UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da doença de Chagas na farmacocinética-farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6

Carolina Pinto Vieira

Ribeirão Preto
2015

Carolina Pinto Vieira

Influência da doença de Chagas na farmacocinética-farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Carolina Pinto Vieira

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2015

Ficha catalográfica

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.

Vieira, Carolina Pinto

Influência da doença de Chagas na farmacocinética-farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6. Ribeirão Preto, 2015

120p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia

1. Nebivolol; 2. Doença de Chagas; 3.Idosos ; 4. Isômeros; 5. Farmacocinética; 5. Metabolismo ; 7. Cromatografia quiral; 8. CYP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Pinto Vieira

Influência da doença de Chagas na farmacocinética-farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.
Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora
Prof. Dr.
_____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.
_____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.
_____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.
_____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.
_____
Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho

À Deus, por me conceder mais uma oportunidade de crescimento e força para superar os desafios ao longo dessa caminhada.

À minha mãe Valéria, por estar do meu lado incondicionalmente nos momentos felizes e tristes da minha vida, sempre me apoiando e me incentivando a batalhar pelos meus sonhos.

À minha avó Helena, pelos seus constantes conselhos de vida, pelo seu carinho e atenção dispensados a mim em todos momentos da minha vida

Ao meu Pai Eduardo, Andressa, minha avó Rosmay, meus irmãos Matheus e Vinícius, minha sobrinha Manoella, por estarem ao meu lado, pelo amor e pelo apoio em minhas decisões.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos

À todos os pacientes, que aceitaram participar desse trabalho, dando sua colaboração indispensável para a realização do mesmo.

Ao Professor Dr Oscar Della Pasqua, pela sua orientação durante meu estágio sanduíche na University College London.

À Adriana e Maria Paula, pelos ensinamentos e pela ajuda constante na execução desse trabalho.

Ao Sr Natalino, pela ajuda e pela sua energia radiante que torna o laboratório um ambiente mais alegre.

À todos os colegas e amigos do laboratório: Ana Leonor, Carolina Miranda, Daniel, Daniela, Diego, Estela, Fábio, Francine, Gabriela, Giovana, João Paulo, Juciene, Marília, Milena, Natália, Natalícia, Roberta e Rodrigo, pelas trocas de experiência profissionais e pessoais, pela inestimável ajuda e pelo carinho no nosso convívio diário.

Aos meus amigos Glauco e Leandro, pelas incansáveis ajudas nos programas de computador indispensáveis para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Hospital Santa Lydia, pela parceria e contribuição no desenvolvimento do trabalho clínico.

Ao Dr. Ailton Marcelo Zanardi e a Dra. Taísa Andrade, pela contribuição e realização dos ecocardiogramas indispensáveis nesse trabalho.

Às funcionárias da seção de Pós-graduação, Ana, Rosana e Rosemary, pela dedicação e paciência.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – US*P* por possibilitar a realização do mestrado.

À minha amiga Thalita, pela amizade e apoio tão fundamentais.

À todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram pela a realização desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Agradecimento Especial

À Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote,

Pelo enriquecimento científico, profissional, pela orientação e compreensão constante proporcionados neste período.

Resumo

VIEIRA, C.P. **Influência da doença de Chagas na farmacocinética-farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6.** 2015. 120f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os antagonistas adrenérgicos dos receptores β, tais como o nebivolol, podem reduzir a mortalidade dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas causada pelo *Trypanossoma cruzi.* O nebivolol está disponível na clínica como mistura racêmica dos isómeros *d* e *l* com duplo mecanismo de ação. O *d*-nebivolol é antagonista do receptor adrenérgico β1, enquanto o *l*-nebivolol é responsável pelas propriedades vasodilatadoras do fármaco. O nebivolol é metabolizado principalmente por glicuronidação e metabolismo oxidativo dependente do CYP2D6, formando os glicuronídeos do nebivolol e os metabólitos hidroxilados do nebivolol, os quais contribuem para o antagonismo do receptor β1 adrenérgico. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da doença de Chagas na farmacocinética-farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6. Foram investigados pacientes idosos portadores da doença de Chagas (n = 11) e idosos hipertensos (n = 11) previamente fenotipados como metabolizadores extensivos (EM) ou metabolizadores lentos (PM) para o CYP2D6, usando o metoprolol como fármaco marcador (21 EM e 1 PM). As coletas seriadas de sangue foram realizadas até 48 h após a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. As concentrações plasmáticas dos isômeros individuais do nebivolol e glicuronídeos do nebivolol foram avaliadas por LC-MS/MS. O método mostrou linearidade nas concentrações de 15-3000 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma e de 0,2-125 ng de cada isômero do glicuronídeo do nebivolol/mL de plasma. Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados usando o programa Phoenix (WinNonlin) e expressos em mediana, média e intervalo de confiança 95%. Os testes estatísticos foram utilizados para comparar os parâmetros farmacocinéticos entre os isômeros (teste de Wilcoxon) e entre os grupos (teste de Mann-Whithey); $p < 0,05$. A farmacocinética do nebivolol é estereosseletiva em pacientes idosos hipertensos portadores (9,7 *vs.*. 6,1 ng.h/mL) ou não (10,1 *vs..* 5,4 ng.h/mL) da doença de Chagas forma crônica fenotipados como metabolizadores rápidos, com observação de maiores valores de AUC para o isômero *l*-nebivolol. A glicuronidação do nebivolol também é estereosseletiva em pacientes idosos hipertensos portadores (72,9 *vs..* 311,6 ng.h/mL) ou não (65,3 *vs.*. 335,2 ng.h/mL) da doença de Chagas forma crônica fenotipados como metabolizadores rápidos, com observação de maiores valores de AUC para o isômero *d*-glicuronídeo. A doença de Chagas forma crônica não altera a farmacocinética e a capacidade de glicuronidação de ambos os isômeros do nebivolol em pacientes fenotipados como metabolizadores rápidos. Os valores de *clearance* do *l*-nebivolol (48,6 *vs.*. 14,3 L/h) e do *d*-nebivolol (48,4 *vs..* 20,4 L/h) estimados pelo modelo populacional foram menores para os indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos quando comparados com os

metabolizadores rápidos do CYP2D6. O cálculo da biodisponibilidade dos isômeros individuais do nebivolol para os indivíduos metabolizadores rápidos (9% para o *l*-nebivolol e 5% para o *d*-nebivolol) e metabolizadores lentos (42% para o *l*-nebivolol e 29% para o *d*-nebivolol) do CYP2D6 permitiu inferir que o *clearance* não difere entre os isômeros na administração oral. As concentrações plasmáticas de nebivolol obtidas no presente estudo seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico a pacientes idosos hipertensos portadores ou não doença de Chagas não foram suficientes para detectar alterações nos intervalos PR, RR e QT, oriundos dos eletrocardiogramas, realizados nos mesmos tempos de colheita das amostras de sangue. Em conclusão, a doença de Chagas na forma crônica não alterou a farmacocinética e a farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol nos idosos investigados.

Palavras chaves: 1) Nebivolol; 2) Doença de Chagas; 3) Idosos; 4) Isômeros; 5) Farmacocinética; 6) Metabolismo; 7) Cromatografia quiral; 8) CYP.

Abstract

VIEIRA, C.P. **Influence of Chagas disease on the pharmacokinetics-pharmacodynamics of nebivolol isomers in elderly patients CYP2D6 extensive metabolizers.** 2015. 120f. Thesis (Doctorate). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil, 2015.

Adrenergic antagonists in β receptors, such as nebivolol may reduce mortality of patients in the chronic phase of Chagas disease caused by Trypanosoma cruzi. Nebivolol is available as a racemic mixture of d and l isomers with dual mechanism of action. The d isomer is a β1 adrenergic receptor antagonist, while the l isomer is responsible for the drug vasodilatory properties. Nebivolol is primarily metabolised by glucuronidation and oxidative metabolism dependent on CYP2D6 to form glucuronide and hydroxylated metabolites of nebivolol, which contribute to the antagonism of adrenergic receptor β1. This study aims to evaluate the effect of Chagas disease on the pharmacokinetics-pharmacodynamics of nebivolol isomers and its metabolites in CYP2D6 extensive metabolisers elderly patients. Hypertensive elderly patients with (n = 11) and without Chagas disease (n = 11) were previously phenotyped as extensive metabolizers (EM) or poor metabolizers (PM) for CYP2D6, applying metoprolol as a probe drug (21 EM and 1 PM). Serial blood samples were collected within 48 hours after a single oral dose administration of 10 mg racemic nebivolol. Plasma concentrations of nebivolol individual isomers and its glucuronides were measured by LC-MS/MS. The assay was linear over the rage of 15-3000 pg of each isomer of nebivolol/mL plasma and 0.2 to 125 ng of each isomer of nebivolol glucuronide/mL plasma. Pharmacokinetic parameters were evaluated applying Phoenix (WinNonlin) software and expressed as median, mean and 95% confidence interval. Statistical tests compared the pharmacokinetic parameters between isomers (Wilcoxon test) and between groups (Mann-Whithey test); $p < 0.05$. Pharmacokinetics of nebivolol is stereoselective in hypertensive elderly patients with (9.7 *vs.* 6.1 ng.h/mL) and without (10.1 *vs* 5.4 ng·h/mL) the chronic form of Chagas disease and phenotyped as extensive metabolisers, with higher AUC values for *l*-nebivolol. Nebivolol glucuronidation is also stereoselective in hypertensive elderly patients with (311.6 *vs* 72.9 ng.h/mL) and without (335.2 *vs* 65.3 ng.h/mL) the chronic form of Chagas disease and phenotyped as extensive metabolisers, with higher AUC values for *d*-glucuronide. The chronic form of Chagas disease does not alter the pharmacokinetics and glucuronidation capacity of either nebivolol isomers in patients phenotyped as extensive metabolizers. Clearance values for *l*-nebivolol (48.6 *vs* 14.3 L/h) and *d*-nebivolol (48.4 *vs* 20.4 L/h) estimated by the population model were lower for individuals phenotyped as CYP2D6 poor metabolisers compared to extensive metabolizers. Bioavailability calculation of individual nebivolol isomers for CYP2D6 extensive metabolisers (*l*-nebivolol 9%, *d*-nebivolol 5%) and poor metabolizers (*l*-nebivolol 42%, *d*-nebivolol 29%) made it possible to infer that clearance does not differ between the isomers in oral administration. Plasma concentrations of nebivolol observed in the present study following a single oral dose of 10 mg of racemic nebivolol to hypertensive elderly patients with and without Chagas disease were not sufficient to detect alterations in the PR, RR, and QT intervals in the electrocardiograms performed at the same

times of blood sampling. In conclusion, Chagas disease in the chronic form did not alter the pharmacokinetics or pharmacodynamics of nebivolol isomers in the investigated elderly patients.

Keywords: 1) Nebivolol; 2) Chagas Disease; 3) Elderly; 4) Isomers; 5) Pharmacokinetics; 6) Metabolism; 7) Chiral chromatography; 8) CYP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do nebivolol e principais sítios de metabolismo..... 14

Figura 2: Metabolismo do nebivolol no homem..... 16

Figura 3: Espectro de massas do íon protonado e do íon produto do nebivolol..... 29

Figura 4: Espectro de massas do íon protonado e do íon produto do padrão interno..... 29

Figura 5: Cromatogramas referentes à ordem de eluição dos isômeros do nebivolol..... 30

Figura 6: Cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma..... 31

Figura 7: Cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma após o procedimento de hidrólise enzimática..... 34

Figura 8: Avaliação da quantidade de enzima β-glucuronidase..... 35

Figura 9: Avaliação do tempo de hidrólise enzimática..... 35

Figura 10: Curvas concentração plasmática *vs.* tempo dos isômeros do nebivolol e glicuronídeo do nebivolol para um paciente idoso portador de doença de Chagas..... 37

Figura 11: Gráfico do tamanho da amostra..... 51

Figura 12: Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol e do glicuronídeo do nebivolol em pacientes idosos fenotipados como EM..... 59

Figura 13: Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol e do glicuronídeo do nebivolol para o paciente idoso, fenotipado como PM..... 60

Figura 14: Intervalo PR em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol..... 61

Figura 15: Intervalo RR em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol..... 62

Figura 16: Intervalo QTc em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol..... 63

Figura 17: Área sob a curva de efeito..... 64

Figura 18: Modelo de dose oral para os isômeros do nebivolol..... 77

Figura 19: Gráficos *goodnes of fit* para os indivíduos metabolizadores extensivos para o CYP2D6..... 80

Figura 20: Gráficos *goodnes of fit* para os indivíduos metabolizadores lentos para o CYP2D6..... 81

Figura 21: Verificação visual preditiva (*VPC*)..... 82

Figura 22: Avaliação pós preditiva (PPC) para o isômero *d*-nebivolol..... 84

Figura 23: Avaliação pós preditiva (PPC) para o isômero *l*-nebivolol..... 86

Figura 24: Histogramas de distribuição do NPDE para o isômero *d*-nebivolol..... 88

Figura 25: Histogramas de distribuição do NPDE para o isômero *l*-nebivolol..... 89

Figura 26: Gráficos espelhos (*mirror plots*) para os indivíduos metabolizadores extensivos para o CYP2D6..... 90

Figura 27: Gráficos espelhos (*mirror plots*) para os indivíduos metabolizadores lentos para o CYP2D6..... 91

Figura 28: Plots do *clearance* dos isômeros do nebivolol..... 94

Figura 29: Plots da biodisponibilidade oral dos isômeros do nebivolol.... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma..... 32

Tabela 2: Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma após o procedimento de hidrólise enzimática..... 36

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol e glicuronídeo do nebivolol em um paciente idoso portador de doença de Chagas..... 38

Tabela 4: Dados individuais dos pacientes idosos hipertensos não portadores da forma crônica da doença de Chagas..... 57

Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol em pacientes idosos fenotipados como EM..... 56

Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol em um paciente idoso portador da doença de Chagas e fenotipado como PM..... 57

Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol em pacientes idosos hipertensos fenotipados como EM 58

Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol em um paciente idoso hipertenso fenotipado como PM..... 59

Tabela 9: Dados demográficos dos indivíduos que foram incluídos no estudo..... 78

Tabela 10: Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos..... 95
(BOOTSTRAP)

Tabela I: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos dos pacientes do Grupo controle investigados..... 113

Tabela II: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos dos pacientes do Grupo doença de Chagas investigados..... 114

Tabela III: Dados individuais de eletrocardiograma e ecocardiograma dos pacientes idosos hipertensos portadores da forma crônica da doença de Chagas..... 115

Tabela IV: Dados individuais de eletrocardiograma e ecocardiograma dos pacientes idosos hipertensos não portadores da forma crônica da doença de Chagas..... 116

Tabela V: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *l*- nebivolol..... 118

Tabela VI: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *d*- nebivolol..... 119

Tabela VII: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *l*- glicuronídeo nebivolol..... 120

Tabela VIII: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *d*- glicuronídeo nebivolol..... 121

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT: Alanina transaminase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: Aspartato transaminase

AUC: área sob a curva concentração plasmática *vs.* tempo

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CQA: controle de qualidade de alta concentração

CQB: controle de qualidade de baixa concentração

CDQ: controle de qualidade de diluição

CQM: controle de qualidade de média concentração

Cl/f: *clearance* aparente

Cmax: concentração plasmática máxima

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo P450

CWRES: Resíduos ponderados condicionais – do inglês *conditional weighted residuals*

