-	2,20	26
7	-	2,50	24
8	1,20	2,80	48
9	-	-	24

APÊNDICE Q – Cromatogramas individuais da fluoxetina e norfluoxetina em leite materno de oito gestantes tratadas com dose única oral de 20mg de fluoxetina racêmica no momento do parto.









APÊNDICE R – Artigo Original

Análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e fluido amniótico humano por LC-MS/MS e sua aplicação em farmacocinética clínica em gestante

Resumo

A fluoxetina (FLX) é o fármaco mais indicado no tratamento de estados depressivos durante a gravidez e está disponível para uso clínico como uma mistura racêmica de (S)-(+)- e (R)-(-)-FLX. A N-desmetilação de FLX por CYP2D6, CYP2C9 e CYP3A4 produz o seu metabólito ativo, norfluoxetina (NorFLX) com os enantiômeros (S)-(+)- e (R)-(-)-NorFLX. Este estudo descreve o desenvolvimento e validação de um método enantiosseletivo para análise sequencial da FLX e NorFLX em plasma e líquido amniótico empregando cromatografia líquida de alta eficiência de massa em tandem (LC-MS/MS). Para a análise da concentração dos enantiômeros da FLX e NorFLX, alíquotas de 500 µL de plasma e 1000 µL de líquido amniótico foram extraídos com n-hexano: álcool isoamílico (99:1, v/v). Os enantiômeros da FLX e NorFLX foram separados em uma coluna Chirobiotic V utilizando uma mistura de etanol: acetato de amônio 15 mM (85:15 v/v) como fase móvel e quantificado por LC-MS/MS. O limite de quantificação obtido em plasma foi 0,04 ng/mL de cada enantiômero da FLX e 0,1 ng/mL de cada enantiômero da NorFLX, em líquido amniótico foi 0,005 ng/mL de cada enantiômero da FLX e 0,05 ng/mL de cada enantiômero da NorFLX. O intra e inter-ensaio de precisão e exatidão foram <15% e o efeito da matriz estava ausente. O método validado foi aplicado em um estudo de disposição cinética da FLX em amostras de plasma e líquido amniótico coletadas até 672 horas após administração oral de dose única de 20 mg de FLX em gestantes. Foi observada enantiosseletividade em alguns parâmetros na farmacocinética da FLX e NorFLX. Os métodos para análise sequencial dos enantiômeros da FLX e NorFLX em ambas matrizes foram compatíveis com a aplicação em um estudo clínico envolvendo a administração de dose única em gestantes. Este estudo descreve pela primeira vez o desenvolvimento e validação do método de quantificação dos enantiômeros da FLX em líquido amniótico empregando LC-MS/MS.

Introdução

A fluoxetina (FLX) é um antidepressivo do tipo amina, quimicamente designado como (±)N-metila-3-fenila-3-[4-(trifluorometila)fenoxi]propano-1-amina (Figura 1). Atua aumentando a atividade da serotonina no cérebro devido a sua característica altamente seletiva na inibição da recaptção desta 5-HT (42,43). É um antidepressivo de baixa toxicidade, amplamente prescrito para a população em geral e em gestantes, em decorrência de sua alta eficácia e baixa frequência de reações quando comparado às classes de antidepressivos tricíclicos e inibidores de monoaminoxidase (15).

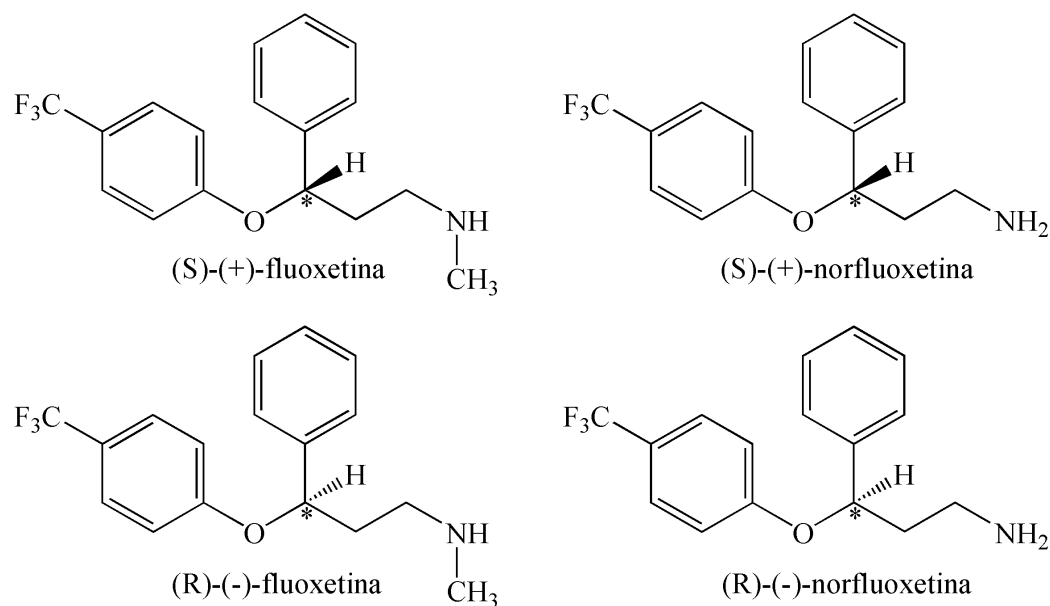


Figura 1. Estruturas químicas dos enantiômeros (S)-(+), (R)-(-)-fluoxetina e (S)-(+), (R)-(-)-norfluoxetina. *Centro Quiral (adaptado de Bueno J.S. et al. 2011)(41)

A FLX é disponível na clínica como mistura dos enantiômeros S e R. Os enantiômeros da FLX apresentam potência semelhante no bloqueio de recaptação da serotonina (45–47), enquanto o seu metabólito ativo (S)-(+)-norfluoxetina (NorFLX) é 20 vezes mais potente que o (R)-(-)-NorFLX, tanto *in vitro* como *in vivo* (48,49). A ampla variabilidade interindividual na resposta clínica a FLX pode estar relacionada a diferenças nas concentrações plasmáticas de cada enantiômero tanto da FLX quanto do metabólito ativo NorFLX (50–52).

A FLX é um fármaco de alta eliminação pré-sistêmica e alta biodisponibilidade oral (90%) (11,45,70,119). Estudos em microsomas de fígado humano mostram que o enantiômero (S)-(+)-fluoxetina é metabolizado pelo CYP2D6, enquanto o metabolismo do (R)-(-)-fluoxetina é altamente dependente do CYP2D6 e CYP2C9 (52,65,66). A ligação da FLX às proteínas do plasma é de 94,5% (68).

Os métodos descritos para a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma humano ou em plasma de ratos empregam derivatização com o reagente enantiomericamente puro isocianato R-1-(1-naftil) etil (110) ou colunas de fases estacionárias quirais, tais como ODR (41,111–113), Chirobiotic V (20,99) ou AGP (114). Os enantiômeros da FLX e NorFLX são detectados em sistemas GC-MS (27,115) ou em sistemas HPLC com detector UV (20,110–113), HPLC com detecção por fluorescência (41) ou LC-MS/MS em plasma humano (27) ou plasma de ovelhas (114). O estudo de Kim et al. (27) cita a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma empregando LC-MS/MS com relatos de limites de quantificação (LIQ) de 0,1ng/mL e 0,5ng/mL, respectivamente, para ambos os enantiômeros da FLX e NorFLX. Não há descrição de desenvolvimento e validação de métodos de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em líquido amniótico.

O presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação de métodos enantiosseletivos de análise sequencial da FLX e NorFLX em plasma e líquido amniótico empregando LC-MS/MS acoplado a coluna de fase estacionária quiral Chirobiotic V. Os limites de quantificação foram compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética

clínica e distribuição em líquido amniótico dos enantiômeros da FLX e NorFLX em uma gestante tratada com dose oral única oral do fármaco racêmico. O cloridrato de fluoxetina (98%) e norfluoxetina como mistura racêmica e os enantiômeros puros (S)-(+)-fluoxetina e (S)-(+)-norfluoxetina foram obtidos da TRC, Toronto, Canadá. O tartarato de metoprolol (97%) como mistura racêmica foi obtido da Sigma, St. Louis, MO, USA. Os solventes etanol, hexano e metanol foram obtidos da Panreac, Barcelona, Espanha, como grau HPLC. O álcool isoamílico (Fisher Scientific), o acetato de amônio e o hidróxido de sódio (JT Baker, Xalostoc, Mexico) foram obtidos como grau analítico. A água foi obtida do sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore, Belford, MA, USA).

A solução estoque de FLX e NorFLX foi preparada na concentração de 1mg de cada enantiômero/mL de metanol e posteriormente diluída para a obtenção das concentrações 0,2; 0,4; 0,8; 2; 4; 8; 20; 80; 200 e 400 ng de cada enantiômero de FLX e NorFLX/mL de metanol. A solução de metoprolol, usado como padrão interno (PI) foi preparada na concentração de 0,4 µg/mL de metanol e posteriormente diluída na concentração de 8 ng/mL de metanol. Todas as soluções foram estocadas a -20°C.

LC-MS/MS

Os enantiômeros da FLX e NorFLX foram resolvidos na coluna *Astec Chirobiotic*[®] V (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) com pré-coluna *CN Lichosphe*[®] 100 (4 x 4 mm e partículas de 5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) e fase móvel constituída por mistura de etanol: acetato de amônio 15 mM (85:15 v/v) na vazão de 0,8 mL/min. A coluna foi mantida a 23°C.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) foi composto por bomba gradiente binária Waters 1525 µ, injetor automático 2777, forno de coluna TCM/CHM e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S, todos da Waters (Milford, EUA) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo. As temperaturas da fonte de dessolvatação foram mantidas a 150 e 350°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 900 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $1,68 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 25 V para os enantiômeros da FLX, NorFLX e para o PI. A energia de colisão foi de 7 eV para os enantiômeros da FLX e 3 eV para os enantiômeros da NorFLX. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta da solução padrão de FLX e NorFLX na concentração de 1ng de cada enantiômero/mL de fase móvel na vazão de 10 mL/min.

As determinações foram executadas no modo MRM (Monitoramento de reações múltiplas). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 310>44 para os enantiômeros da FLX, 296>134 para os enantiômeros da NorFLX e 268>116 para o PI. A aquisição e a quantificação dos dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido) também usado para registrar e integrar os picos.

Preparação da Amostra

Alíquotas de 500 µL de plasma ou 1000 µL de líquido amniótico foram adicionadas de 25 µL da solução de PI, 200 µL de solução aquosa de NaOH 2M e 6 mL de hexano: álcool isoamílico (99:1 v/v). Após 30 min em agitador horizontal (\pm 300 ciclos/min), os tubos foram centrifugados a 2800 g durante 20 min. A seguir, os extratos foram transferidos para

tubos plásticos e concentrados até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo (Christ RVC 2-25 CD e Christ CT 04-50 SR, Osterode am Harz, Alemanha). Os resíduos foram reconstituídos em 90 μ L de etanol:acetato de amônio 15mM (85:15 v/v), dos quais 50 μ L foram injetados na coluna cromatográfica.

Ordem de eluição dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina

A ordem de eluição foi determinada pela análise individual dos enantiômeros puros (S)-(+)-FLX e (S)-(-)-NorFLX (Figura 2).

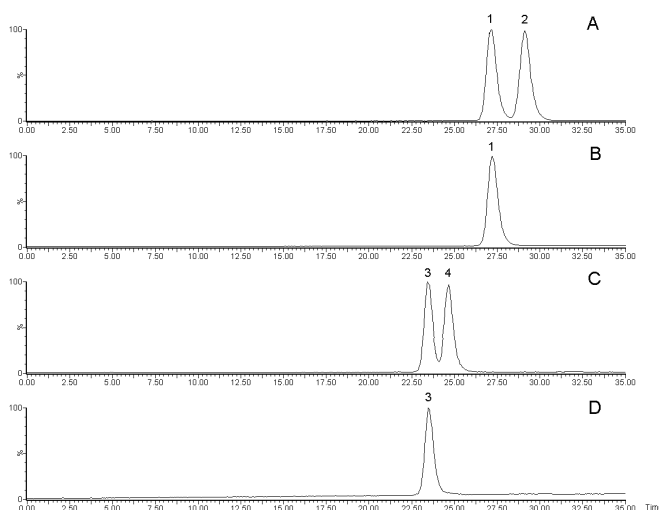


Figura 2 – Cromatogramas referente à ordem de eluição da fluoxetina e norfluoxetina (50 ng/mL de metanol). Padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-fluoxetina (A), padrão do enantiômero (S)-(+)-fluoxetina (B), padrão racêmico dos enantiômeros da (S)-(+)- e (R)-(-)-norfluoxetina (C), padrão do enantiômero (S)-(+)-norfluoxetina (D). 1). (S)-(+)-FLX.; 2) (R)-(-)-FLX; 3) (S)-(+)-NorFLX; 4) (R)-(-)-NorFLX.

Validação do método

O método foi validado em plasma humano e líquido amniótico, de acordo com as normas da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos (100). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, efeito matriz, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade e foram validados.

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se amostras de plasma obtidas de oito voluntários diferentes, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Para o líquido amniótico foram avaliadas seis amostras oriundas de parturientes diferentes. O efeito matriz foi avaliado pela comparação das áreas dos picos referentes aos padrões FLX, NorFLX e PI, injetados diretamente sem a matriz e com a matriz. As amostras brancas foram processadas de acordo com o procedimento descrito na seção Preparação da Amostra e após o processamento foram acrescentados o PI, FLX e NorFLX nas mesmas concentrações das amostras de CQB (Controle de Qualidade de Baixa concentração) FLX e NorFLX 0,1 e 0,2 ng, respectivamente, de cada enantiômero/mL plasma e 0,02 e 0,1 ng, respectivamente, de cada enantiômero /mL de fluido amniótico) e CQA (Controle de Qualidade de Alta concentração) FLX e NorFLX 16 ng de cada enantiômero /mL de plasma e 8 ng de cada enantiômero /mL de líquido amniótico. O fator matriz normalizado (FMN) pelo PI foi calculado para cada amostra dividindo-se a razão

área do pico do analito/área do pico do PI na presença e ausência da matriz. O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos as amostras CQB e CQA foram inferiores a 15%.