EM: metabolizador rápido

EPR: erro padrão relativo

ESI: eletronebulização

FDA: Food and Drug Administration

FMN: fator de matriz normalizado por padrão interno

GOF: *goodnes of fit*

HDL: High Density Lipoproteins

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

IFN-γ: interferon gama

IL-6: interleucina 6

IL-1α: interleucina 1 alfa

IMC: índice de massa corporal

KA: constante de absorção

LDL: Low Density Lipoproteins

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

LIQ: limite inferior de quantificação

LSQ: limite superior de quantificação

MRM: monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: espectrometria de massas

NONMEM: Efeitos mistos não lineares - do inglês *Nonlinear mixed effects modelling*

NO: óxido nítrico

NOS2: óxido nítrico sintase 2

NPDE: *normalized prediction distribution errors*

OFV: Valor da função objetiva – do inglês *objective function value*

PPC: *posterior predictive check*

PI: padrão interno

PM: metabolizador lento

PK-PD: farmacocinética-farmacodinâmica

t 1/2: meia vida de eliminação

TGO: aspartato transaminase

TGP: alanina transaminase

Tmax: tempo para atingir Cmax

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

Vd/f: volume aparente de distribuição

VHS: velocidade de hemossedimentação

VPC: Verificação visual preditiva– do inglês *visual predictive check*

v/v: volume/volume

VS.S: volume de distribuição no estado de equilíbrio

UGT1A1: Glicurunosiltransferase 1A1

UGT1A6: Glicurunosiltransferase 1A6

UGT2B3: Glicurunosiltransferase 2B3

UGT2B17: Glicurunosiltransferase 2B17

®: marca registrada

Sumário

Resumo i
Abstract iii
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS vii
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS ix
Introdução geral 14
Capítulo 1 18
1.Introdução 19
2. Objetivos 21
3. Casuística e métodos 21
3.1 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma 21
3.1.1 Soluções padrão e reagentes 21
3.1.2 Sistema de detecção por espectrometria de massas 21
3.1.3 Preparo das amostras 22
3.1.4 Determinação da ordem de eluição dos isômeros do nebivolol 22
3.1.5 Teste de racemização 23
3.1.6 Validação 23
3.2. Análise dos metabólitos glicuronídeos dos isômeros do nebivolol em plasma 25
3.2.1 Soluções padrão e reagentes 25
3.2.2 Sistema de detecção MS/MS 26
3.2.3 Hidrólise enzimática 26
3.2.4 Preparo das amostras 27
3.2.5 Validação 27
3.3 Casuística 27
3.4. Análise farmacocinética 28
4.Resultados ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.1 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.2 Análise dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol em plasma ..... **Erro! Indicador não definido.**
5. Discussão 29
6. Conclusão 33
Capítulo 2 34
1. Introdução 35
2. Objetivos 39

3. Pacientes e protocolo clínico 39
4. Análise farmacocinética e estatística 42
5. Avaliação do fenótipo do CYP2D6 42
6. Análise PK/PD 43
7. Resultados ..... **Erro! Indicador não definido.**
8.Discussão 44
9. Conclusões 50
Capítulo 3 51
1.Introdução 52
2. Objetivo 54
3. Casuística, métodos e resultados ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.1 Casuística e protocolo clínico ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.2. Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.3. Validação do modelo de farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol ..... **Erro! Indicador não definido.**
4. Discussão 55
5. Conclusões 58
Referências bibliográficas 59
ANEXOS 68
Apêndices 72

Introdução geral

O nebivolol, 1-(6-fluor-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)-2-{[2-(6-fluor-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)-2-hidroxietil]amino}etan-1-ol (Figura 1), um fármaco com quatro centros quirais, está disponível na clínica como mistura racêmica dos isômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS) (SELVAN et al., 2007; NANDANIA et al., 2013).

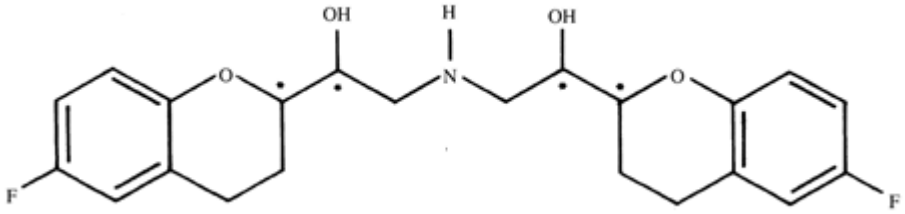

Figura 1: Estrutura química do nebivolol e principais sítios de metabolismo. *denota os centros quirais (MANGRELLA et al., 1998).

O nebivolol é usado na clínica no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca congestiva. O nebivolol é antagonista β_1 adrenérgico de terceira geração com ação vasodilatadora mediada pelo óxido nítrico via agonista do receptor β_3. O nebivolol atua como antagonista altamente seletivo do receptor β_1 adrenérgico com afinidade aproximadamente 320 vezes maior pelo receptor β_1 do que pelo receptor β_2 nas células do miocárdio humano (SELVAN et al., 2007; MUNZEL et al., 2009; AKSOY et al., 2012; FONGEMIE & FELIX-GETZIK, 2015).

A atividade antagonista β_1 adrenérgico do nebivolol reside no isômero *d*-nebivolol, pois a afinidade do *l*-nebivolol para o receptor β_1 adrenérgico é 175 vezes menor (PAUWELS et al., 1991). Um estudo duplo cego, randomizado e cruzado mostrou que em voluntários sadios o *l*-nebivolol não atenua o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica induzido pelo exercício, enquanto 5 mg de nebivolol racêmico ou 2,5 mg de *d*-nebivolol atenua com significância estatística os referidos parâmetros (NUETEM & CREE, 1998). No entanto, outros mecanismos estão envolvidos nas propriedades hemodinâmicas

do nebivolol além do antagonista β_1 adrenérgico. O *l*-nebivolol promove a liberação de óxido nítrico das células endoteliais, enquanto o *d*-nebivolol é destituído desta atividade. Esses achados contribuem para explicar a redução na resistência vascular periférica relatada para o nebivolol racêmico. Os efeitos do nebivolol racêmico na função ventricular esquerda são principalmente devido a ação antagonista β_1 adrenérgico do *d*-nebivolol, enquanto o *l*-nebivolol melhora os efeitos hemodinâmicos do *d*-nebivolol. Logo, o nebivolol racêmico reduz a pressão sistólica e a pressão diastólica e causa redução da resistência vascular periférica, sem deprimir a função ventricular esquerda (MANGRELLA et al., 1998; EVANGELISTA et al., 2007).

O nebivolol é um fármaco altamente lipofílico (coeficiente de distribuição octanol/água log P= 4,03) com eliminação dependente principalmente do metabolismo hepático. A fração da dose excretada na urina sob a forma inalterada é menor que 0,05% (CHEYMOL et al., 1997).

O metabolismo do nebivolol ocorre via N-desalquilação direta, glicuronidação e complexa hidroxilação aromática como mostra a Figura 2. As vias de N-desalquilação e hidroxilação são dependentes da atividade do CYP2D6, uma enzima que exibe polimorfismo genético. Os metabólitos hidroxilados e os conjugados com o ácido glicurônico também contribuem para o efeito antagonista do receptor β_1 adrenérgico (INGELMAN-SUDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005; LINDAMOOD et al., 2011; FONGEMIE & FELIX-GETZIK, 2015).

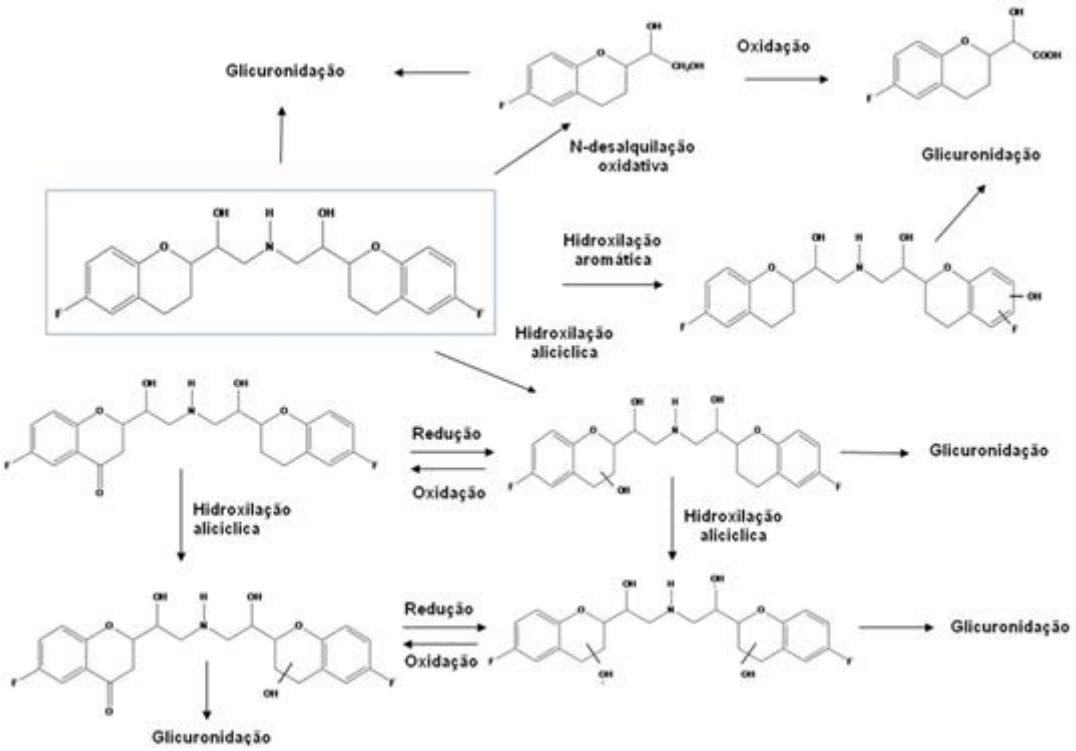

Figura 2: Metabolismo do nebivolol no homem (HENDRICKX et al., 1996)

Os conjugados hidroxilados são encontrados no plasma de pacientes fenotipados como metabolizadores rápidos para o CYP2D6 (EM), mas não no plasma de pacientes fenotipados como metabolizadores lentos para o CYP2D6 (PM). Considerando que os metabólitos hidroxilados e os conjugados glicuronídeos são ativos, os efeitos clínicos do nebivolol não diferem entre os pacientes fenotipados como PM ou EM. Ressalta-se ainda que em pacientes EM, o nebivolol administrado em doses iguais ou menores que 10 mg/dia, é antagonista β_1 seletivo, sendo que em pacientes PM, ou em doses maiores que 10 mg/dia, o nebivolol inibe tanto os receptores β_1 quanto os receptores β_2 adrenérgicos (LINDAMOOD et al., 2011; FONGEMIE & FELIX-GETZIK, 2015).

A biodisponibilidade oral do nebivolol é de 12% em pacientes EM e 96% em pacientes PM (VAN PEER et al., 1991; BRICIU et al., 2015). O tempo para atingir a concentração plasmática máxima (tmax) é de 0,5-2h em pacientes EM e de 3-6h em pacientes PM após a administração de dose única oral de 15 mg. A administração oral de nebivolol 5mg/dia durante 7 dias resulta em maiores valores de concentração plasmática máxima (Cmax) em pacientes PM do que em pacientes EM (VAN PEER et al., 1991).

O volume de distribuição aparente do nebivolol é alto, com valores variando de 10,1-39,4 $L.kg^{-1}$. A meia-vida de eliminação do nebivolol é de aproximadamente 8h em pacientes EM e de 27 h em pacientes PM. As diferenças observadas nos valores de meia-vida de eliminação entre pacientes EM e PM são decorrentes dos valores de *clearance* aparente, os quais são aproximadamente 4 vezes menores em pacientes PM (30 *vs.* 111 L/h). Os metabólitos do nebivolol são excretados nas fezes e na urina de pacientes EM, respectivamente representando 44% e 38% da dose. Em pacientes PM, os valores correspondentes são de 13% e 66% da dose (VAN PEER et al., 1991; FONGEMIE & FELIX-GETZIK, 2015).

O presente estudo avalia a influência da doença de Chagas na farmacocinética, metabolismo e na relação farmacocinética - farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol em pacientes idosos.

O estudo foi dividido em três capítulos. O capítulo 1 aborda o desenvolvimento e a validação do método de análise dos isômeros do nebivolol e seu metabólito glicuronídeo em plasma com aplicação em estudos de farmacocinética clínica. O capítulo 2 analisa por metodologia não compartimental a farmacocinética dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos glicuronídeos em pacientes idosos, portadores ou não da doença de Chagas. O capítulo 3 relata a análise farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol em voluntários portadores ou não da doença de Chagas por modelo não linear de efeitos mistos (NONMEM).

Capítulo 1

Análise dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos glicuronídeos em plasma por LC-MS/MS

1.Introdução

A farmacocinética dos isômeros individuais do nebivolol foi inicialmente descrita por Van Peer et al. (1991) empregando radioimunoensaio estereoespecífico, um método que não discrimina os isômeros do nebivolol dos seus metabólitos hidroxilados. O radioimunoensaio estereoespecífico (limite de detecção de 1ng de cada isômero /mL de plasma) também foi empregado por Himmelmann et al. (1996) na análise farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos e por Cheymol et al. (1997) (limite de detecção de 0,1 ng de cada isômero/mL de plasma) na avaliação da farmacocinética dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios e pacientes obesos.

A primeira separação cromatográfica dos isômeros do nebivolol foi reportada por Aboul-Enein (2001) nas colunas de fase quiral amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) (Chiralpak® AD e Chiralpak® AD-RH) empregando metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol como fases móveis. Os isômeros foram eluídos na sequência *d*-nebivolol e *l*-nebivolol com as fases móveis metanol, etanol e 1-propanol e na sequência inversa com as fases móveis 2-propanol e 1-butanol.

Lindamood et al. (2011) descreveram a farmacocinética dos isômeros do nebivolol em estudos de interação com hidroclorotiazida, furosemida, ramipril, digoxina, varfarina, losartana e fluoxetina em voluntários sadios. Os autores citam que os isômeros do nebivolol foram quantificados no plasma dos voluntários sadios empregando LC-MS/MS, embora não haja descrição, validação ou qualquer referência relativa ao método analítico empregado. Um estudo anterior do grupo (NEVES et al., 2013) descreveu pela primeira vez o desenvolvimento e a validação do método de análise do nebivolol em plasma humano empregando LC-MS/MS acoplado a coluna de fase estacionária quiral. Os isômeros foram separados na coluna Chirobiotic® V com fase móvel constituída por mistura de metanol: ácido acético: dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v). A extração dos isômeros do nebivolol foi realizada utilizando alíquotas de 2 mL de plasma em meio básico empregando como solução extratora a mistura de éter di-isopropílico:diclorometano (70:30, v/v). O método mostrou linearidade no intervalo de 25-2500 pg de cada isômero /mL de plasma.

Os conjugados glicuronídeos do nebivolol, além dos metabólitos oriundos da via oxidativa, são considerados ativos e representam quantitativamente os principais metabólitos encontrados no plasma. Os conjugados glicuronídeos de metabólitos hidroxilados também são encontrados no plasma de voluntários fenotipados como EM. Ressalta-se, no entanto, que o estudo clínico do metabolismo do nebivolol não descreve o método de análise dos conjugados glicuronídeos como mistura isomérica ou isômeros individuais (LINDAMOOD et al., 2011).

Para atender as exigências do presente estudo, o método desenvolvido por Neves et al. (2013) foi modificado com o objetivo de reduzir o volume de plasma e aumentar a sensibilidade do método analítico. O presente método desenvolvido empregando alíquotas de somente 500 μL de plasma exibe linearidade no intervalo de 15-3000 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma. A presente investigação ainda relata pela primeira vez a análise dos metabólitos glicuronídeos do nebivolol empregando coluna de fase quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS com limite de quantificação de 0,2 ng de cada metabólito/mL de plasma.

Os métodos de análise dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos glicuronídeos foram aplicados na investigação da estereosseletividade na disposição cinética e metabolismo do nebivolol em um paciente idoso portador da doença de Chagas e tratado com dose única oral do fármaco racêmico.

2. Objetivos

Desenvolver e validar os métodos de análise dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos glicuronídeos em plasma com aplicação em estudos de farmacocinética clínica.

3. Casuística e métodos

3.1 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma

3.1.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de nebivolol racêmico (cloridrato de nebivolol 98%, TRC, Ontário, Canadá) foi preparada na concentração de 100 µg da base livre/mL de metanol. A partir desta solução foram realizadas diluições para a obtenção das soluções de uso nas concentrações 1,2; 2,4; 4,8; 9,6; 24; 48; 96 e 240 ng de cada isômero do nebivolol/mL de metanol. A solução do padrão interno (S)-(-)-metoprolol (gentilmente doado pela AstraZeneca, Molndal, Suécia) foi preparada na concentração de 600 pg/mL de metanol.

Os solventes empregados nos procedimentos de extração e no preparo da fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da Tedia (Fairfield, EUA) como grau cromatografia. A água foi obtida em sistema de purificação Milli Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.1.2 Sistema de detecção por espectrometria de massas

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o triplo quadrupolo XEVO TQ-S (Waters, Milford, EUA) equipado com uma interface por eletronebulização (ESI). As análises foram executadas no modo ionização positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 2 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 150 e 550ºC, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 150 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $7x10^{-4}$ mbar. A voltagem do cone e a energia de colisão foram mantidas, respectivamente, em 25 V e 15 eV para o nebivolol e para o padrão interno.

A separação dos isômeros do nebivolol foi realizada na coluna Chirobiotic V® (partículas de 5 µm, 250 x 4,6 mm, Astec, Whippany, New Jersey, EUA), mantida à 24°C, e com fase móvel constituída de 95% da mistura de

metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) e 5% da mistura de água:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) na vazão de 0,8 mL/min.

As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão de nebivolol (170 ng/mL de metanol) e (S)-(-)-metoprolol (250 ng/mL de metanol) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 10 μL/min. As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 406>151 para o nebivolol e 268>116 para o padrão interno (S)-(-)-metoprolol. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4,1 (Waters, Milford, EUA).

3.1.3 Preparo das amostras

Alíquotas de 500 µL de plasma foram enriquecidas com 25 µL da solução de (S)-(-)-metoprolol (padrão interno), 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M e adicionadas de 50 mg de cloreto de sódio e 4 mL do solvente extrator éter di-isopropílico:diclorometano (70:30, v/v). Os tubos foram agitados em agitador horizontal (MA 139/CFT, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 40 min. Após o procedimento de centrifugação durante 10 min a 2500 rpm, a 15^0C (Himac CF 8DL, Hitachi, Tókio, Japão), 3,6 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos cônicos e evaporados 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 retomados em 200 µL de fase móvel e 40 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

3.1.4 Determinação da ordem de eluição dos isômeros do nebivolol

A ordem de eluição foi determinada pela análise individual do isômero puro *d*-nebivolol (SRRR, TRC, Ontário, Canadá) realizada de acordo com o método descrito no item 3.1.2.

3.1.5 Teste de racemização

De acordo com a descrição no ítem 3.1.2., os isômeros do nebivolol foram separados na coluna Chirobiotic V® com fase móvel constituída de 95% da mistura de metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) e 5% da mistura de água:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) na vazão de 1,0 mL/min.

Os isômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS) foram coletados do sistema HPLC-UV operando em 282 nm seguindo repetidas injeções da solução estoque de nebivolol racêmico preparada na concentração de 100 µg da base livre/mL de metanol. As alíquotas referentes a cada um dos isômeros individuais foram reunidas, evaporadas à secura e reconstituídas em 1mL de metanol.

Alíquotas de plasma branco foram enriquecidas com as soluções dos isômeros individuais do nebivolol e com o isômero puro *d*-nebivolol (SRRR, TRC, North York, Canadá) e submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.1.3. Os resíduos obtidos foram reconstituídos em fase móvel e injetados no sistema HPLC-UV.

3.1.6 Validação

O método desenvolvido foi validado de acordo com as recomendações descritas na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

As alíquotas de plasma utilizadas no preparo dos controles de qualidade (CQ) e das curvas de calibração foram obtidas de voluntários sadios (plasma branco), não tratados com medicamentos, no Hemocentro do HCFMRP-USP.

Os controles de qualidade foram preparados em plasma branco nas concentrações de 15 (Controle de qualidade do limite inferior de quantificação- CQLIQ), 45 (Controle de qualidade de baixa concentração- CQB), 1500 (Controle de qualidade de média concentração- CQM), 2400 (Controle de qualidade de alta concentração- CQA) e 5000 (Controle de qualidade de diluição- CQD) pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma. Os CQD foram diluídos na proporção de 1:2 em plasma branco imediatamente antes do procedimento de extração.

3.1.6.1 Determinação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se 8 amostras de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os plasmas foram processados de acordo com o item 3.1.3. Os extratos de plasma obtidos foram enriquecidos com o padrão interno (S)-(-)-metoprolol e com os isômeros do nebivolol nas concentrações equivalentes ao CQB e ao CQA. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN), conforme a fórmula a seguir:

FMN = (Resposta do analito em matriz/Resposta do padrão interno em matriz) / (Resposta do analito em solução/Resposta do padrão interno em solução).

Os resultados foram expressos como coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras.

3.1.6.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da análise de três curvas de calibração, construídas através de alíquotas de 500 µL de plasma branco enriquecidas com nebivolol nas concentrações de 15; 30; 60; 120; 300; 600; 1200 e 3000 pg de cada isômero/mL de plasma e incluindo a análise da amostra de plasma branco e da amostra zero. O método foi considerado linear até a maior concentração plasmática que apresentou desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal e com coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

3.1.6.3 Precisão e exatidão

A repetibilidade e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas. Os estudos foram realizados com os CQLIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Estas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -80 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-corrida foram analisadas 5 alíquotas de cada CQ através de uma única curva de calibração. Na avaliação

da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 alíquotas de cada CQ analisadas em 3 corridas analíticas diferentes.

A avaliação da precisão intra e intercorridas foram realizadas através do cálculo do CV dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido como preciso, o CV dos resultados obtidos deve ser igual ou inferior a 15% e o erro padrão relativo não deve exceder 15% para que o método possa ser considerado exato.

3.1.6.4 Estabilidade

As estabilidades de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta duração foram avaliadas em estudo anterior do grupo (NEVES et al., 2013).

3.2. Análise dos metabólitos glicuronídeos dos isômeros do nebivolol em plasma

3.2.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de nebivolol racêmico (cloridrato de nebivolol 98%, TRC, Ontário, Canadá) foi preparada na concentração de 100 µg da base livre/mL de metanol. A partir desta solução foram realizadas diluições para a obtenção das soluções de uso nas concentrações 8; 20; 80; 200; 400; 1000 e 5000 ng de cada isômero do nebivolol/mL de metanol.

A solução do padrão interno (S)-(-)-metoprolol foi preparada na concentração de 300 ng/mL de metanol. Os solventes empregados nos procedimentos de extração e como fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da Tedia (Fairfield, USA) como grau cromatografia.

A enzima β-glucuronidase (Tipo HP-2, *Helix pomatia*, atividade glicuronidase ≥ 100.000 Unidades / mL e atividade sulfatase ≤ 7.500 unidades/mL) utilizada na hidrólise enzimática foi obtida da Sigma (St. Louis, EUA) e o acetato de sódio utilizado para a preparação do tampão, foi obtido da J.T.Baker (Naucalpan, México) e preparado em água obtida em sistema de purificação Milli Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2.2 Sistema de detecção MS/MS

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface por eletronebulização (ESI). As análises foram executadas no modo ionização positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 150 e 550ºC, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 150 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $3x40^{-4}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 40 V para o nebivolol e 25 V para o padrão interno. A energia de colisão foi de 30 eV para o nebivolol e 15 eV para o padrão interno.

A separação dos isômeros do nebivolol e as condições de otimização do MS/MS foram obtidas de acordo com a descrição constante no item 3.1.2.

3.2.3 Hidrólise enzimática

A otimização da hidrólise enzimática foi realizada com as amostras de plasma referentes a concentração plasmática máxima (Cmax) de cada isômero de nebivolol para cada paciente incluído no estudo. Foram investigados a quantidade da enzima (25, 50 ou 100 µL) e os tempos (2, 4, 6, 8, 16 e 24 horas) de incubação das amostras de plasma à 37^{0}C (Figuras 8 e 9).

Alíquotas de 1000 µL de plasma branco (Hemocentro HCFMRP-USP) foram enriquecidas com 25 µL da solução de (S)-(-)-metoprolol (padrão interno) e adicionadas de 500 µL de tampão acetato de sódio 0,75 M, pH 5,0 e 25 µL da enzima β-glucuronidase. Os tubos foram agitados por 30 segundos e depois da homogeneização, as amostras foram mantidas em banho-maria à 37°C durante 16 h.

As concentrações individuais dos isômeros glicuronídeos do nebivolol (conjugado) foram calculadas como a diferença entre as concentrações totais (conjugado + não conjugado) e as concentrações oriundas do procedimento sem hidrólise enzimática (não conjugado).

3.2.4 Preparo das amostras

Após o procedimento de hidrólise enzimática, as amostras foram alcalinizadas com 200 µL da solução de NaOH 1M e submetidas ao processo de extração como descrito no item 3.1.3.

3.2.5 Validação

O método desenvolvido foi validado de acordo com a descrição constante no item 3.1.6. Foram avaliados o efeito matriz, a linearidade nas concentrações de 0,2 - 125 ng de cada isômero/mL, a precisão e a exatidão.

Os controles de qualidade foram preparados em plasma branco nas concentrações de 0,2 (Controle de qualidade do limite inferior de quantificação- CQLIQ), 0,5 (Controle de qualidade de baixa concentração- CQB), 50 (Controle de qualidade de média concentração- CQM), 100 (Controle de qualidade de alta concentração- CQA) e 500 (Controle de qualidade de diluição- CQD) ng de cada isômero do nebivolol/mL de plasma. Os CQD foram diluídos na proporção de 1:10 em plasma branco imediatamente antes do procedimento de extração.

3.3 Casuística

O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Protocolo CE*P* n° 244/2012 (ANEXO 1). Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi investigado um paciente idoso portador de doença de Chagas, de 66 anos e com função hepática e função renal dentro dos parâmetros da normalidade.

O paciente, em jejum de 8 h, recebeu pela manhã 2 comprimidos de 5mg de nebivolol racêmico (Nebilet®, Biolab) com 200mL de água. A dieta padrão do Hospital foi servida após 2h da administração do nebivolol. As amostras de sangue (5mL) foram coletadas em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000UI, Roche) nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 30; 36 e 48h. Os plasmas foram obtidos após centrifugação (1800g x 20min) das amostras de sangue e armazenados a –80ºC até o momento da análise.

3.4. Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol e seus metabólitos glicuronídeos foram calculados empregando o modelo bicompartimental com *lag time* (Programa Phoenix - WinNonLin versão 6.4; Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA).

5. Discussão

No presente capítulo estão apresentados os métodos de análise dos isômeros do nebivolol e do glicuronídeo do nebivolol em plasma empregando extração líquido-líquido e coluna quiral acoplada a espectrometria de massas. Os métodos foram aplicados na investigação da estereosseletividade na disposição cinética e metabolismo do nebivolol em um paciente idoso, hipertenso e portador de doença de Chagas seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.

A farmacocinética dos isômeros do nebivolol foi inicialmente descrita por Van Peer et al. (1991) em voluntários sadios fenotipados para o CYP2D6 como EM ou PM. Os voluntários sadios receberam doses crescentes de nebivolol racêmico de 5 mg a 30 mg po ou doses diárias de 5 mg po durante 7 dias e dose única de 0,5 mg iv. Os autores quantificaram as concentrações plasmáticas dos isômeros do nebivolol empregando radioimunoensaio estereoespecífico, um método que não discrimina os isômeros do nebivolol dos seus metabólitos hidroxilados. O mesmo método foi empregado por Himmelmann et al. (1996) na investigação de pacientes hipertensos tratados com doses diárias de 5 mg de nebivolol racêmico durante 4 semanas e por Cheymol et al. (1997) na avaliação da estereosseletividade na farmacocinética do nebivolol em voluntários sadios e em pacientes obesos tratados com dose única iv do fármaco racêmico (0,073 mg/Kg de peso corporal ideal). A separação dos isômeros do nebivolol em coluna de fase quiral foi descrita inicialmente por Aboul-Enein et al. (2001), no entanto os autores não descreveram a validação e a aplicação do método em farmacocinética clínica.

A análise dos isômeros do nebivolol em plasma empregando LC-MS/MS foi descrita por Lindamood et al. (2011) na avaliação da estereosseletividade na farmacocinética do nebivolol em voluntários sadios. No entanto, os autores não reportam o procedimento analítico e os parâmetros de validação. Os autores apenas citam que a linearidade do método foi de 20-1500 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma, embora os parâmetros farmacocinéticos estejam descritos como mistura isomérica, estimados usando a soma da concentração plasmática do *d*-nebivolol e *l*-nebivolol.

O nosso grupo de pesquisa, em um estudo anterior realizado por NEVES et al. (2013), foi o primeiro a desenvolver e validar um método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma empregando LC-MS/MS acoplado a coluna de fase quiral com aplicação em estudo de farmacocinética clínica. O método apresentou linearidade no intervalo entre 25-2500 pg de cada isômero/mL de plasma e exibiu sensibilidade para quantificar as amostras de plasma obtidas até 48 h após a administração de dose única oral de 10 mg do nebivolol racêmico.

O presente estudo descreve a análise dos isômeros *l*- e *d*- nebivolol em plasma utilizando a coluna quiral Chirobiotic® V acoplada ao sistema LC-MS/MS. A utilização de um equipamento mais sensível (XEVO TQ-S; Waters, Milford, EUA) possibilitou a extração dos isômeros do nebivolol em somente 500 μL de plasma e um menor limite inferior de quantificação (15 pg de cada isômero/mL de plasma) quando comparado ao método desenvolvido por Neves et al (2013), o qual utiliza alíquotas de 2 mL de plasma e resulta em limite inferior de quantificação de 25 pg de cada isômero /mL de plasma.

A análise dos isômeros do nebivolol foi realizada monitorando as transições 406>151 para o nebivolol e 268>116 para o padrão interno (S)-(-)-metoprolol. Esses dados estão de acordo com os estudos relatados por Ramakrishna et al. (2005) e Selvan et al. (2007) empregando LC-MS/MS na análise do nebivolol em plasma como mistura isomérica.

A ordem de eluição dos isômeros na sequência *l*-nebivolol e *d*-nebivolol foi determinada pela análise individual do isômero puro *d*-nebivolol (SRRR) (Figura 5) e os resultados foram compatíveis com estudos anteriores que reportam maiores concentrações plasmáticas do *l*-nebivolol quando comparado ao *d*-nebivolol (HIMMELMANN et al.,1996; LINDAMOOD et al., 2011; NEVES et al., 2013).

A análise de diferentes amostras de plasma branco (figura 6) não evidencia interferência dos componentes endógenos com os isômeros do nebivolol, indicando adequada seletividade. Os coeficientes de variação obtidos para todos os valores de FMN foram menores que 15% (tabela 1), indicando ausência de efeito matriz. A amostra de plasma branco analisada imediatamente após a amostra do LSQ não apresentou interferentes, indicando que não há efeito residual de injeções anteriores.