A linearidade de cada método de análise da FLX e NorFLX em plasma humano e líquido amniótico foi avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (contendo apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 500 μ L de plasma branco ou 1000 μ L líquido amniótico branco e enriquecidas com 25 μ L de cada solução padrão de FLX e NorFLX.

As curvas analíticas para a FLX foram construídas nas concentrações 0,04; 0,1; 0,2; 0,4; 1; 4; 10 e 20 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2; 5 e 10 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. As curvas analíticas para a NorFLX foram construídas nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 1; 4; 10; e 20 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 2; 5 e 10 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. Aprovadas quando os controles de qualidade apresentaram desvio de no máximo 15% e de até 20% para o LIQ.

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas nas concentrações do LIQ: 0,04 e 0,1 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,005 e 0,05 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico, CQB: 0,1 e 0,2 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 0,02 e 0,1 ng de cada enantiômero /mL de líquido amniótico, CQM (Controle de Qualidade de Média concentração): 5 ng de cada enantiômero/mL de plasma e 4 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico, CQA: 16 ng de cada enantiômero /mL de plasma e 8 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico e QLD (Controle de Qualidade de Diluição): 80 ng de cada enantiômero/mL de plasma (1:5) e 20 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico (1:20). Todas as soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise, sendo que o primeiro dia de análise ocorreu no mesmo dia da preparação das soluções.

Para avaliar a precisão e exatidão intracorrida foram analisadas cinco replicatas destas soluções através de uma única corrida analítica. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas cinco replicatas de cada uma das soluções durante três diferentes corridas.

A avaliação da precisão intra e intercorrida foram realizadas através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos, enquanto a exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo. Para que o método possa ser referido como preciso, o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%, admitindo-se valores até 20% para o LIQ.

Para a avaliação da estabilidade foram preparadas amostras de plasma e líquido amniótico enriquecidas com FLX e NorFLX nas concentrações do CQB e CQA. Na estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -70°C por 24 horas, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 horas, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 12°C por um período de 24 horas, sendo então, injetadas para análise cromatográfica. A estabilidade de curta duração foi avaliada com as amostras mantidas em temperatura ambiente (23°C) por duas horas. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas. Todos os resultados foram comparados com os obtidos após a análise das amostras recém-preparadas e foram expressos em porcentagem de desvio.

Aplicação farmacocinética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Foram investigadas nove gestante após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, selecionada no setor de obstetrícia da instituição durante o seguimento de pré natal. A paciente com 34 semanas de gestação foi internada na Unidade de Pesquisa Clínica e recebeu dose única oral de 20 mg de cloridrato de fluoxetina racêmico (Prozac®, Eli Lilly). As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em tubos com EDTA nos tempos zero, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 e 672 h após a administração do fármaco. No momento do parto, a paciente recebeu outra dose de 20 mg de cloridrato de fluoxetina racêmica via oral para a coleta de amostras sanguíneas materna, de vasos umbilicais, espaço intervilloso e líquido amniótico. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2800 g por 10 min a 4° C. As amostras de plasma e líquido amniótico foram armazenadas a -70° C até a análise.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados empregando o programa Phoenix™ WinNonlin®, versão 6.3.0.393 (Pharsight, Certara L.P.). A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, ($AUC^{0-\infty}$), o *clearance* total aparente (Cl/f), o volume de distribuição aparente (Vd/f), a concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo para atingir essa concentração (T_{max}) foram determinados diretamente dos valores obtidos das concentrações plasmáticas. Esses dados foram avaliados considerando modelo bicompartimental para a FLX e monocompartimental para a NorFLX.

Resultados

A ordem de eluição na sequência (S)-(+)-NorFLX, (S)-(+)-FLX, (R)-(-)-NorFLX, (R)-(-)-FLX foi determinada usando os enantiômeros puros (S)-(+)-FLX e (S)-(+)-NorFLX (Figuras 2). Os métodos de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e fluido amniótico não apresentaram efeito matriz (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito matriz para os enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano e líquido amniótico.

	FMN (CV %)		FMN (CV %)	
	plasma		líquido amniótico	
	CQB	CQA	CQB	CQA
(S)-(+)- FLX	4,03	12,82	13,90	15,00
(R)-(-)- FLX	6,83	13,07	14,99	13,79
(S)-(+)- NorFLX	12,15	14,60	13,69	15,00
(R)-(-)- NorFLX	14,68	14,37	14,98	14,35

FMN: Fator da matriz normalizado por PI [(Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz)/ (Resposta do analito em solução padrão/Resposta do PI em solução padrão)]; Efeito matriz = FMN Matriz/ FMN solução*100; CV = coeficiente de variação [(SD FMN/ média FMN) x 100].

Os enantiômeros da FLX, NorFLX e o PI foram extraídos do plasma e líquido amniótico em pH básico, usando como solvente extrator a mistura álcool isoamílico:hexano (1:99, v/v). A linearidade em plasma para os enantiômeros da FLX foi observada no intervalo de 0,04-20 ng/mL e para os enantiômeros da NorFLX no intervalo de 0,1-20 ng/mL. A linearidade em líquido amniótico para os enantiômeros da FLX foi de 0,005-10 ng/mL e para os enantiômeros da NorFLX de 0,05-10 ng/mL (Tabelas 2 e 3).

Os métodos de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e líquido amniótico apresentaram valores de coeficiente de variação (CV) e erro padrão relativo (EPR) inferiores a 15% nos estudos de precisão e exatidão intra e intercorridas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Parâmetros de validação, Precisão e Exatidão, do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano por LC-MS/MS.

	(S)-(+)- fluoxetina	(R)-(-)- fluoxetina	(S)-(+)- norfluoxetina	(R)-(-)- norfluoxetina
Linearidade (ng/mL)	0,04–20		0,1–20	
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9951	0,9927	0,9932	0,9948
Limite de quantificação (ng/mL)	0,04		0,1	
Precisão (CV %)	2,75	3,76	2,92	7,92
Exatidão (EPR %)	3,50	5,00	11,80	3,60

Tabela 3 – Parâmetros de validação, Precisão e Exatidão, do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em líquido amniótico humano por LC-MS/MS.

	(S)-(+)- fluoxetina	(R)-(-)- fluoxetina	(S)-(+)- norfluoxetina	(R)-(-)- norfluoxetina
Linearidade (ng/mL)	0,005–10		0,05–10	
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9956	0,9949	0,9932	0,9941
Limite de quantificação (ng/mL)	0,005		0,05	
Precisão (CV %)	11,87	11,19	11,19	10,79
Exatidão (EPR %)	-10,00	-7,50	-7,50	-5,75

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal

As amostras de plasma e líquido amniótico permaneceram estáveis no processo de congelamento e descongelamento, pós-processamento e curta duração (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste estabilidade para análise dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em plasma e líquido amniótico humano (LA).