O método desenvolvido mostrou linearidade no intervalo de concentrações plasmáticas de 15-3000 pg de cada isômero/mL (coeficientes de correlação maiores que 0,99); Tabela 1. O limite de quantificação de 15 pg/mL de plasma permitiu a análise dos isômeros do nebivolol até 48 h após a administração de dose única de 10 mg de nebivolol racêmico. No entanto, o presente método pode ser relatado como o mais sensível até então desenvolvido. Os estudos de Lindamood et al. (2011) e Neves et al. (2013) empregando LC-MS/MS relatam, respectivamente, limites de quantificação de 40 e 25 pg de cada isômero/mL de plasma, enquanto os métodos que empregam radioimunoensaio reportam limites de detecção de 1ng de cada isômero/mL de plasma (Himmelmann et al., 1996) ou de 0,1 ng/mL de plasma (Cheymol et al., 2007).

Os estudos de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e erro padrão da média menores que 15% (tabela 1) indicando o método como preciso e exato. Os estudos de estabilidade foram realizados em estudo anterior do grupo e apresentaram coeficientes de variação menores que 15% na estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento (-70^{0}C e temperatura ambiente), estabilidade de curta duração (4 h à temperatura ambiente) e estabilidade pós-processamento (12 h no auto injetor a 4^{0}C) (NEVES et al., 2013).

O método desenvolvido para a análise dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol foi precedido de hidrólise enzimática. As condições de otimização da hidrólise enzimática mostraram que alíquotas de 1mL de plasma, adicionadas de 25 μL da enzima β-glucuronidase, incubadas por 16 horas, resultam em completa hidrólise dos glicuronídeos do nebivolol (Figuras 8 e 9). O método de análise dos isômeros do nebivolol precedido de hidrólise enzimática apresentou linearidade no intervalo de 0,2-125 ng de cada isômero/mL de plasma (Tabela 2). O limite de quantificação de 0,2 ng de cada isômero /mL de plasma permitiu a análise dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol até 48 h após a administração de dose única de 10 mg de nebivolol racêmico. O presente estudo é o primeiro a reportar um método de análise dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol precedido de hidrólise enzimática. Lindamood et al (2011) reportam linearidade no intervalo de concentrações plasmáticas no intervalo de 1-800 ng

de cada isômero do nebivolol total /mL de plasma considerando a soma do nebivolol inalterado e do glicuronídeo do nebivolol.

O método precedido de hidrólise enzimática exibe seletividade considerando que a análise de amostras de plasma branco não evidencia interferência dos componentes endógenos com os isômeros do nebivolol (Figura 7). O método não apresenta efeito matriz (Tabela 2) e não mostra efeito residual de injeções anteriores. O método é preciso e exato considerando que os coeficientes de variação e erro padrão da média foram menores que 15% (tabela 2).

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados na investigação da estereosseletividade na disposição cinética e metabolismo do nebivolol em um paciente idoso, hipertenso e portador de doença de Chagas. Os dados apresentados na tabela 3 permitem inferir acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol com observação de valores de aproximadamente 1,5 vezes maiores para o Cmax (concentração plasmática máxima) e AUC (área sob a curva concentração plasmática *vs.* tempo) quando comparado ao seu antípoda.

A farmacocinética do nebivolol como mistura isomérica foi descrita por Lindamood et al. (2011) na investigação de voluntários sadios tratados com doses múltiplas oral de 10 mg/dia de nebivolol racêmico como monoterapia ou em associação com outros fármacos. Na situação de monoterapia, as concentrações plasmáticas observadas foram de aproximadamente 0,7 ng/mL para o *d*-nebivolol e 1,3 ng/mL para o *l*-nebivolol confirmando o acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol.

Neves et al. (2013) descreveram pela primeira vez a farmacocinética dos isômeros do nebivolol na investigação de um paciente portador de hipertensão arterial sistêmica com observação de maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ (9,4 ng.h/mL *vs.* 4,7ng.h/mL) e menores valores de *clearance* aparente (531,8 *vs.* 1304,4 L/h) para o isômero *l*-nebivolol quando comparado ao isômero *d*-nebivolol. No presente estudo, também foram observados maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ (7,6 *vs.* 5,1 ng.h/mL) e menores valores de *clearance* aparente (655 *vs.* 980 L/h) do isômero *l*-nebivolol quando comparado ao isômero *d*- (Tabela 3).

Em relação ao metabólito glicuronídeo do nebivolol, os dados permitem inferir acúmulo plasmático do isômero *d (*293,24 *vs.* 44,92 ng.h/mL), explicando parcialmente o acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol (figura 10 e tabela 3).

6. Conclusão

Os métodos de análise dos isômeros do nebivolol em plasma, precedidos ou não de hidrólise enzimática, empregando a coluna de fase quiral Chirobiotic® V acoplada ao sistema LC-MS/MS, são precisos, exatos e sensíveis permitindo a quantificação dos isômeros do nebivolol até 48 h após a administração de dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico. A investigação de um paciente hipertenso portador da doença de Chagas mostrou maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ e menores valores de *clearance* aparente para o isômero *l*-nebivolol quando comparado ao isômero *d*. Em relação ao metabólito glicuronídeo do nebivolol, os dados permitem inferir acúmulo plasmático do isômero *d,* explicando parcialmente o acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol.

Capítulo 2

Influência da doença de Chagas na farmacocinética dos isômeros do nebivolol e glicuronídeo do nebivolol em pacientes idosos hipertensos

1. Introdução

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é crônica, sistêmica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)*, considerada uma doença tropical negligenciada e representa um grande problema de saúde na América Latina (RASSI JR et al., 2010; LE LOU*P* et al., 2011; BAHIA et al., 2014). A transmissão da doença de Chagas também pode ocorrer por transfusões sanguíneas, verticalmente da mãe para o filho, através de transplantes de órgãos ou de medula óssea ou da ingestão de alimentos contaminados como a fruta açaí ou carne crua, responsáveis por surtos endêmicos geralmente associados por uma infestação parasitária (RASSI JR et al., 2010; HOWARD et al., 2013; KALIL-FILHO, 2015).

Em 2010, a Organização Mundial da Saúde estimou que 10 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas, sendo 9 milhões somente na América Latina com uma taxa anual de óbitos em torno de 10 mil pessoas. Nas últimas décadas, a doença de Chagas tem sido cada vez mais diagnosticada em regiões consideradas não endêmicas, como a Europa, América do Norte, Austrália e Japão, como resultado de um intenso fluxo de imigrantes oriundos de países da América Latina, sendo assim considerada um problema mundial de saúde (RASSI JR et al., 2010; SALVADOR et al., 2015; ALBAREDA et al., 2015).

Desde a década de 80, a incidência da doença de Chagas vem declinando no Brasil, Chile e Uruguai. No começo do século XXI, o Brasil foi considerado livre de casos novos da doença de Chagas. No entanto, considerando o longo período de latência da doença, a América Central e a América do Sul ainda terão por mais algumas décadas pacientes com a doença de Chagas (RASSI JR et al., 2010; PY, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; HOWARD et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). Os pacientes com a doença de Chagas são geralmente idosos considerando que os progressos nos programas de controle tornam cada vez mais raros os aparecimentos de novos casos da doença (ALMEIDA et al., 2007).

A doença de Chagas ocorre em duas fases sucessivas. A fase aguda é usualmente assintomática ou caracterizada por febre, desconforto, taquicardia e alta parasitemia. As manifestações da fase aguda desaparecem em 90% dos pacientes infectados, mesmo se não tratados com fármacos tripanomicidas. Aproximadamente 60-70% dos referidos pacientes infectados evoluem para a

forma indeterminada crônica da doença, caracterizada por anticorpos contra *T. cruzi* no soro e eletrocardiograma, raio X de tórax, esôfago e cólon normais. Os outros 30-40% dos pacientes, evoluem para as formas determinadas da doença crônica, tais como a cardíaca, a digestiva e a cardiodigestiva. A fase cardíaca crônica é caracterizada por arritmias, aneurismas ventriculares, diminuição da fração de ejeção e morte súbita (PISSETTI et al., 2011; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA NUNES et al., 2013; KEATING et al., 2015; GARCIA et al., 2015).

A eletrocardiografia tem sido uma das principais ferramentas para a avaliação e auxílio no tratamento de pacientes com a doença de Chagas, pois a presença de anormalidades típicas no eletrocardiograma é necessária para o reconhecimento da fase crônica da doença de Chagas (RIBEIRO et al., 2014). As alterações eletrocardiográficas observadas incluem a bradicardia sinusal, bradicardia supraventricular, sístoles ventriculares, fibrilação atrial, bloqueio do ramo direito, bloqueio AV de primeiro grau e prolongamento do intervalo QT (RIBEIRO et al., 2014).

A natureza inflamatória das lesões cardíacas e o aumento da expressão de citocinas observados nos pacientes crônicos permitem inferir que os mediadores inflamatórios são críticos na progressão e na morbidade da doença de Chagas (CUTRULLIS et al., 2011). Os pacientes com cardiopatia chagásica crônica exibem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN-γ, TNF-α e IL-6 (SOUSA et al., 2014).

As doenças infecciosas e inflamatórias estimulam a liberação de citocinas dos monócitos, macrófagos e células do estroma, resultando na modulação das atividades dos fatores de transcrição no fígado. Essas alterações geralmente resultam em *down-regulation* da maioria dos genes CYP. A produção de citocinas também ativa a enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2) para a formação do óxido nítrico (NO), o qual inibe diretamente a atividade de enzimas CY*P* e/ou leva a *down-regulation* das proteínas CY*P* via desestabilização (AITKEN et al., 2006; MORGAN, 2009; CUTRULLIS et al., 2013).

Os antagonistas β adrenérgicos representam um dos tratamentos de escolha para as disfunções ventriculares ocasionadas na fase crônica da doença de Chagas (BESTETTI et al., 2011). Um estudo recente sugere que o uso de antagonistas β adrenérgicos pode ter efeitos benéficos no que se refere ao

aumento da sobrevida de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica (ISSA et al., 2010).

O nebivolol é um antagonista β adrenérgico de terceira geração, altamente seletivo para os receptores β_1, com ação vasodilatadora mediada pelo óxido nítrico e com efeitos benéficos na função endotelial vascular. O nebivolol é usado na clínica no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca congestiva (SELVAN et al., 2007; MUNZEL et al., 2009; AKSOY et al., 2012; FONGEMIE & FELIX-GETZIK, 2015).

O nebivolol é metabolizado no fígado principalmente pelo CYP2D6, uma via metabólica que sofre regulação genética polimórfica. As principais vias de metabolismo do nebivolol incluem a N-desalquilação, glicuronidação, oxidação e complexa hidroxilação aromática como mostra a Figura 2 (Introdução geral). As vias de N-desalquilação e hidroxilação são dependentes da atividade do CYP2D6. (INGELMAN-SUDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005; LINDAMOOD et al., 2011; BRICIU et al., 2015).

O polimorfismo genético pode influenciar a farmacocinética e a farmacodinâmica de muitos fármacos em uso na clínica. Com base no polimorfismo genético do CYP2D6 as populações são classificadas como metabolizadores rápidos (EM), metabolizadores lentos (PM) e metabolizadores ultrarrápidos (UM) (LU, 2007; BRICIU et al., 2015). A frequência de metabolizadores rápidos na população caucasiana é de 70-80% e de metabolizadores lentos (PM) é de 7 a 10% (FUX et al., 2005; FRANK et al., 2007; LU, 2007).

Os parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol estão descritos para a administração oral de doses crescentes de nebivolol de 5mg a 30mg, doses diárias de 5mg e administração de dose intravenosa de 0,5mg em voluntários sadios fenotipados como EM ou PM para o CYP2D6 (VAN PEER et al., 1991), para a administração oral diária de 5 mg do fármaco racêmico em pacientes hipertensos (HIMMELMANN et al., 1996) e para a administração intravenosa do fármaco (0,073 mg/Kg de peso corporal ideal) em voluntários sadios e em pacientes obesos (CHEYMOL et al., 1997). Os resultados obtidos nos três estudos, foram apresentados como a soma dos isômeros *d*- ou *l*-nebivolol mais seus respectivos metabólitos hidroxilados.

Os parâmetros farmacocinéticos do nebivolol foram descritos como mistura isomérica (*d*-nebivolol + *l*-nebivolol) em voluntários sadios seguindo a administração de dose única de 10 mg do fármaco racêmico, administrado sob monoterapia ou associado a fluoxetina. Nesse mesmo estudo, as concentrações plasmáticas dos isômeros individuais do nebivolol estão mostradas apenas em uma figura, a qual permite estimar concentrações plasmáticas máximas de aproximadamente 700 pg/mL para o *d*-nebivolol e 1300 pg/mL para o *l*-nebivolol (LINDAMOOD et al., 2011).

Os parâmetros farmacocinéticos dos isômeros individuais do nebivolol foram descritos pela primeira vez por Neves et al. (2013) em um estudo realizado com um paciente hipertenso tratado com dose única oral do fármaco racêmico. Os autores relatam acúmulo plasmático e menor valor de *clearance* aparente para o isômero *l*-nebivolol quando comparado ao isômero *d*-nebivolol.

A população de idosos no mundo cresce em um ritmo acelerado (KAYE et al., 2010; BHAMANI et al., 2013). Em consequência ao aumento da expectativa de vida, o Brasil em 2025 poderá ser o sexto país do mundo com maior número de pessoas idosas (SOUZA et al., 2015), pois a razão entre a população i1dosa e a população com idade inferior a 15 anos, aumentou de 6,2% em 1960 para 13,9% em 1991. Ressalta-se que em 2010 os idosos já representavam 7,4% da população brasileira e estimativas apontam um aumento de 106,8% no ano 2050 (COSTA et al., 2000; BORIM et al., 2013). O avanço da idade altera parâmetros fisiológicos tais como a ocorrência de mudanças elétricas e estruturais no miocárdio, a diminuição da concentração de albumina plasmática e a redução da atividade do sistema citocromo P-450 (CYP), dentre outros. Essas alterações e outras associadas à idade interferem nos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos medicamentos em geral (DENNER & VAN HEMEL, 2011; LONSDALE et al., 2013).

A presente investigação abrange o estudo da influência da forma crônica da doença de Chagas na farmacocinética e na relação PK/PD dos isômeros do nebivolol e glicuronídeo do nebivolol em pacientes idosos metabolizadores rápidos ou lentos para o CYP2D6. A forma crônica da doença de Chagas pode estar acompanhada da indução de citocinas pró-inflamatórias, podendo resultar na inibição das enzimas CY*P* envolvidas no metabolismo do nebivolol. Em resumo, o estudo avalia a interação fármaco-doença em termos de

enantiosseletividade, farmacogenética, farmacocinética, metabolismo, farmacodinâmica e relação PK-PD.

2. Objetivos

Avaliar a influência da doença de Chagas na disposição cinética e no metabolismo dos isômeros do nebivolol em pacientes idosos.

2.1- Fenotipar pacientes idosos hipertensos portadores ou não da doença de Chagas utilizando o metoprolol como fármaco marcador da atividade do CYP2D6.

2.2- Avaliar a estereosseletividade na farmacocinética do nebivolol em pacientes idosos hipertensos portadores ou não da doença de Chagas.

2.3- Avaliar a estereosseletividade no metabolismo de conjugação dos nebivolol com o ácido glicurônico.

2.4- Avaliar a influência da doença de Chagas na disposição cinética e no metabolismo dos isômeros do nebivolol em pacientes idosos.