Concentração	Estabilidade curta duração (2 h à 23°C)				Congelamento/descongelamento (3 ciclos à 23° e -70°C)				Estabilidade pós-processamento (24 h à 12°C)			
	Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)		Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)		Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)	
	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA	Plasma	LA
CQB												
(S)-(+)- FLX	8,44	3,27	-0,67	-11,67	10,26	3,20	-7,01	-11,71	6,99	3,39	-2,67	-11,76
(R)-(-)- FLX	7,21	3,31	-5,67	-11,96	5,77	3,29	-10,0	-11,60	6,46	3,41	0,67	-12,01
CQA												
(S)-(+)- FLX	1,61	4,29	7,08	-14,02	1,60	4,29	1,42	-14,02	2,49	4,93	8,12	-14,77
(R)-(-)- FLX	1,95	4,62	7,44	-13,90	2,64	4,60	1,16	-13,11	2,62	4,77	6,24	-13,99
CQB												
(S)-(+)- NorFLX	10,15	7,51	-3,00	-11,33	9,50	7,80	2,50	-11,42	3,67	7,84	-4,33	-12,33
(R)-(-)- NorFLX	5,52	6,76	-3,33	-10,0	2,86	6,67	-6,00	-12,51	1,67	6,91	5,16	-10,09
CQA												
(S)-(+)- NorFLX	1,59	5,59	-7,60	-7,49	2,52	6,09	-7,60	-7,93	2,08	5,98	6,80	-7,89
(R)-(-)- NorFLX	0,97	5,49	-12,7	-7,99	3,49	5,87	-8,92	-8,01	2,53	5,54	-3,68	-8,05

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Os métodos de análise desenvolvidos e validados permitiram a quantificação dos enantiômeros da FLX e NorFLX em amostras de plasma e líquido amniótico (Figura 3).

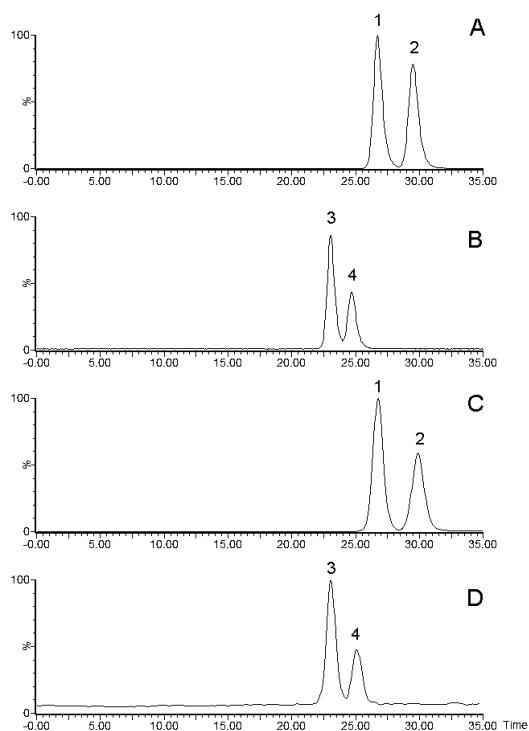


Figura 3. Cromatogramas da análise dos enantiômeros FLX e NorFLX no plasma humano e no fluido amniótico. Análise dos enantiômeros da FLX (A) e NorFLX (B) em plasma obtida 160 min após a administração de uma dose oral única de 20 mg FLX racêmica em gestante saudável. Análise dos enantiômeros da FLX (C) e NorFLX (D) em fluido amniótico obtido 160 min após a administração de uma dose oral única de 20 mg FLX racêmica. 1). (S)-(+)-FLX.; 2) (R)-(-)-FLX; 3) (S)-(+)-NorFLX; 4) (R)-(-)-NorFLX.

Os parâmetros farmacocinéticos (Tabela 5) mostram maior proporção no plasma dos enantiômeros (R)-(-)-FLX e (S)-(+)-NorFLX e razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno próximas a 11% para ambos os enantiômeros da FLX e NorFLX em uma amostra de líquido amniótico coletada 160 min após a administração da fluoxetina racêmica.

Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina em gestantes.

	(S)-(+)- Fluoxetina	(R)-(-)- Fluoxetina	(S)-(+)- Norfluoxetina	(R)-(-)- Norfluoxetina
C_{max}	6,05	5,94	6,29	3,29
(ng/mL)	4,04 - 11,46	5,14 - 9,16	5,76 - 8,02	2,83 - 3,67
T_{max} (h)	2,35	4,41	13,66	21,65
	1,62 - 3,59	2,39 - 5,26	7,47 - 26,95	12,46 - 24,57
AUC^{0-∞}	97,81	209,20	942,70	498,60
(ng.h/mL)	39,5 – 258,2	113,9 - 263,0	746,40 - 1483,00	464,4 - 1259,0
K_a (h ⁻¹)	0,16	0,18	-	-
	0,11 - 0,36	0,11 - 0,30		
t_{1/2α} (h)	1,94	2,33	-	-
	1,32 - 4,47	1,07 - 4,14		
K_{el} (h ⁻¹)	0,04	0,03	0,008	0,007
	0,03 - 0,07	0,02 - 0,04	0,005 - 0,011	0,004 - 0,009
t_{1/2β} (h)	17,19	24,72	83,48	95,15
	9,73 - 22,20	18,07 - 34,56	62,18 - 156,50	78,93 - 207,60
Vd/f/Kg	19,00	23,25	-	-
(L/h/Kg)	17,24 - 28,1	20,22 - 24,55		
Cl/f/Kg	1,45	0,66	-	-
(L/h/Kg)	0,63 - 3,24	0,52 - 1,16		
LA/VM	0,084	0,078	0,109	0,085
	0,013 - 0,154	0,011 - 0,139	0,097 - 0,120	0,057-0,114

Os dados estão expressos como: Mediana, Percentil 25, Percentil 75. Teste de Wilcoxon $p < 0,05$. – Dados não disponíveis para o metabólito.

Discussão

O presente estudo descreve pela primeira vez o desenvolvimento e a validação de um método de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em líquido amniótico usando coluna quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS com aplicação em estudo de farmacocinética clínica. Este estudo também descreve o desenvolvimento e a validação completa de um método para a análise sequencial dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma empregando LC-MS/MS.

O método de análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma empregando LC-MS/MS foi validado com demonstração de ausência de efeito matriz e ausência de efeito residual; Tabela 1. Os LIQs foram de 0,04 ng de cada enantiômero da FLX/mL e de 0,1 ng cada enantiômero da NorFLX/mL, empregando alíquotas de 500 µL plasma; Tabela 2. O método é mais sensível do que o descrito por Kim et al. (2006) (27) com relatos de LIQs de 0,1 ng de cada enantiômero da FLX/mL e de 0,5 ng cada enantiômero da NorFLX/mL de plasma; Tabela 3. Ressalta-se que os citados autores também empregaram LC-MS/MS, embora sem nenhuma referência relativa a fase estacionária da coluna quiral

empregada no processo de resolução dos enantiômeros. Os baixos valores de LIQ estimados no presente estudo permitiram a análise dos enantiômeros da FLX nas amostras de plasma coletadas até 168 h, ou aproximadamente seis meias-vidas de eliminação, após a administração de dose única oral de 20 mg de fluoxetina racêmica a uma paciente com 32 semanas de gestação. Em relação ao metabólito ativo NorFLX, foram analisadas amostras de plasma até 672h, ou aproximadamente três meias-vidas de eliminação, após a administração da dose única oral de FLX; Figura 4 e Tabela 5.