2.5- Avaliar os parâmetros oriundos do eletrocardiograma (intervalos PR, RR e QT) como parâmetros farmacodinâmicos na análise PK-PD (farmacocinética-farmacodinâmica) do nebivolol em pacientes idosos hipertensos portadores ou não da doença de Chagas.

3. Pacientes e protocolo clínico

O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) (CEP/FCFR*P* nº 244) em 15 de março de 2012 (ANEXO 1). Os pacientes foram recrutados no Ambulatório de Cardiologia e Hipertensão Arterial Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Todos os pacientes foram informados em detalhes sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos e ficaram livres para recusar a participação no estudo ou retirar seu consentimento em qualquer fase da investigação. Após a assinatura do *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* (anexo 2). Foram incluídos pacientes portadores da doença de Chagas, em fase crônica, diagnosticados de acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (MINISTÉRIO DA

SAÚDE, SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005), com base no teste ELISA com antígeno total, eletrocardiograma e ecocardiograma. Todos os pacientes investigados foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais para a avaliação da função hepática (ALT, AST, gama GT, bilirrubina total e frações, fosfatase alcalina, eletroforese de proteínas e tempo de atividade de protrombina), atividade inflamatória (proteína C reativa ultra-sensível), função renal (uréia, creatinina, potássio sérico, urina rotina e microalbuminúria), avaliação metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL, hemoglobina glicada e glicemia de jejum) e avaliação da função cardíaca (ecocardiograma e eletrocardiograma).

Foram incluídos na investigação pacientes idosos hipertensos metabolizadores rápidos para o CYP2D6 (metoprolol como fármaco marcador) (HORAI et al., 1990), de ambos os sexos, com idade acima de 65 anos, portadores ou não da forma crônica da doença de Chagas. Durante o estudo foi permitido o uso de medicamentos associados ao tratamento de complicações da doença de Chagas, exceto o uso prévio de outros antagonistas de receptores β adrenérgicos ou antiarrítmicos. Os pacientes que estavam utilizando algum fármaco com possível ação na frequência cardíaca, foram submetidos a um período de *washout* para a eliminação de qualquer ação residual.

Os pacientes foram internados no Hospital Santa Lydia (Ribeirão Preto, SP) durante toda a condução do protocolo clínico. Nas situações de intercorrências, tais como o aparecimento de efeitos colaterais, foi garantido o afastamento do paciente do protocolo de pesquisa e o tratamento apropriado na Instituição.

Foram excluídos os pacientes idosos portadores de insuficiência cardíaca congestiva moderada ou grave (classificação NYHA acima de III), hipertensão refratária (vigência de quatro medicamentos anti-hipertensivos de classes distintas sem controle da pressão arterial), acidente vascular encefálico isquêmico ou hemorrágico recente (há menos de 6 meses), angina instável ou infarto agudo do miocárdio há menos de 6 meses, presença de ritmo de fibrilação atrial no eletrocardiograma, doença hepática ativa (vírus B/C, alcoolismo e hepatopatia secundária ao uso de medicamentos), pacientes em uso de medicamentos que possam inibir o CYP2D6 (quinidina, paroxetina, fluoxetina, bupropiona, cimetidina, cetoconazole, clozapina e outros), pacientes com

doenças graves com risco de morte, doenças psiquiátricas que afetam o juízo crítico da realidade e todos os pacientes que não concordaram em assinar o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

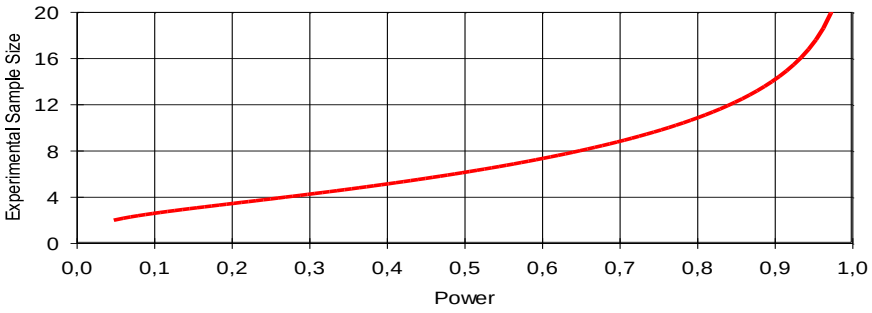

Figura 11: Gráfico do tamanho da amostra em relação ao poder de teste

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation,* versão 2.1.30 (DUPONT & PLUMMER, 1997), utilizando os parâmetros farmacocinéticos do nebivolol em voluntários sadios. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em $p < 0,05$, poder do teste de 80% e diferença entre as médias de AUC do nebivolol em 50% (AUC 7,76 ng.h/mL e desvio padrão de 3,07 ng.h/mL) (KAMALI et al., 1997). A Figura 11 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral. Como pode ser observado, a inclusão de 11 pacientes em cada grupo irá resultar em poder do teste acima de 80%.

Foram investigados 22 pacientes idosos hipertensos, sendo 11 não portadores e 11 portadores da forma crônica da doença de Chagas. Os grupos foram pareados em termos de idade, sexo e co-morbidades relacionadas ao grupo de estudo.

Os pacientes, em jejum de 8 h, receberam pela manhã 2 comprimidos de 5mg de nebivolol racêmico (Nebilet®, Biolab) com 200mL de água. A dieta padrão do Hospital foi servida após 2h da administração do nebivolol. As amostras de sangue (5mL) foram coletadas em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000UI, Roche) nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 10;12; 24; 30; 36 e 48h. Os plasmas foram obtidos após centrifugação (1800g x 20min) das amostras de sangue e armazenados a –70ºC até o momento da análise. Nos mesmos tempos das colheitas das amostras de sangue foram realizados eletrocardiogramas com

a finalidade de determinar o percentual de prolongamento dos intervalos PR e RR e encurtamento do intervalo QT.

A avaliação do fenótipo para o CYP2D6 foi realizada 48 h após a administração da dose única de nebivolol, no momento de alta do paciente, empregando o metoprolol como fármaco marcador. Os pacientes investigados receberam uma dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol (Seloken®, AstraZeneca) e um frasco para o armazenamento da urina em sua própria residência. Os pacientes foram orientados para coletarem toda a urina até 8h após a administração do metoprolol. O volume total da urina foi mensurado e uma alíquota foi armazenada a –70ºC até o momento da análise.

4. Análise farmacocinética e estatística

Os parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol e glicuronídeo do nebivolol foram obtidos dos dados de concentrações plasmáticas *vs.* tempo com o auxílio do programa Phoenix - WinNonLi*n* versão 6.4 (Pharsight Corp, Mountai*n* View, Calif, EUA), empregando o modelo 12 (bicompartimental com *lag-time)*. Para a avaliação das razões isoméricas do nebivolol e glicuronídeo do nebivolol, diferentes da unidade, foi empregado o teste de Wilcoxo*n* bicaudal para dados pareados. O teste de Mann-Whitney para dados não pareados foi utilizado para comparar os dados entre os Grupos controle e doença de Chagas. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%. A análise estatística foi realizada empregando o *software* R*: A language and environment for statistical computing* versão 3.1.2 (R Foundatio*n* for Statistical Computing, Viena, Áustria, 2014).

5. Avaliação do fenótipo do CYP2D6

O metoprolol e o α-hidroximetoprolol em urina foram analisados por HPLC com detecção por fluorescência (λ_{exc} = 229 nm e λ_{em} = 298 nm), de acordo com o procedimento desenvolvido e validado em estudo anterior do grupo (NEVES et al., 2013). Em resumo, alíquotas de 100 µL de urina foram alcalinizadas com 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1}, adicionadas de 100 mg de cloreto de sódio e extraídas com 2mL da solução diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v) durante 30 mi*n* em agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min).

As amostras foram centrifugadas a 1800g durante 5 mi*n* e as fases orgânicas (1,6 mL) concentradas sob fluxo de ar. Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel (mistura de tampão fosfato pH 3,5 e acetonitrila na proporção de 90:10 v/v) e 20 µL foram submetidos à análise cromatográfica. O metoprolol e seu metabólito foram separados na coluna R*P* Select B LiChrospher 60 (5 µm, 125 x 4 mm, Merck).

O fenótipo do CYP2D6 foi avaliado pela razão de concentrações urinárias metoprolol/α-hidroximetoprolol nas amostras coletadas até 8 h após a administração do fármaco marcador. O fenótipo metabolizador rápido (EM) foi definido para razões menores ou iguais a 12,6 (HORAI et al., 1990).

6. Análise PK/PD

A análise farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) foi realizada empregando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol como parâmetro farmacocinético e o prolongamento dos intervalos PR e RR e encurtamento do intervalo QT como parâmetros farmacodinâmicos.

Foram analisados os intervalos PR, RR e QT oriundos dos eletrocardiogramas registrados nos mesmos tempos de colheita das amostras de sangue do nebivolol. O intervalo PR foi analisado do início da onda *P* até o começo do complexo QRS, enquanto o intervalo RR foi considerado como um ciclo completo de dois complexos QRS seguidos. O intervalo QT foi calculado do início da onda Q do complexo QRS até o final da onda T do eletrocardiograma, corrigido pelas frequências cardíacas obtidas através da média de três intervalos RR sequenciais (ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA, 2009).

A análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do *d*-nebivolol e seus efeitos nos intervalos PR, RR e QT foi realizada com o auxílio do programa Phoenix - WinNonLi*n* versão 6.4. (Pharsight Corp, Mountai*n* View, Calif, EUA) (SANAEE & JAMALI, 2014).

8.Discussão

O presente estudo investiga a influência da doença de Chagas na disposição cinética, metabolismo e na relação PK-PD dos isômeros do nebivolol e do glicuronídeo do nebivolol em pacientes idosos hipertensos tratados com dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico.

O metabolismo do nebivolol é complexo e exibe hidroxilação e N-desalquilação dependente do polimorfismo genético do CYP2D6. O estudo de Cheymol et al. (1997) reporta que o metabolismo do *l*-nebivolol é mais influenciado pelo polimorfismo genético do CYP2D6 do que o metabolismo do *d*-nebivolol. No presente estudo, os pacientes foram fenotipados para o CYP2D6 utilizando o metoprolol como fármaco marcador. Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que dos 22 pacientes investigados, 21 apresentaram razões de concentrações urinárias metoprolol/α-hidroximetoprolol menores que 12,6, sendo classificados como metabolizadores rápidos (EM), enquanto um paciente apresentou razão de concentrações urinárias metoprolol/α-hidroximetoprolol maior que 200, sendo classificado como metabolizador lento (PM). Ressalta-se, no entanto, que o estudo de Neves (2013) reporta correlação significativa entre os valores de *clearance* aparente dos isômeros *d*-nebivolol e *l*-nebivolol e os valores das razões de concentrações plasmáticas metoprolol/α-hidroximetoprolol em pacientes hipertensos, pacientes com doença renal crônica e pacientes em hemodiálise. O estudo de Neves (2013) caracteriza a atividade *in vivo* do CYP2D6 como um fator preponderante nos valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros do nebivolol.

Estudos anteriores descreveram os parâmetros farmacocinéticos do nebivolol empregando radioimunoensaio estereoespecífico, um método que não discrimina os isômeros do nebivolol dos seus metabólitos hidroxilados (VA*N* PEER et al., 1991; HIMMELMAN*N* et al., 1996; CHEYMOL et al., 1997). Os parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol, como mistura isomérica, foram descritos em voluntários sadios por Lindamood et al. (2011). No entanto, em termos dos isômeros individuais do nebivolol, os autores apenas mostram uma figura com as concentrações plasmáticas dos isômeros do nebivolol em função do tempo obtidas após a administração de dose única de 10

mg do fármaco racêmico administrado sob a forma de monoterapia ou associado a fluoxetina.

A primeira descrição dos parâmetros farmacocinéticos separadamente para os isômeros *l*- e *d*- nebivolol foi relatada por Neves et al. (2013) na investigação de um paciente adulto portador de hipertensão arterial sistêmica, tratado com dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico com observação de acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol.

No presente estudo, a disposição cinética dos isômeros do nebivolol e do glicuronídeo do nebivolol foi avaliada em pacientes idosos, hipertensos e não portadores (Grupo controle; n = 11) ou portadores da forma crônica da doença de Chagas (Grupo doença de Chagas; n = 11).

Os valores de concentração plasmática máxima (2,15 *vs.* 1,33 ng/mL) e de $AUC^{0-\infty}$ (10,09 *vs.* 5,42 ng.h/mL) são maiores ($p < 0,05$) para o *l*-nebivolol quando comparados ao *d*-nebivolol para os pacientes do grupo controle. O acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol também foi observado para os pacientes do grupo doença de Chagas (Cmax=2,65 *vs.* 1,52 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ =9,71 *vs.* 6,10 ng.h/mL). As razões isoméricas de AUC *l*-nebivolol/*d*-nebivolol mostram valores medianos de 1,80 para o grupo controle e de 1,60 para o grupo doença de Chagas (Tabela 5).

Cheymol et al. (1997) não relatam estereosseletividade na farmacocinética do nebivolol administrado por via intravenosa, fato que denuncia que a estereosseletividade observada no presente estudo é oriunda da eliminação pré-sistêmica. Himmelman*n* et al. (1996) na investigação de pacientes hipertensos relataram estereosseletividade com acúmulo plasmático do *l*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados em relação ao *d*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados. No entanto, os dados obtidos na presente investigação não podem ser comparados com o estudo de Himmelman*n* et al. (1996), considerando que os autores analisaram o nebivolol plasmático empregando radioimunoensaio, um método que não discrimina os isômeros do nebivolol dos seus metabólitos hidroxilados.

Os resultados obtidos no presente estudo foram comparados com os dados de concentração plasmática *versus* tempo apresentados em uma figura por Lindamood et al. (2011) na investigação de voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg. Os referidos autores descrevem valores de

concentração plasmática máxima maiores para o *l*-nebivolol do que para o *d*-nebivolol, com valores aproximados de 1,30 ng/mL para o *l*-nebivolol e 0,70 ng/mL para o *d*-nebivolol. Neves et al. (2013) em uma investigação realizada em um paciente hipertenso tratado com dose única de 10 mg do fármaco racêmico relatam maiores valores de concentração plasmática máxima para o *l*-nebivolol (2,5 ng/mL) quando comparado ao *d*-nebivolol (1,2 ng/mL), confirmando o acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol na administração oral.

Os valores de *clearance* aparente descritos por Neves et al. (2013) são menores para o isômero *l*-nebivolol (531,8 L/h) quando comparado ao *d*-nebivolol (1304,4 L/h). Na presente investigação, os valores de *clearance* aparente menores também foram encontrados para o isômero *l*-nebivolol quando comparado ao *d*-nebivolol, tanto para o grupo controle (495,3 *vs.* 922,1 L/h) quanto para o grupo doença de Chagas (521,4 *vs.* 827,2 L/h).

Os parâmetros farmacocinéticos para os isômeros individuais do nebivolol obtidos para um paciente classificado como metabolizador lento para o CYP2D6, incluído no grupo doença de Chagas, estão apresentados na Tabela 6. Os dados permitem inferir estereosseletividade à semelhança dos metabolizadores rápidos, com maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ para o isômero *l*- nebivolol em comparação ao isômero *d*-nebivolol (332,9 *vs.* 160,6 ng/mL).

Os valores de $AUC^{0-\infty}$ observados para os pacientes com doença de Chagas são maiores para o paciente metabolizador lento (n = 1) quando comparados aos metabolizadores rápidos (n = 10), com valores de 332,90 *vs.* 9,71 ng/mL para o *l*-nebivolol e 160,60 *vs.* 6,10 ng/mL para o *d*-nebivolol (Tabelas 5 e 6). Logo, os valores de *clearance* aparente dos isômeros do nebivolol são muito menores no paciente metabolizador lento (15 e 31 L/h, respectivamente para os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol) quando comparados aos metabolizares rápidos (521,4 e 827,2 L/h, respectivamente para os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol). Esses resultados podem ser explicados considerando os relatos de baixos valores de biodisponibilidade oral do nebivolol em metabolizadores rápidos (12%), quando comparados aos metabolizadores lentos (96%) (VA*N* PEER et al., 1991).

A farmacocinética dos isômeros do glicuronídeo do nebivolol também exibe estereosseletividade tanto para os pacientes fenotipados como metabolizadores rápidos quanto para o metabolizador lento. Os valores de

concentração plasmática máxima e de $AUC^{0-\infty}$ para os pacientes metabolizadores rápidos incluídos no grupo controle (Cmax 7,81 *vs.* 54,96 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 65,30 *vs.* 335,23 ng.h/mL) e no grupo doença de Chagas (Cmax 10,49 *vs.* 50,46 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 72,94 *vs.* 311,57 ng.h/mL) são maiores para o isômero *d*-glicuronídeo quando comparado ao seu antípoda *l*-glicuronídeo. As razões isoméricas *d*/*l* do glicuronídeo do nebivolol foram aproximadamente 5 para ambos os grupos investigados (Tabela 7). Para o paciente classificado como metabolizador lento, os valores de Cmax (15,31 *vs.* 121,66 ng/mL) e de $AUC^{0-\infty}$ (240,54 *vs.* 1578,03 ng.h/mL) também foram maiores para o isômero *d*-glicuronídeo com razão isomérica *d*/*l* próxima a 7 (Tabela 8). Logo, a conjugação preponderante do isômero *d*-nebivolol com o ácido glicurônico explica o acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol nos pacientes metabolizadores rápidos e metabolizadores lentos. Ressalta-se que a porcentagem de conjugação variou entre 90-100 para ambos os isômeros do nebivolol nos grupos controle e doença de Chagas classificados como metabolizadores rápidos (Tabela 7).

A doença de Chagas forma crônica não alterou a farmacocinética de ambos os isômeros do nebivolol e do glicuronídeo do nebivolol nos pacientes idosos classificados como metabolizadores rápidos (Tabelas 5 e 7). No entanto, os pacientes com cardiopatia chagásica crônica exibem altos níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, TNF-α e IL-6 (SOUSA et al., 2014), as quais agem como inibidores da expressão de enzimas CY*P* em uma variedade de doenças inflamatórias com consequente redução do metabolismo e *clearance* de medicamentos (COUTANT et al., 2015). Embora existam poucas informações sobre o efeito da inflamação na capacidade de conjugação de medicamentos com o ácido glicurônico, estudos em hepatócitos de ratos e em experimentos com células humanas cancerosas sugerem *down* regulação do mRNA e da expressão das proteínas UGT1A1, UGT1A6, UGT2B3 e UGT2B17 em função do aumento das citocinas IL-1α e IL-6 (STRASSER et al., 1998; PANARO et al., 2010; LÉVESQUE et al., 1998). Um estudo anterior do grupo (LANCHOTE et al., 2015) relatou redução da atividade do CYP3A e do CYP2C19 em pacientes com leishmaniose visceral ativa e com concentrações plasmáticas de IL-6 variando entre 15.9-84.9 pg/mL. Machavaram et al. (2013) reportam que o impacto na atividade do CYP3A ocorre em pacientes com concentrações plasmáticas de IL-

6 entre 50-1000 pg/mL observadas em pacientes com doenças inflamatórias, tais como a artrite reumatoide. Na presente investigação não foram avaliadas as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, TNF-α e IL-6, no entanto, os dados obtidos de proteína C reativa (Tabelas I e II, Apêndice) mostram valores menores do que 10 mg/L para os pacientes portadores ou não da doença de Chagas. Ressalta-se que estudos da literatura relatam correlação entre as concentrações plasmáticas da proteína C reativa e da IL-6 (KIM et al., 2009), sendo que pacientes com câncer com concentrações plasmáticas de proteína C reativa maiores do que 10 mg/L mostram redução de 30% na atividade do CYP3A quando comparados com pacientes com concentrações plasmáticas de proteína C reativa menores do que 10 mg/L (RIVORY et al., 2002). Logo, as baixas concentrações plasmáticas de proteína C reativa encontradas nos pacientes idosos portadores da doença de Chagas forma crônica investigados (valores menores que 10 mg/L) explicam a ausência de alterações na farmacocinética do nebivolol dependente do CYP2D6 e do seu metabólito glicuronídeo do nebivolol dependente da UDP-glicuronil transferase.

No presente estudo, a farmacodinâmica do nebivolol foi avaliada nos mesmos tempos de colheita das amostras de sangue empregando os parâmetros dos eletrocardiogramas realizados, ou seja, mensurando os intervalos PR, RR e QT. Os antagonistas β adrenérgicos reduzem a mortalidade e morte súbita em pacientes com insuficiência cardíaca melhorando a dinâmica do intervalo QT. Pacientes portadores de insuficiência cardíaca com disfunção sistólica, tratados com 5 mg/dia de nebivolol durante pelo menos três meses, mostram redução do intervalo QT (corrigido e não corrigido pela dispersão) sem alteração da massa do ventrículo esquerdo. O intervalo QT é considerado um indicador da repolarização ventricular, a qual é diretamente influenciada pela saúde do miocárdio e atividade do sistema nervoso autonômico (AKSOY et al., 2012). Os intervalos PR e RR foram empregados como parâmetros da farmacodinâmica do nebivolol no estudo de Sanaee & Jamali (2014), seguindo a administração de dose única oral de 2mg de nebivolol racêmico/kg em ratos Sprague-Dawley. Os autores analisaram eletrocardiogramas obtidos até 24 h após a administração do nebivolol com relatos de prolongamento dos intervalos PR e RR.

Os intervalos PR, RR e QT oriundos dos eletrocardiogramas realizados nos mesmos tempos de colheita das amostras de sangue estão apresentados, respectivamente nas Figuras 14, 15 e 16, em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol, o isômero responsável pela atividade antagonista β_1 adrenérgica do nebivolol (PAUWELS et al., 1991). Os dados apresentados permitem inferir que os intervalos PR, RR e QT não alteraram em função das concentrações plasmáticas do *d*-nebivolol (< 2ng/mL) em todos os pacientes investigados, inviabilizando a análise PK-PD. Ressalta-se que Sanaee & Jamali (2014) reportaram em ratos concentrações plasmáticas máximas de nebivolol como mistura isomérica de 176±69 ng/mL, enquanto no presente estudo foram observados valores como misturas isoméricas de 3,4 ng/mL para o grupo controle e 4,1 ng/mL para o grupo doença de Chagas (Tabela 5). Logo, as concentrações plasmáticas de nebivolol obtidas no presente estudo seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico a pacientes idosos hipertensos portadores ou não doença de Chagas não foram suficientes para detectar alterações nos intervalos PR, RR e QT.

9. Conclusões

1- A farmacocinética do nebivolol é estereosseletiva em pacientes idosos hipertensos portadores ou não da doença de Chagas forma crônica fenotipados como metabolizadores rápidos, com observação de maiores valores de AUC para o isômero *l*-nebivolol.

2- A glicuronidação do nebivolol é estereosseletiva em pacientes idosos hipertensos portadores ou não da doença de Chagas forma crônica fenotipados como metabolizadores rápidos, com observação de maiores valores de AUC para o isômero *d*-glicuronídeo.

3- A doença de Chagas forma crônica não altera a farmacocinética e a capacidade de glicuronidação de ambos os isômeros do nebivolol em pacientes fenotipados como metabolizadores rápidos.

4- Os intervalos PR, RR e QT oriundos dos eletrocardiogramas realizados nos mesmos tempos de colheita das amostras de sangue não alteraram em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em todos os pacientes investigados.

Capítulo 3

Farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios e pacientes hipertensos portadores ou não da doença de Chagas

1.Introdução

A disfunção sistólica do ventrículo esquerdo ocasionada na fase crônica da doença de Chagas forma crônica vem sendo tratada com antagonistas β adrenérgicos (BESTETTI et al., 2011). O nebivolol é um antagonista altamente seletivo para receptores β_1 em doses menores ou iguais a 10 mg/dia, com afinidade aproximadamente 320 vezes maior para receptores β_1 quando comparados a receptores β_2 presentes em células do miocárdio humano. As propriedades vasodilatadoras do nebivolol são dependentes da liberação de NO via agonismo β_3 (FONGEMIE & FELIX-GETZIK, 2015)

A farmacocinética do nebivolol é estereosseletiva com acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol, o isômero responsável pelo antagonismo β adrenérgico. A eliminação do nebivolol é dependente do metabolismo oxidativo via CYP2D6 e da conjugação com o ácido glicurônico (LINDAMOOD et al., 2011). Um estudo recente publicado por Luo et al. (2015) reporta que em microssomos de fígado humano o CYP2D6 está envolvido no metabolismo do *l*-nebivolol, enquanto o metabolismo do *d*-nebivolol ocorre via CYPC19.

A farmacocinética populacional empregando modelos hierárquicos não lineares de efeitos mistos foi inicialmente utilizada na análise de amostras biológicas coletadas de forma escassa e dispersa em populações heterogêneas (SHEINER et al., 1977). No entanto, estes modelos atualmente estão sendo aplicados em estudos clínicos controlados para gerar informações farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas a partir de amostragens esparsas ou frequentes, em grandes ou pequenas populações e em todas as fases do desenvolvimento de fármacos (AARONS, 1993), sendo uma ferramenta de análise cada vez mais encorajada pelo FDA (Food and Drug Administratio*n* - Guidance for Industry Populatio*n* Pharmacokinetics, 1999), mas muito pouco utilizada no Brasil.

Os objetivos do desenvolvimento de modelos populacionais incluem a seleção da dose e a predição da exposição ou da resposta ao fármaco em uma população. Neste contexto, a identificação da influência de covariáveis como características demográficas, pode desempenhar a função de estimar parâmetros precisos com subsequentes predições (RIBBING & JONSSON, 2004). O método *stepwise* é o mais comumente utilizado para selecionar as

covariáveis que exibem alta correlação com os dados do estudo. O procedimento constrói iterativamente uma sequência de modelos de regressão pela adição ou eliminação de variáveis em cada etapa do desenvolvimento do modelo (WÄHLBY et al., 2002).

A farmacocinética populacional permite ainda identificar as relações quantitativas dos parâmetros farmacocinéticos com as diferentes características dos pacientes, tais como o peso, a idade, o *clearance* de creatinina, o fenótipo, os parâmetros bioquímicos, dentre outros, com consequente minimização da variabilidade na resposta terapêutica ou eventos adversos entre subgrupos populacionais (JOERGER, 2012). O programa computacional mais utilizado em estudos de análise da farmacocinética populacional é o NONMEM, um programa de efeitos mistos não lineares, que consta de mais de 300 publicações sobre a descrição de seu uso em estudos de farmacocinética populacional (ISBISTER & BIES, 2015; DUFFULL et al., 2005).

O presente estudo reporta a farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios e pacientes hipertensos portadores ou não da doença de Chagas com o objetivo de estimar os parâmetros farmacocinéticos, suas variabilidades interindividuais e padrão de distribuição.

2. Objetivo

Desenvolvimento de um modelo de farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios e pacientes hipertensos portadores ou não da doença de Chagas, utilizando modelo não linear de efeitos mistos com avaliação da influência de covariáveis contínuas (exames bioquímicos, idade, peso e IMC) e de covariáveis categóricas (gênero, fenótipo do CYP2D6, presença ou ausência da doença de Chagas ou hipertensão arterial).

4. Discussão

A farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol foi avaliada por modelo não linear de efeitos mistos (modelo hierárquico) que se mostrou preciso e com capacidade preditiva adequada por métodos de avaliação do ajuste do modelo aos dados e validação. O resultado do *bootstrap* (Tabela 10) mostra que as estimativas dos parâmetros a partir dos dados clínicos observados são muitas próximas das geradas pelo *bootstrap* que apresentou valores adequados de CV% apesar do número baixo de indivíduos incluídos, comprovando a robustez, precisão e a confiabilidade dos valores dos parâmetros farmacocinéticos estimados populacionalmente. O modelo final também foi validado baseado em gráficos como VPC - *visual predictive check, posterior predictive check*, PPC, NPDE - *normalized prediction distribution erros* e os gráficos espelhos (*mirror plots).*

Com a finalidade de estimar a biodisponibilidade real dos isômeros do nebivolol, os valores de c*learance* individuais dos isômeros (48,6 L/h para o *l*-nebivolol e de 48,4 L/h para o *d*-nebivolol) e os valores de volume de distribuição no estado de equilíbrio (VS.S) (599 L para o *l*-nebivolol e de 739 L para o *d*-nebivolol), foram fixados no modelo, oriundos de um estudo realizado com voluntários sadios tratados com dose única intravenosa do nebivolol racêmico (0,073 mg/Kg de peso corporal ideal) (CHEYMOL et al., 1997). Os valores estimados de biodisponibilidade no modelo populacional desenvolvido no presente estudo foram muito maiores nos indivíduos metabolizadores lentos (42% para o *l*-nebivolol e de 29% para o *d*-nebivolol) quando comparados com os valores estimados para os indivíduos metabolizadores rápidos (9% para o *l*-nebivolol e de 5% para o *d*-nebivolol). Ressalta-se que Va*n* Peer et al. (1991). também relatam maiores valores de biodisponibilidade oral do nebivolol como mistura isomérica para os indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos (96%) quando comparados com os metabolizadores rápidos (12%).

Os valores de *clearance* populacional obtidos para os pacientes fenotipados como metabolizadores lentos foram menores tanto para o *l*-nebivolol (20,4 L/h) quanto para o *d*- nebivolol (14,3 L/h) quando comparados com os valores fixados no modelo para os indivíduos fenotipados como metabolizadores rápidos, sendo 48,6 L/h para o *l*-nebivolol e 48,4 L/h para o isômero *d*-nebivolol

(CHEYMOL et al., 1997). A farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol foi anteriormente relatada por Jonsso*n* et al. (2014) em pacientes tratados em regime de monoterapia ou em associação com a valsartana. Os autores relatam para os pacientes metabolizadores rápidos tratados em regime de monoterapia, maiores valores de *clearance* aparente (Cl/f) para o isômero *d*-nebivolol quando comparado ao *l*-nebivolol (2098 vs. 1179 L/h). Em relação aos metabolizadores lentos, os autores também relatam maiores valores de *clearance* aparente para o isômero *d*-nebivolol quando comparado ao *l*-nebivolol (97,7 *vs.* 26,0 L/h). Os dados permitem inferir que os valores de biodisponibilidade diferem entre os isômeros do nebivolol, mas os valores de *clearance* não diferem entre os isômeros na administração oral (Tabela 10).

O fenótipo do CYP2D6 influenciou a constante de velocidade de absorção (KA) e o tempo de *lag-time* (T *lag*) de ambos os isômeros do nebivolol. Os valores da constante de velocidade de absorção foram maiores para os metabolizadores rápidos (5,29 para o *d*- nebivolol e 4,48 h^{-1} para o *l*- nebivolol) quando comparados com os indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos (0,49 para o *d*-nebivolol e 1,54 h^{-1} para o *l*-nebivolol). De maneira análoga, foram observados maiores valores de tempo de *lag time* para os indivíduos fenotipados como metabolizadores rápidos (0,41 para o *d*- nebivolol e 0,37 mi*n* para o *l*-nebivolol) quando comparados com os metabolizadores lentos (0,38 para o *d*-nebivolol e 0,19 para o *l*-nebivolol); Tabela 10. Esses resultados sugerem que a drástica redução no processo de eliminação pré-sistêmica observada nos metabolizadores lentos favorece a ocorrência de altas concentrações de ambos os isômeros do nebivolol no sítio de absorção intestinal. A alta biodisponibilidade oral dos isômeros do nebivolol nos pacientes fenotipados como metabolizadores lentos (42% para o *l*-nebivolol e 29% para o *d*-nebivolol) pode ser uma possível explicação para os menores valores de tempo de *lag time* estimados para os isômeros do nebivolol, permitindo que o nebivolol atinja a circulação sistêmica em um menor tempo quando comparado com os indivíduos metabolizadores rápidos.