Os valores de área sob a curva concentração plasmática vs tempo (AUC) são maiores para os enantiômeros (R)-(-)-FLX e (S)-(+)-NorFLX, inferindo que o enantiômero (S)-(+)-FLX é o preferencialmente metabolizado a NorFLX; Tabela 5. No entanto, Kim et al. (2006) relatam concentrações plasmáticas de (S)-(+)-FLX aproximadamente 2 vezes maiores que as concentrações de (R)-(-)-FLX em pacientes gestantes tratadas com dose oral diária de 20 mg de fluoxetina racêmica, durante pelo menos três semanas. Considerando que o metabolismo da (S)-(+)-FLX é dependente do CYP2D6, enquanto o metabolismo da (R)-(-)-NorFLX é dependente do CYP2D6 e do CYP2C9 e considerando que ambos os fármacos são inibidores potentes, reversíveis e tempo dependente do CYP2D6, o acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(+)-FLX ocorreria em doses múltiplas, mas não em dose única como a empregada no presente estudo.

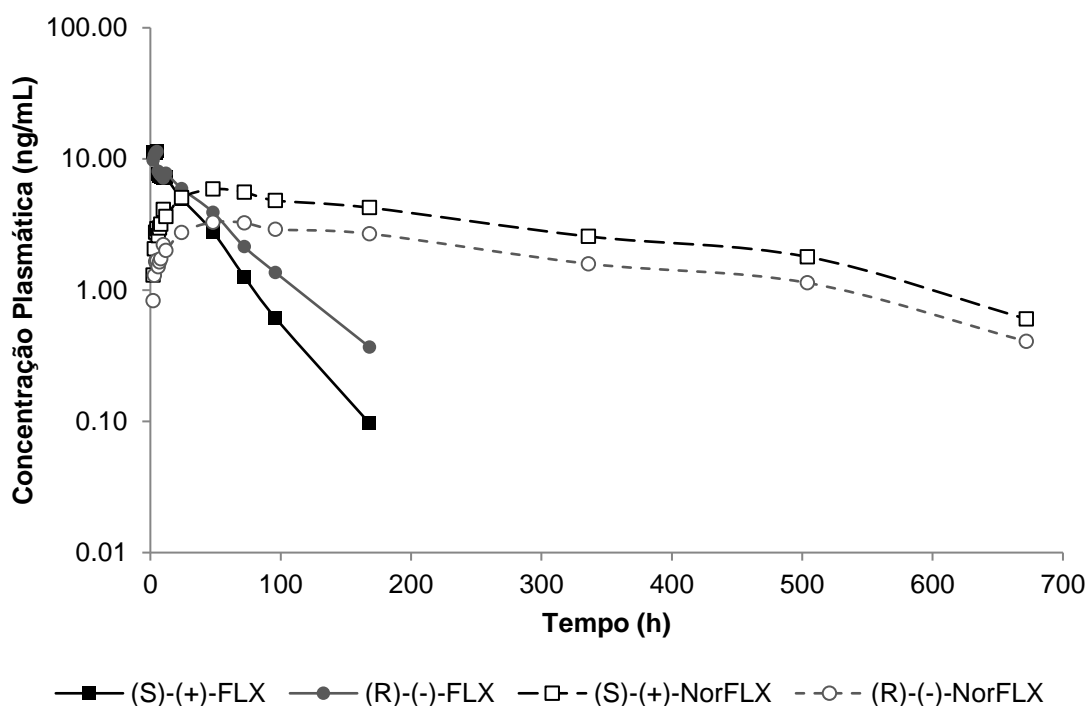


Figura 4 - Curvas de concentração plasmática versus tempo dos enantiômeros da fluoxetina e norfluoxetina após a administração de dose única, oral de 20mg de FLX racêmica a uma gestante. Dados expressos em Mediana.

As baixas concentrações de fármacos no líquido amniótico exigiram o desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis do que aqueles reportados para o plasma. No presente estudo, o método desenvolvido e validado para a análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em líquido amniótico mostrou LIQs de 0,005 ng de cada enantiômero da FLX/mL e de 0,05 ng cada enantiômero da NorFLX/mL líquido amniótico (Tabela 3). A razão de concentrações líquido amniótico/plasma materno foi de

aproximadamente 11% para ambos os enantiômeros da FLX e NorFLX em amostras coletadas simultaneamente 160 min após a administração da dose única oral de 20 mg de fluoxetina racêmica; Tabela 5. Os dados sugerem que a distribuição da FLX e NorFLX no líquido amniótico não é enantiosseletiva.

Conclusão

O métodos desenvolvidos e validados, empregando LC-MS/MS acoplado a coluna de fase quiral Chirobiotic V, são precisos, exatos e mostram sensibilidade para análise dos enantiômeros da FLX e NorFLX em plasma e líquido amniótico com aplicação em farmacocinética clínica. Os métodos foram aplicados na investigação da enantiosseletividade na farmacocinética da FLX e NorFLX em uma paciente gestante tratada com dose única oral de 20mg de fluoxetina racêmica.

Referência Bibliográfica

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. In: APA, editor. DSM-IV-TR. 4th ed. Arlington VA; 2002.
2. Oberlander TF, Bonaguro RJ, Misri S, Papsdorf M, Ross CJD, Simpson EM. Infant serotonin transporter (SLC6A4) promoter genotype is associated with adverse neonatal outcomes after prenatal exposure to serotonin reuptake inhibitor medications. *Mol Psychiatry*. 2008 Jan;13(1):65–73.
3. Kari Laine, MD, PhD; Tuija Heikkinen, MD; Ulla Ekblad, MD, PhD; Pentti Kero, MD P. Effects of Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors During Pregnancy on Serotonergic Symptoms in Newborns and Cord Blood Monoamine. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(7):720–6.
4. Oberlander TF, Misri S, Fitzgerald CE, Kostaras X, Rurak D, Riggs W. Pharmacologic factors associated with transient neonatal symptoms following prenatal psychotropic medication exposure. *J Clin Psychiatry*. 2004 Feb;65(2):230–7.
5. Zeskind PS, Stephens LE. Maternal selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and newborn neurobehavior. *Pediatrics*. 2004 Feb;113(2):368–75.
6. Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*. 1967 Nov;113(504):1237–64.
7. Association AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. 2013.
8. Earls MF. Incorporating recognition and management of perinatal and postpartum depression into pediatric practice. *Pediatrics*. 2010 Nov 1;126(5):1032–9.
9. Smith T, Kipnis G. “Implementing a perinatal mood and anxiety disorders program.” *MCN Am J Matern Nurs*. 2012;37(3):199.
10. Burke KC, Burke JD, Rae DS, Regier DA. Comparing age at onset of major depression and other psychiatric disorders by birth cohorts in five US community populations. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 Sep;48(9):789–95.
11. Bergstrom et al RF. Relative bioequivalence of a fluoxetine oral solution versus the marketed capsule. *Pharm Res*. 1988;7(3):158.
12. Gemmel M, Rayen I, van Donkelaar E, Loftus T, Steinbusch HW, Kokras N, et al.

Gestational stress and fluoxetine treatment differentially affect plasticity, methylation and serotonin levels in the PFC and hippocampus of rat dams. *Neuroscience*. 2016 Jul 7;327:32–43.

13. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*. 2003 Jun 18;289(23):3095–105.
14. Aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ*. 2009 Feb 3;180(3):305–13.
15. Nonacs R, Cohen LS. Depression during pregnancy: diagnosis and treatment options. *J Clin Psychiatry*. 2002 Jan;63 Suppl 7:24–30.
16. Cooper PJ, Murray L. Postnatal depression. *BMJ*. 1998 Jun 20;316(7148):1884–6.
17. Bloch M, Daly RC, Rubinow DR. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. *Compr Psychiatry*. 2003;44(3):234–46.
18. Gaynes BN, Gavin N, Meltzer-Brody S, Lohr KN, Swinson T, Gartlehner G, et al. Perinatal depression: prevalence, screening accuracy, and screening outcomes. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*. 2005 Feb;(119):1–8.
19. Menon SJ. Psychotropic medication during pregnancy and lactation. *Arch Gynecol Obstet*. 2008 Jan;277(1):1–13.
20. Sit D, Perel JM, Luther JF, Wisniewski SR, Helsel JC, Wisner KL. Disposition of chiral and racemic fluoxetine and norfluoxetine across childbearing. *J Clin Psychopharmacol*. 2010 Aug;30(4):381–6.
21. Bennett HA, Einarson A, Taddio A, Koren G, Einarson TR. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. *Obstet Gynecol*. 2004 Apr;103(4):698–709.
22. Cantilino A, Zambaldi CF, Sougey EB, Rennó Jr. J. Postpartum psychiatric disorders. *Arch Clin Psychiatry (São Paulo). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*; 37(6):288–94.
23. Figueiredo FP, Parada AP, Araujo LF de, Silva WA, Del-Ben CM. The Influence of genetic factors on peripartum depression: A systematic review. *J Affect Disord*. 2015 Mar 1;172:265–73.
24. Lancaster CA, Gold KJ, Flynn HA, Yoo H, Marcus SM, Davis MM. Risk factors for depressive symptoms during pregnancy: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Jan;202(1):5–14.
25. Flynn HA, Davis M, Marcus SM, Cunningham R, Blow FC. Rates of maternal depression in pediatric emergency department and relationship to child service utilization. *Gen Hosp Psychiatry*. 2004;26(4):316–22.
26. Simon GE, Cunningham ML, Davis RL. Outcomes of prenatal antidepressant exposure. *Am J Psychiatry*. 2002 Dec;159(12):2055–61.
27. Kim J, Riggs KW, Misri S, Kent N, Oberlander TF, Grunau RE, et al. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. *Br J Clin Pharmacol*. 2006 Feb;61(2):155–63.
28. Cornish a. M, McMahon C a., Ungerer J a., Barnett B, Kowalenko N, Tennant C. Postnatal depression and infant cognitive and motor development in the second postnatal year: The impact of depression chronicity and infant gender. *Infant Behav Dev*. 2005 Dec;28(4):407–17.

29. Berle JØ, Spigset O. Antidepressant Use During Breastfeeding. *Curr Womens Health Rev.* 2011 Feb;7(1):28–34.
30. ACOG Committee Opinion No. 343: psychosocial risk factors: perinatal screening and intervention. *Obstet Gynecol.* 2006 Aug;108(2):469–77.
31. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA.* 1998 Apr 15;279(15):1200–5.
32. Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jul;5(7):545–52.
33. Spindelegger C, Lanzenberger R, Wadsak W, Mien LK, Stein P, Mitterhauser M, et al. Influence of escitalopram treatment on 5-HT 1A receptor binding in limbic regions in patients with anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 2009 Nov;14(11):1040–50.
34. Olivier B, van Oorschoot R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. *Eur J Pharmacol.* 2005 Dec 5;526(1-3):207–17.
35. Gilman AG. Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 10th ed. Joel G. Hardman LEL, editor. Rio de Janeiro: MCGraw-Hill; 2005.
36. Sahu PK, Wang C-H, Lee S-L. Interaction of serotonin and fluoxetine: toward understanding the importance of the chirality of fluoxetine (S form and R form). *J Phys Chem B.* 2009 Oct 29;113(43):14529–35.
37. Moses-Kolko EL, Horner MS, Phillips ML, Hipwell AE, Swain JE. In search of neural endophenotypes of postpartum psychopathology and disrupted maternal caregiving. *J Neuroendocrinol.* 2014 Oct;26(10):665–84.
38. Dott M, Rasmussen S a, Hogue CJ, Reefhuis J. Association between pregnancy intention and reproductive-health related behaviors before and after pregnancy recognition, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Matern Child Health J.* 2010 May;14(3):373–81.
39. Wen SW, Yang Q, Garner P, Fraser W, Olatunbosun O, Nimrod C, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Apr;194(4):961–6.
40. Pubchem. Fluoxetine - Compound Summary (CID 62857) [Internet]. 2005 [cited 2012 Oct 3]. Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=62857&loc=ec_rcs
41. Bueno JS, Silva BJ., Queiroz MEC. Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Braz Chem Soc. Brazilian Chemical Society;* 2011 Jul;22(7):1221–8.
42. Sommi RW, Crismon ML, Bowden CL. Fluoxetine: a serotonin-specific, second-generation antidepressant. *Pharmacotherapy.* 7(1):1–15.
43. Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2000 Jan;85(1):11–28.
44. Heikkinen T. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. *Clin Pharmacol Ther.* 2003 Apr;73(4):330–7.
45. DeVane CL. Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cell Mol Neurobiol.* 1999 Aug;19(4):443–66.