O peso foi introduzido como uma covariável no modelo populacional do *l*-nebivolol (Tabela 10), de acordo com o estudo de Cheymol et al. (1997) com relatos de que o volume de distribuição do nebivolol não corrigido pelo peso corporal (volume de distribuição em L) aumenta em pacientes obesos. Os

autores relatam que apesar do coeficiente de partição octanol/água do nebivolol sugerir extensa difusão para o tecido adiposo, os dados oriundos de pacientes obesos mostram distribuição similar do nebivolol entre o tecido adiposo e o tecido magro.

A introdução da covariável ALT (alanina transaminase) como uma covariável no modelo populacional do *l*-nebivolol (Tabela 10) é explicada em função do nebivolol ser eliminado essencialmente por metabolismo hepático dependente do CYP2D6 e de enzimas de conjugação. Estudos anteriores relatam que o metabolismo do *l*-nebivolol é mais influenciado pelo CYP2D6, consequentemente mais influenciado pelo polimorfismo genético do CYP2D6, enquanto o metabolismo do *d*-nebivolol parece ser mais dependente do CYP2C19, uma enzima presente em menor conteúdo nos microssomos de fígado humano quando comparada ao CYP2D6 (VA*N* PEER et al., 1991; LUO et al., 2015).

Concluindo, o desenvolvimento e a validação do modelo de farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol permitiu o cálculo da biodisponibilidade dos isômeros individuais do nebivolol para os indivíduos metabolizadores rápidos e metabolizadores lentos do CYP2D6, inferindo que o *clearance* não difere entre os isômeros na administração oral.

5. Conclusões

1- O modelo não linear de efeitos mistos para a análise da farmacocinética populacional dos isômeros do nebivolol é preciso e possui capacidade preditiva adequada avaliada por métodos visuais e *bootstrap* do ajuste do modelo aos dados.

2- Os valores de biodisponibilidade de ambos os isômeros do nebivolol, estimados pelo modelo populacional, foram maiores para os indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos quando comparados com os metabolizadores rápidos do CYP2D6.

3- Os valores de *clearance* de ambos os isômeros do nebivolol, estimados pelo modelo populacional, foram menores para os indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos quando comparados com os metabolizadores rápidos do CYP2D6.

4- Os valores da constante de velocidade de absorção e tempo de *lag time* de ambos os isômeros do nebivolol foram maiores para os metabolizadores rápidos quando comparados com os indivíduos fenotipados como metabolizadores lentos.

5- O cálculo da biodisponibilidade dos isômeros individuais do nebivolol para os indivíduos metabolizadores rápidos e metabolizadores lentos do CYP2D6, permitiu inferir que o *clearance* não difere entre os isômeros na administração oral.

Referências bibliográficas

AARONS, L. Sparse data-analysis. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, UK, v. 18, n. 1, p. 97-100, 1993.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. HPLC enantiomeric resolution of nebivolol on normal and reversed amylose based chiral phases. **Pharmazie**, Saudi Arabia, v. 56, n. 3, p. 214-216, 2001.

AITKEN, A.E.; RICHARDSON, T.A.; MORGAN, E.T. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. **Annu Rev Phamacol Toxicol**, USA, v. 46, p. 123-49, 2006.

AKSOY, S.M.; CAY, S.; CAGIRCI, G.; SEN, N. Nebivolol therapy improves QTc and QTcd parameters in heart failure patients. **Cardiovasc J Afr**, Turkey, v. 23, n. 4, p. 191-193, 2012.

ALBAREDA, M.C.; PEREZ-MAZLIAH, D.; NATALE M.A.; CASTRO-EIRO, M.; ALVAREZ, M.G.; VIOTTI, R, BERTOCCHI, G, LOCOCO, B, TARLETON, R.L, LAUCELLA, S.A. Perturbed T cell IL-7 receptor signaling in chronic Chagas disease. **J Immunol**, Argentina, v. 194, n. 8, p. 3883-3889, 2015.

ALMEIDA, E.A.; BARBOSA NETO, R.M.; GUARIENTO, M.E.; WANDERLEY, J.S.; SOUZA, M.L. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brazil, v. 40, n. 3, p. 311-315, 2007.

ANDRADE, J.P.; MARIN NETO, J.A.; PAOLA, A.A.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G.M.; BACAL, F.; BOCCHI E,A.; ALMEIDA D,R.; FRAGATA FILHO, A.A.; MOREIRA MDA, C.; XAVIER, S.S.; OLIVEIRA JUNIOR, W.A.; DIAS, J.C. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arq Bras Cardiol**, Brazil, v. 96, n. 6, p. 434-442, 2011.

ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA. Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia sobre análise e emissão de laudos eletrocardiográficos. **Arq Bras Cardiol**, Brazil, v. 93, n. 3, p. 2-19, 2009. Supplement 2.

BAHIA, M.T.; DINIZ, L de F.; MOSQUEIRA, V.C. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opin Investiq Drugs**, Brazil, v. 23, n. 9, p. 1225-1237, 2014.

BAUER, R. J. NONMEM users guide: introduction to NONMEM 7.2.0. Ellicott City, USA: **ICON Development Solutions**: p. 128, 2011.

BESTETTI, R.B.; OTAVIANO, A.P.; CARDINALLI-NETO, A.; DA ROCHA, B.F.; THEODOPOULOS, T.A.; CORDEIRO, J.A. Effects of β-blockers o*n* outcome of patients with Chagas cardiomyopathy with chronic heart failure. **Int J Cardiol,** Brazil, v. 151, n. 2, p. 205-208, 2011.

BHAMANI, M.A.; KARIM, M.S.; KHAN, M.M. Depressio*n* i*n* the elderly i*n* Karachi, Pakistan: a cross sectional study. **BMC Psychiatry**, Pakistan, v. 13, p.181, 2013. Supplement 3.

BORIM, F.S.; BARROS, M.B.; BOTEGA, N.J. Commo*n* mental disorders among elderly individuals: a population-based study i*n* Campinas, São Paulo State, Brazil. **Cad Saude Publica**, Brazil, v. 29, n. 7, p. 1415-1426, 2013.

BRICIU, C.; NEAG, M.; MUNTEAN, D.; BOCSAN, C.; BUZOIANU, A.; ANTONESCU, O.; GHELDIU, A.M.; ACHIM, M.; POPA, A.; VLASE, L. Phenotypic differences i*n* nebivolol metabolism and bioavailability i*n* healthy volunteers. **Clujul Med**, Romania, v. 88, n. 2, p. 208-213, 2015.

CHEYMOL, G.; WOESTENBORGHS, R.; SNOECK, E.; IANUCCI, R.; LE MOING, J.P.; NADITCH, L.; LEVRON, J.C.; POIRIES, J.M. Pharmacokinetic study and cardiovascular monitoring of nebivolol i*n* normal and obese subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol***,* Germany, v. 51, n. 6, p. 493-498, 1997.

COSTA, M.F.F.L.; GUERRA, H.L.; BARRETO, S.M.; GUIMARÃES, R.M. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo da mortilidade e das internações hospitalares públicas. **Informe epidemiológico do SUS**, Brazil, v. 9, n. 1, p. 23-41, 2000.

COUTANT, D.E.; KULANTHAIVEL, P.; TURNER, P.K.; BELL, R.L.; BALDWIN, J.; WIJAYAWARDANA, S.R.; PITOU, C.; HALL, S.D. Understanding disease-drug interactions for dosing withi*n* the therapeutic. **Cli*n* Pharmacol Ther**, USA, v. 98, n. 1, p. 76-86, 2015.

CUTRULLIS, R.A.; POKLÉPOVICH, T.J.; POSTAN, M.; FREILIJ, H.L.; PETRAY, PB. Immunomodulatory and anti-fibrotic effects of ganglioside therapy o*n* the cardiac chronic form of experimental Trypanosoma cruzi infection. **Int Immunopharmacol**, Argentina, v. 11, n. 8, p. 1024-31, 2011.

CUTRULLIS, R.A.; PETRAY, P.B.; SCHAPACHNIK, E.; SÁNCHEZ, R.; POSTAN, M.; GONZÁLEZ, M.N.; MARTIN, V.; CORRAL, R.S. Elevated serum levels of macrophage migratio*n* inhibitory factor are associated with progressive chronic cardiomyopathy i*n* patients with Chagas disease. **Plos one**, Argentina, v. 8, n. 2, p. e57181, 2013.

DENEER, V.H.M.; VA*N* HEMEL, N.M. Is Antiarrhythmic Treatment i*n* the Elderly Different? **Drugs Aging**, Netherlands, v. 28, n. 8, p. 617-633, 2011.

DOWD, P. A.; PARDO-IGUZQUIZA, E.; EGOZCUE, J. J. The total bootstra*p* median: a robust and efficient estimator of locatio*n* and scale for small samples. **J Appl Stat**, Spain, v. 42, n. 6, p. 1306-1321, 2015.

DUFFULL, S. B. et al. Analysis of populatio*n* pharmacokinetic data using NONMEM and WinBUGS. **J Biopharm Stat**, UK, v. 15, n. 1, p. 53-73, 2005.

DUPONT, W.D.; PLUMMER, W.D. PS power and sample size program available for free o*n* the Internet. **Controlled Clin. Trials**, USA, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.

EVANGELISTA, S.; GARBIN, U.; FRATTA-PASINI, A.; STRANIERI, C.; BOCCIOLETTI, V.; COMINACINI, L. Effect of dl-nebivolol, its enantiomers and metabolites o*n* the intracellular productio*n* of superoxide and nitric oxide i*n* huma*n* endothelial cells. **Pharmacol Res***,* Italy*,* v. 55, n. 4, p. 303–309, 2007.

FONGEMIE, J.; FELIX-GETZIK, E. A review of nebivolol pharmacology and clinical evidence. **Drugs**, USA, v. 75, n. 12, p. 1349-1371, 2015.

FUX, R.; MÖRIKE, K.; PRÖHMER, A.M.; DELABAR, U.; SCHWAB, M.; SCHAEFFELER, E.; LORENZ, G.; GLEITER, C.H.; EICHELBAUM, M.; KIVISTÖ, K.T. Impact of CYP2D6 genotype o*n* adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. **Cli*n* Pharmacol Ther**, Germany, v. 78, n. 4, p. 378-87, 2005.

FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluatio*n* of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. **Eur J Cli*n* Pharmacol**, Germany, v. 63, n. 4, p. 321-33, 2007.

GARCIA, M.N.; WOC-COLBURN, L.; AGUILAR, D.; HOTEZ, P.J.; MURRAY, K.O. Historical perspective o*n* the epidemiology of huma*n* Chagas disease i*n* Texas and recommendations for enhanced understanding of clinical Chagas disease i*n* the souther*n* united states. **Plos Negl Tro*p* Dis,** USA, v. 9, n. 11, p. e0003981, 2015.

HENDRICK, J.; BOCKX, M.; ZWIJSEN, C.; BORGMANS, C.; MANNENS, G.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. Location of the hydroxyl functions in hydroxylated metabolites of nebivolol in different animal species and human subjects as determined by on-line high-performance liquid chromatography-diode-array detection. **J Chromatogr A**, Belgium, v. 729, n. 1-2, p. 341-354, 1996.

HIMMELMANN, A.; HENDER, T.; SNOECK, E.; LUNDGREN, B.; HEDNER, J. Haemodynamic effect and pharmacokinetics of oral *d*- and *l*- nebivolol in hypertensive patients. **Eur J Clin Pharmacol**, Germany, v. 51, n. 3-4, p. 259-264, 1996.

HORAI, Y.; JUNKO, T,; ISHIZAKI, T.; ISHIKAWA, K. Correlations among the metabolic ratios of three test probes (metoprolol, debrisoquine and sparteine) for genetically determined oxidation polymorphism in a Japanese population. **Br J Clin Pharmacol**, Japan, v. 29, n. 1, p. 111-115, 1990.

HOWARD, E.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUEKENS, P. Frequency of the congenital transmission of Trypanosoma cruzi: a systematic review and meta-ANALYSIS. **BJOG**, USA, v. 121, n. 1, p. 22-33, 2013.

ISBISTER, G.K.; BIES, R. Pharmacometrics: so much mathematics and why planes achieve their destinations with almost perfect results…. **Br J Clin Pharmacol**, Australia, v. 79, n. 1, p. 1-3, 2015.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; RODRIGUEZ-ANTONA, C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safe and more effective drug therapy. **Philos Trans R Soc B Biol Sci**, Sweden, v. 360, n. 1460, p. 1563-1570, 2005.

ISSA, V.S.; AMARAL, A.F.; CRUZ, F.D.; SILVA, M.A.; FERREIRA, M.D.; GUIMARÃES, G.V.; CHIZZOLA, P.R.; SOUZA, G.E.C.; BACAL, F.; BOCCHI, E.A. β- blocker therapy and mortality of patients with chagas cardiomyopathy: A subanalysis of the REMADHE prospective trial. **Circ Heart Fail**, Brazil, v. 3, p. 82-88, 2010.

JOERGER, M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. **AAPS J**, Switzerland, v. 14, n. 1, p. 119-32, 2012.

JONSSON, E.N.; MAGNUSSOM, M.O.; CHEN, C.L.; CARROTHERS, T.; GHAHRAMANI, P. A population PK analysis of Nebivolol and Valsartan in combination therapy. Poster. In: **Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe,** Spain, p. 23, 2014.

KALIL-FILHO, R. Globalizatio*n* of Chagas disease Burde*n* and new treatment perspectives. **J Am Coll Cardiol**, Brazil, v. 66, *n* .10, p. 1190-1192, 2015.

KAMALI, F.; HOWES, A.; THOMAS, S.H.L.;FORD, G.A.; SNOECK, E. A Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactio*n* study betwee*n* nebivolol and the H2- receptor and ranitidine. **Br J Cli*n* Pharmacol**, UK, v. 43, n. 2, p. 201-204, 1997.

KAYE, A.D.; BALUCH, A.; SCOTT, J.T. Pai*n* management i*n* the Elderly population: A review. **Ochsner J**, USA, v. 10, n. 3, p. 179-187, 2010.

KEATING, S.M.; DENG, X.; FERNARDES, F.; CUNHA-NETO, E.; RIBEIRO, A.L.; ADESINA, B.; BEYER, A.I.; CONTESTABLE, P.; CUSTER, B.; BUSH, M.P.; SABINO, E.C.; NHLBL RETROVÍRUS EPIDEMIOLOGY DONOR STUDY-II (REDS-II), INTERNATIONAL COMPONENT. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed i*n* clinical stages of Chagas disease**. Int J Cardiol**, Brazil, v. 199, p. 451-459, 2015.

KIM, D.K.; OH, S.Y.; KWON, H.C.; LEE, S.; KWON, K.A.; KIM, B.G.; KIM, S.G.; KIM, S.H.; JANG, J.S.; KIM, M.C.; KIM, K.H.; HAN, J.Y.; KIM, H.J. Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reative protei*n* level i*n* operable gastric cancer. **BMC Cancer**, Korea, v. 9, n. 155, p.1-9, 2009.