46. McConathy J, Owens MJ. Stereochemistry in Drug Action. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2003 Apr;5(2):70–3.
47. DeVane CL, Boulton DW. Great expectations in stereochemistry: focus on antidepressants. *CNS Spectr*. 2002 Apr;7(4 Suppl 1):28–33.
48. Wong DT, Fuller RW, Robertson DW. Fluoxetine and its two enantiomers as selective serotonin uptake inhibitors. *Acta Pharm Nord*. 1990 Jan;2(3):171–80.
49. Fuller RW, Snoddy HD, Krushinski JH, Robertson DW. Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neuropharmacology*. 1992 Oct;31(10):997–1000.
50. Margolis JM, O'Donnell JP, Mankowski DC, Ekins S, Obach RS. (R)-, (S)-, and Racemic Fluoxetine N-Demethylation by Human Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2000 Oct 1;28(10):1187–91.
51. Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, Binkley SN, VandenBranden M, Wrighton SA. Identification of the Human Cytochromes P450 Responsible for in Vitro Formation of R- and S-Norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jun 1;297(3):1044–50.
52. Eap CB, Bondolfi G, Zullino D, Savary-Cosendai L, Powell-Golay K, Kosel M, et al. Concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine after multiple doses of fluoxetine in cytochrome P4502D6 poor and extensive metabolizers. *J Clin Psychopharmacol*. 2001 Jun;21(3):330–4.
53. Tanaka E, Hisawa S. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with psychoactive drugs: antidepressants and antipsychotics and the cytochrome P450 system. *J Clin Pharm Ther*. 1999 Feb;24(1):7–16.
54. Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. *Clin Pharmacokinet*. 2005 Jan;44(10):989–1008.
55. Wisner KL, Perel JM, Wheeler SB. Tricyclic dose requirements across pregnancy. *Am J Psychiatry*. 1993 Oct;150(10):1541–2.
56. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther*. 1997 Oct;62(4):400–7.
57. Rochat B, Amey M, Gillet M, Meyer UA, Baumann P. Identification of three cytochrome P450 isozymes involved in N-demethylation of citalopram enantiomers in human liver microsomes. *Pharmacogenetics*. 1997 Feb;7(1):1–10.
58. Sit DK, Perel JM, Helsel JC, Wisner KL. Changes in antidepressant metabolism and dosing across pregnancy and early postpartum. *J Clin Psychiatry*. 2008 Apr;69(4):652–8.
59. Freeman MP, Nolan PE, Davis MF, Anthony M, Fried K, Fankhauser M, et al. Pharmacokinetics of sertraline across pregnancy and postpartum. *J Clin Psychopharmacol*. 2008 Dec;28(6):646–53.
60. Altamura AC, Moro AR, Percudani M. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin Pharmacokinet*. 1994 Mar;26(3):201–14.
61. Scordo MG, Spina E, Dahl M-L, Gatti G, Perucca E. Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005 Nov;97(5):296–301.
62. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, Schmider J, Wright CE, Harmatz JS, et al.

- Human cytochromes mediating N-demethylation of fluoxetine in vitro. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997 Aug;132(4):402–7.
63. Henry ME, Schmidt ME, Hennen J, Villafuerte RA, Butman ML, Tran P, et al. A comparison of brain and serum pharmacokinetics of R-fluoxetine and racemic fluoxetine: A 19-F MRS study. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Aug;30(8):1576–83.
 64. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, Mayle DA, Krushinski JH, Robertson DW. Norfluoxetine enantiomers as inhibitors of serotonin uptake in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 1993 Jun;8(4):337–44.
 65. Fjordside L, Jeppesen U, Eap CB, Powell K, Baumann P, Brøsen K. The stereoselective metabolism of fluoxetine in poor and extensive metabolizers of sparteine. *Pharmacogenetics*. 1999 Feb;9(1):55–60.
 66. Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, Binkley SN, VandenBranden M, Wrighton SA. Identification of the human cytochromes p450 responsible for in vitro formation of R- and S-norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jun;297(3):1044–50.
 67. Caccia S, Cappi M, Fracasso C, Garattini S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990 Jan;100(4):509–14.
 68. Mårtensson B, Nyberg S, Toresson G, Brodin E, Bertilsson L. Fluoxetine treatment of depression. Clinical effects, drug concentrations and monoamine metabolites and N-terminally extended substance P in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatr Scand*. 1989 Jun;79(6):586–96.
 69. Lundmark J, Reis M, Bengtsson F. Serum concentrations of fluoxetine in the clinical treatment setting. *Ther Drug Monit*. 2001 Apr;23(2):139–47.
 70. Bergstrom RF, Lemberger L, Farid NA, Wolen RL. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of fluoxetine: a review. *Br J Psychiatry Suppl*. 1988 Sep;(3):47–50.
 71. Beasley CM, Bosomworth JC, Wernicke JF. Fluoxetine: relationships among dose, response, adverse events, and plasma concentrations in the treatment of depression. *Psychopharmacol Bull*. 1990 Jan;26(1):18–24.
 72. Stika CS, Frederiksen MC. Drug Therapy in Pregnant and Nursing Women. In: *Principles of Clinical Pharmacology*. 2007. p. 339–56.
 73. Hunt JN, Murray FA. Gastric function in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Emp*. 1958 Feb;65(1):78–83.
 74. Parry E, Shields R, Turnbull AC. Transit time in the small intestine in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1970 Oct;77(10):900–1.
 75. Dawes Bsc M, Chowienczyk Bsc PJ. Pharmacokinetics in pregnancy Lecturer in Clinical Pharmacology.
 76. Lund CJ, Donovan JC. Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. *Am J Obstet Gynecol*. 1967 Jun 1;98(3):394–403.
 77. Mendenhall HW. Serum protein concentrations in pregnancy. I. Concentrations in maternal serum. *Am J Obstet Gynecol*. 1970 Feb 1;106(3):388–99.
 78. Frederiksen MC, Ruo TI, Chow MJ, Atkinson AJ. Theophylline pharmacokinetics in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther*. 1986 Sep;40(3):321–8.
 79. Wood M, Wood AJ. Changes in plasma drug binding and alpha 1-acid glycoprotein in mother and newborn infant. *Clin Pharmacol Ther*. 1981 Apr;29(4):522–6.

80. Buster JE, Abraham GE. The applications of steroid hormone radioimmunoassays to clinical obstetrics. *Obstet Gynecol.* 1975 Oct;46(4):489–99.
81. Devroey P, Camus M, Palermo G, Smitz J, Van Waesberghe L, Wisanto A, et al. Placental production of estradiol and progesterone after oocyte donation in patients with primary ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Jan;162(1):66–70.
82. Tulchinsky D, Hobel CJ. Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1973 Dec 1;117(7):884–93.
83. Schneider MA, Davies MC, Honour JW. The timing of placental competence in pregnancy after oocyte donation. *Fertil Steril.* 1993 May;59(5):1059–64.
84. Davison JM, Hytten FE. Glomerular filtration during and after pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1974 Aug;81(8):588–95.
85. Davison JM, Hytten FE. The effect of pregnancy on the renal handling of glucose. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975 May;82(5):374–81.
86. Morgan DJ. Drug disposition in mother and foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997 Nov;24(11):869–73.
87. Thornburg KL, Faber JJ. The steady state concentration gradients of an electron-dense marker (ferritin in the three-layered hemochorial placenta of the rabbit. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 1976 Oct;58(4):912–25.
88. Callen PW. *Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology.* 4th ed. W.B. S, editor. London: Elsevier Health Sciences; 2000. 1104 p.
89. Hostetter A, Ritchie JC, Stowe ZN. Amniotic fluid and umbilical cord blood concentrations of antidepressants in three women. *Biol Psychiatry.* 2000 Nov;48(10):1032–4.
90. Loughhead AM, Fisher AD, Newport DJ, Ritchie JC, Owens MJ, DeVane CL, et al. Antidepressants in amniotic fluid: another route of fetal exposure. *Am J Psychiatry.* American Psychiatric Publishing; 2006 Jan 1;163(1):145–7.
91. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, et al. Human milk secretory immunoglobulin a and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J Nutr.* 2013 Dec;143(12):1906–12.
92. Kramer MS. “Breast is best”: The evidence. *Early Hum Dev.* 2010 Nov;86(11):729–32.
93. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O’Hare D, Schanler RJ, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2005 Feb 1;115(2):496–506.
94. Ito S, Lee A. Drug excretion into breast milk—Overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Apr;55(5):617–27.
95. Thomas AE, McKay DA, Cutlip MB. A nomograph method for assessing body weight. *Am J Clin Nutr.* 1976 Mar;29(3):302–4.
96. ATALAH SE et al. Propuesta de um nuevo estandar de evaluación nutricional em embarazadas. *Rev Med Chile.* 1997;125:1429–36.
97. Wilhelm SM, Kale-Pradhan PB. Estimating creatinine clearance: a meta-analysis. *Pharmacotherapy.* 2011 Jul;31(7):658–64.
98. Camelo Júnior JS, Martinez FE, Jorge SM, de Sala MM. A new method for sampling

maternal blood in the placental intervillous space. *Fetal Diagn Ther.* 1995;10(5):322–5.

99. Cardoso JLC, Lanchote VL, Pereira MPM, Capela JMV, Lepera JS. Influence of gasoline inhalation on the enantioselective pharmacokinetics of fluoxetine in rats. *Chirality.* 2013 Mar;25(3):206–10.
100. Ministério da Saúde. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Brasília - DF: ANVISA; 2012 p. 93.
101. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA, Comm Med Prod Hum Use. 2012;44(July 2011):1–23.
102. Guidance for Industry:bioanalytical method validation. Food and Drug Administration. 2001.
103. Trufelli H, Palma P, Famigliani G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* Jan;30(3):491–509.
104. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv. 2001;(May):4–10.
105. Food and Drug Administration. Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues. *Guid Ind.* 2003;118.
106. Brasil MDS. Atenção ao pré-natal de baixo risco. Editora do Ministério da Saúde, 2012. 2012. 318 p.
107. Claus BOM, Hoste EA, Colpaert K, Robays H, Decruyenaere J, De Waele JJ. Augmented renal clearance is a common finding with worse clinical outcome in critically ill patients receiving antimicrobial therapy. *J Crit Care.* 2013 Oct;28(5):695–700.
108. Darby RAJ, Callaghan R, McMahon RM. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. *Curr Drug Metab.* 2011 Oct;12(8):722–31.
109. Santos AC, O’Gorman DA FM. Obstetric Anesthesia. In: Barash PG, Cullen BF SR, editor. *Clinical Anesthesia.* 4th ed. Philadelphia; 2001.
110. Unceta N, Barrondo S, Ruiz de Azúa I, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Sallés J, et al. Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 1;852(1-2):519–28.
111. Gatti G, Bonomi I, Marchiselli R, Fattore C, Spina E, Scordo G, et al. Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. *J Chromatogr B.* 2002 Feb 5;784(2):375–83.
112. Jannuzzi G, Gatti G, Magni P, Spina E, Pacifici R, Zuccaro P, et al. Plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine: sources of variability and preliminary observations on relations with clinical response. *Ther Drug Monit.* 2002 Oct;24(5):616–27.
113. Pichini S, Pacifici R, Altieri I, Pellegrini M, Zuccaro P. Stereoselective Determination of Fluoxetine and Norfluoxetine Enantiomers in Plasma Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* Taylor & Francis Group; 1996 Jul 23;19(12):1927–35.
114. Chow TW, Szeitz A, Rurak DW, Riggs KW. A validated enantioselective assay for

- the simultaneous quantitation of (R)-, (S)-fluoxetine and (R)-, (S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Elsevier B.V.; 2011 Feb 15;879(5-6):349–58.
115. Kim J, Riggs KW, Rurak DW. Stereoselective pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in pregnant sheep. *Drug Metab Dispos.* 2004 Feb;32(2):212–21.
 116. Kim J, Axelson J, Kerns G, Yin W, Rurak D. Stereoselective determination of fluoxetine and norfluoxetine by gas chromatography with mass selective detection. In: *Pharm Res.* 1995. p. 12:S22.
 117. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Sep;4(9):764–74.
 118. Ke AB, Rostami-Hodjegan A, Zhao P, Unadkat JD. Pharmacometrics in pregnancy: An unmet need. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:53–69.
 119. Perez-Caballero L, Torres-Sanchez S, Bravo L, Mico JA, Berrocoso E. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov.* 2014 May;9(5):567–78.
 120. Aronoff GR, Bergstrom RF, Pottratz ST, Sloan RS, Wolen RL, Lemberger L. Fluoxetine kinetics and protein binding in normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther.* 1984 Jul;36(1):138–44.
 121. Lemberger L, Farid NA, Bergstrom RF, Wolen RL. Fluoxetine, pharmacology and physiologic disposition. *Int J Obes.* 1987 Jan;11 Suppl 3:157–61.
 122. Frishman WH, Elkayam U, Aronow WS. Cardiovascular drugs in pregnancy. *Cardiol Clin.* 2012 Aug;30(3):463–91.
 123. Sager JE, Lutz JD, Foti RS, Davis C, Kunze KL, Isoherranen N. Fluoxetine- and norfluoxetine-mediated complex drug-drug interactions: in vitro to in vivo correlation of effects on CYP2D6, CYP2C19, and CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Jun;95(6):653–62.
 124. Little BB. Pharmacokinetics during pregnancy: evidence-based maternal dose formulation. *Obstet Gynecol.* 1999 May;93(5 Pt 2):858–68.
 125. Shi S, Liu Y, Wu J, Li Z, Zhao Y, Zhong D, et al. Comparative bioavailability and tolerability of a single 20-mg dose of two fluoxetine hydrochloride dispersible tablet formulations in fasting, healthy Chinese male volunteers: an open-label, randomized-sequence, two-period crossover study. *Clin Ther.* 2010 Oct;32(11):1977–86.
 126. Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *J Clin Pharmacol.* 1999 Dec;39(12):1203–11.
 127. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5337–9.
 128. St-Pierre M V, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Oct;279(4):R1495–503.
 129. Ushigome F, Takanaga H, Matsuo H, Yanai S, Tsukimori K, Nakano H, et al. Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol.* 2000 Nov 10;408(1):1–10.

130. Weiss J, Dormann S-MG, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli WE. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Apr;305(1):197–204.
131. Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, Dormann S-MG, Haefeli WE. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Oct;307(1):262–7.
132. Pinto LS. Influência da inibição da glicoproteína-P pela fluoxetina na disposição cinética dos enantiômeros da fexofenadina em parturientes e suas relações com a transferência placentária. 2015;105.
133. Prouillac C, Lecoœur S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos.* 2010 Oct;38(10):1623–35.
134. Etwel F, Hutson JR, Madadi P, Gareri J, Koren G. Fetal and perinatal exposure to drugs and chemicals: novel biomarkers of risk. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:295–315.
135. Staud F, Ceckova M. Regulation of drug transporter expression and function in the placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015 Apr;11(4):533–55.
136. Ewing G, Tatarchuk Y, Appleby D, Schwartz N, Kim D. Placental transfer of antidepressant medications: implications for postnatal adaptation syndrome. *Clin Pharmacokinet.* 2015 Apr;54(4):359–70.
137. Moisés ECD, Duarte LDB, Cavalli RDC, Marques MP, Lanchote VL, Duarte G, et al. Pharmacokinetics of lidocaine and its metabolite in peridural anesthesia administered to pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Dec;64(12):1189–96.
138. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, et al. Human milk secretory immunoglobulin a and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J Nutr.* 2013 Dec 1;143(12):1906–12.