LE LOUP, G.; PIALOUX, G.; LESCURE, F.X. Update i*n* treatment of Chagas disease. **Curr Opi*n* Infect Dis**, France, v. 24, n. 5, p. 428-34, 2011.

LÉVESQUE, E.; BEAULIEU, M.; GUILLEMETTE, C.; BÉLANGER, A. Effect of interleukins o*n* UGT2B15 and UGT2B17 steroid uridine diphosphate-glucuronosyltransferase expressio*n* and activity i*n* the LNCa*p* cell line. **Endocrinol**, Canada, v. 139, n. 5, p. 2375-2381, 1998.

LINDAMOOD, C.; ORTIZ, S.; SHAW, A.; RACKLET, R.; GORSKI, C. Effects of commonly administered agents and genetics o*n* nebivolol pharmacokinetics drug-drug interactio*n* studies. **J Cli*n* Pharmaco**l, USA, v. 51, n. 4, p. 575-585, 2011.

LINDBOM, L.; RIBBING, J.; JONSSON, E. N. Perls-speaks-NONMEM (PsN) - a Perl module for NONMEM related programming. **Comput Methods Programs Biomed**, Sweden, v. 75, n. 2, p. 85-94, 2004.

LONSDALE, D.O.; BAKER, E.H. Understanding and managing medicatio*n* i*n* elderly people. **Best Pract Res Cli*n* Obstet Gynaecol**, UK, v. 27, n. 5, p. 767-788, 2013.

LU,H. Stereoselectivity i*n* drug metabolism. **Expert Opi*n* Drug Metab Toxicol,** USA, v. 3, n. 2, p. 149-158, 2007.

LUO, X.; LEI, Y.; HE, L.; LIU, W.; LI, M.; RAN, L.; YU, M.; GUO, X.; YU, P.; LIU, Z.; CHENG, Z. No influence of CYP2D6*10 genotype and phenotype o*n* the pharmacokinetics of nebivolol i*n* healthy Chinese subjects. **J Cli*n* Pharm Ther**, China, i*n* press, Jul 27, 2015.

MACHARAVAM, K.K.; ALMOND, L.M.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; GARDNER, I.; JAMEI, M.; TAY, S.; WONG, S.; JOSHI, A.; KENNY, J.R. A physiologically based pharmacokinetic modeling approach to predict disease-drug interactions: suppressio*n* of CYP3A by IL-6. **Cli*n* Pharmacol Ther**, USA, v. 94, n. 2, p. 260-268, 2013.

MANGRELLA, M.; ROSSE, F.; FICI, F.; ROSSI, F. Pharmacology of nebivolol. **Pharmacol res,** Italy, v. 38, n. 6, p. 419-431, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop,** Brazil, v. 38, p. 7-29, 2005. Supplement 3.

MORGAN, E.T. Impact of infectious and inflammatory disease o*n* cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. **Cli*n* Pharmacol Ther**, USA, v. 85, n. 4, p. 434-438, 2009.

MÜNZEL, T.; GORI, T. Nebivolol: the somewhat – different beta- adrenergic receptor blocker. **J Am Coll Cardiol,** Germany, v. 54, n. 16, p. 1491-1499, 2009.

NANDANIA, J.; RAIPUT, S.J.; CONTRACTOR, P.; VASAVA, P.; SOLANKI, B.; VOHRA, M. Quantitative determinatio*n* of nebivolol from huma*n* plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, India, v. 1, n. 923-924, p. 110-119, 2013.

NEVES, D.V. Influência da doença renal crônica e da hemodiálise na farmacodinâmica e farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos. 2013. 114p. Tese Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NEVES, D.V; LANCHOTE, V.L; DE SOUZA, L; HAYASHIDA, M; NOGUEIRA, M.S; DE MORAES, N.V; CESARINO, E.J. Metoprolol oxidatio*n* polymorphism i*n* Brazilia*n* elderly cardiac patients. **J Pharm Pharmacol**, Brazil, v. 65, n. 9, p. 1347-1353, 2013.

NEVES, D.V; VIEIRA, C.P; COELHO, E.B; MARQUES, M.P; LANCHOTE, V.L. Stereoselective analysis of nebivolol enantiomers i*n* huma*n* plasma by High-Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry: Applicatio*n* to Pharmacokinetics. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, Brazil, v. 1, n. 940, p. 47-52, 2013.

NUETEN, L.V.; CREE, J.D. Nebivolol: Compariso*n* of the Effects of dl-nebivolol, d-nebivolol, l-nebivolol. Atenolol, and Placebo o*n* Exercise- Induced increases i*n* Heart Rate and Systolic Blood Pressure. **Cardiovasc Drugs Ther**, Boston, v. 12, n. 4, p. 339-344, 1998.

OLIVEIRA, G.M.; YOSHIDA, N.; HIGA, E.M.S.; SHENKMAN, S.; ALVES, M.; STAQUICINI, D.; CASCABULHO, C.; SCHOR, N. Inductio*n* of proinflammatory cytokines and nitric oxide by Trypanosoma cruzi i*n* renal cells. **Parasitol Res**, Brazil, v. 109, n. 2, p. 483-91, 2011.

PANARO, M.A.; CAVALHO, P.; ACQUAFREDDA, A.; CIANCIULLI, A.; CAIVELLO, R.; MITOLLO, V. Expressio*n* of UDP-glucuronosyltransferase 1A6 isoform i*n* CacoO2 cells stimulated with lipopolysaccharide. **Innate Immun**, Italy, v. 16, n. 5, p. 302-309, 2010.

PARKE, J.; HOLFORD, N. H. G.; CHARLES, B. G. A procedure for generating bootstra*p* samples for the validatio*n* of nonlinear mixed-effects populatio*n* models. **Comput Methods Programs Biomed**, Australia, v. 59, n. 1, p. 19-29, 1999.

PAUWELS, P.J; VA*N* GOMPEL ,P; LEYSEN, J,E. Huma*n* beta-1 and beta-2 adrenergic receptor binding and mediated accumulatio*n* of cAM*P* i*n* transfected Chinese hamster ovary cells. Profile of nebivolol and know beta- adrenergic blockers. **Biochem Pharmacol**, Belgium, v. 42, n. 9, p. 1683-1689, 1991

PEREIRA NUNES, M.C.; DONNES, W.; MORILLO, C.; ENCINA, J.J.; RIBEIRO, A.L. Chagas Disease: a*n* Overview of Clinical a*n* Epidemiological Aspects. **J Am Coll Cardiol**, Brazil, Aug 27, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.

PISSETTI, C.W.; CORREIA, D.; OLIVEIRA, R.F.; LLAGUNO, M.M.; BALARIN, M.A.S.; SILVA-GRECCO, R.L.; RODRIGUES JR, V. Genetic and functional role of TNF-alpha i*n* the development Trypanosoma cruzi infection. **Plos Negl Tro*p* Dis**, Brazil, v. 5, n. 3, p. e976, 2011.

PY, M.O. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. **Curr Neurol Neurosci Rep**, Brazil, v. 6, n. 11, p. 536-42, 2011.

RAMAKRISHNA, N.V.S.; VISHWOTTAM, K.N.; KOTESHWARA, M.; MANOJ, S.; SANTOSH, M.; VARMA, D.P. Rapid quantificatio*n* of nebivolol i*n* huma*n* plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionizatio*n* tandem mass spectrometry. **J.Pharm Biomed Anal**, Pakistan, v. 39, n. 5, p. 1006-1013, 2005.

RASSI, A.JR.; RASSI A.; MARIAN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, Brasil, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RIBEIRO, A.L.P.; MARCOLINO, M.S.; PRINEAS, R.J.; LIMA-COSTA, M.F. Electrocardiographic Abnormalities i*n* Elderly Chagas Disease Patients: 10-Year Follow-U*p* of the Bambuí Cohort Study of Aging. **J Am Heart Assoc**, Brazil, v. 3, n. 1, p. e000632, 2014.

RIBBING, J.; JONSSON, E.N. Power, selectio*n* bias and predictive performance of the populatio*n* pharmacokinetic covariate model. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**, Sweden, v. 31, n. 2, p. 109-134, 2004.

RIVORY, L.P.; SLAVIERO, K.A.; CLARKE, S.J. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced i*n* cancer patients who have a*n* acute-phase response. **Br J Cancer**, Australia, v. 87, n. 3, p. 277-280, 2002.

SALVADOR, F.; MEGO, M.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; MORÍS, M.; RAMÍREZ, K.; ACCARINO, A.; MALAGELADA, J.R.; AZPIROZ, F.; MOLINA, I. Assessment of rectocolonic morphology and functio*n* i*n* patients with Chagas disease i*n* Barcelona (Spain). **Am J Tro*p* Med Hyg**, Spain, v. 92, n. 5, p. 898-902, 2015.

SANAEE, F.; JAMALI, F. Action and disposition of the β3-agonist nebivolol in the presence of inflammation; an alternative to conventional β1- blockers. **Curr Pharm Des**, Canada, v. 20, n. 9, p. 1311-1317, 2014.

SELVAN, P.S; VEERAN GODWDA, K; MANDAL,U; SAM SOLOMON, W.D; PAL, T.K. Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **J Cromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci**, India, v. 858, n. 1-2, p. 143-150, 2007.

SHEINER, L. B.; ROSENBERG, B.; MARATHE, V. V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. **J Pharmacokinet Biopharm**, USA**,** v. 5, n. 5, p. 445-479, 1977.

SOUSA, G.R.; GOMES, J.A.; FARES, R.C.; DAMÁSIO, M.P.; CHAVES, A.T.; FERREIRA, K.S.; NUNES, M.C.; MEDEIROS, N.I.; VALENTE, V.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M.O. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **Plos one**, Brazil, v. 9, n. 3, p. e87082, 2014.

SOUZA, J.D.; RIBEIRO, A.Q.; MARTINHO, K.O.; FRANCO, S.F.; MARTINS, M.V.; RODRIGUES, M.G.; WICK, J.Y.; LUIZ, A.; TINÔCO, A. Lipid profile and associated factors among elderly people, attended at the family healthy strategy, Viçosa/MG. **Nutr Hosp**, Brazil, v. 32, n. 2, p. 771-778, 2015.

STRASSER, S.L.; MASHFORD, M.L.; DESMOND, P.V. Regulation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase during the acute phase response. **J.Gastroenterol & Hepatol**, Australia, v. 13, p. 88-94, 1998.

VAN PEER, A.; SNOECK, E.; WOESTENBORGHS, R.; VAN DE VELDE, V.; MANNENS, G.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. Clinical pharmacokinetics on nebivolol. A. review. **Drug Invest,** Belgium, v. 3, p. 25-30, 1991. Supplement 1.

VIEIRA, C.P. Farmacocinética e PK-PD dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6. 2011. 83 p. Dissertação Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

WÄHLBY, U.; JONSSON, E.N.; KARLSSON, M.O. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetics-pharmacodynamic analysis. **AAPS PharmSci**, Sweden, v. 4, n. 4, p. E27, 2002.

ANEXOS

Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Of. CEP/FCFRP nº. 040/2012
kms

Ribeirão Preto, 23 de maio de 2012.

À pós-graduanda
CAROLINA PINTO VIEIRA
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Lanchote
DACTB/FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 102ª Sessão Extraordinária, realizada em 23/05/2012, a emenda do projeto de pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NA FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DOS ISÔMEROS DO NEBIVOLOL E SEUS METABÓLITOS EM PACIENTES IDOSOS METABOLIZADORES RÁPIDOS PARA O CYP2D6", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 244,**

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 – Fax: (16) 3602-4892

Anexo 2

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre – RIBEIRÃO PRETO – SP

PESQUISA CIENTÍFICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO PACIENTE / IDADE:..... /.....

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO.....

NOME DA PESQUISA: *Influência da doença de Chagas na farmacocinética – farmacodinâmica dos isômeros do nebivolol em pacientes idosos metabolizadores rápidos para o CYP2D6.*

MÉDICO RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Evandro José Cesarino (CRM: 46988)

RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TCLE: Carolina Pinto Vieira (Doutoranda FCFRP-USP)

TELEFONE PARA CONTATO: (16) 36353706 ou (16) 36024195

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em ...../...../..... concordei voluntariamente em participar, como paciente do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes pelo médico responsável que:

1- "O estudo procura entender se a doença causada pelo *Trypanosoma cruzi* (Barbeiro, Chupança, Chupão, Percevejo Preto), chamada de doença de Chagas, modifica o efeito de um remédio utilizado no tratamento dos sintomas no coração ocasionados pela doença. Alguns remédios têm o efeito alterado pela própria doença, podendo aumentar ou mesmo ter o seu efeito diminuído. A doença de Chagas afeta principalmente o sistema cardíaco e gastrointestinal, apesar do Sr/Sra poder não apresentar essas manifestações no momento, para a realização deste estudo, serão necessárias 11 pessoas com e 11 sem a doença de Chagas. Assim, todas as pessoas que irão participar desta pesquisa serão submetidas a um exame de saúde feito inicialmente para que possa confirmar a presença da doença. Se você estiver utilizando algum remédio que tenha ação sobre os batimentos cardíacos, deverá ser retirado por uma semana para não ter mais efeito no seu organismo.

Após isso você receberá um remédio chamado nebivolol, utilizado para o controle da pressão arterial. Pode acontecer de você sentir dor de câimbra, fraqueza e tonturas. Este estudo terá duas etapas, uma em que você terá que vir até o Hospital Santa Lydia em jejum de 8 horas, e irá receber dois comprimidos de 5 mg numa única vez de um remédio utilizado para controlar a pressão arterial, juntamente com um copo de água. Serão colhidas amostras de 5 mL de sangue (cerca de uma colher de sopa) da veia do seu braço várias vezes (cerca de 15 vezes). Um tubinho de plástico será colocado dentro da sua veia, assim você será picado somente uma única vez. Por se tratar de apenas uma dose do remédio espera-se que você não apresente nenhum efeito colateral do remédio. Caso ocorrer, algum efeito colateral do remédio, você será tratado aqui mesmo no hospital e iremos retirar a sua participação da pesquisa. Após o término das coletas de sangue, haverá a segunda etapa, em que você receberá em sua casa um comprimido chamado metoprolol (100 mg) que será fornecido pelo próprio pesquisador que será utilizado para avaliar como o seu fígado funciona durante 8 horas após a administração deste remédio sendo coletada toda sua urina neste período e esta será recolhida pelo pesquisador principal. Assim, se você quiser participar da pesquisa, terá que vir pelo menos 1 vez ao Hospital para tomar o remédio. Quando você vier tomar o remédio, você terá que ficar internado no Hospital por 48 horas para as coletas de sangue. Além de coletar o seu sangue, será medida durante o tempo em que você ficar no Hospital a sua pressão arterial e os seus batimentos cardíacos serão registrados através dos eletrocardiogramas a serem realizados junto com as coletas de sangue.

2-A sua colaboração será importante para entendermos como ajustar a dose desses medicamentos para o controle do ritmo cardíaco. Isto poderá ajudar na escolha do melhor tratamento e no ajuste da dose dos remédios para pessoas que tem a doença de Chagas.

3- A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para você. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a alertar sobre o fato e suspender, de imediato, a sua participação como voluntário.

4- Os pesquisadores garantem que responderão a qualquer pergunta ou farão esclarecimentos sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e com o tratamento que você será submetido.

5- Os pesquisadores se comprometem a proporcionar a você informações atualizadas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a sua vontade de continuar participando da pesquisa.

6- Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa apenas para a comunidade médica e científica pertinente.

7- A pesquisa será realizada com recursos oriundos de reserva técnica de projetos de pesquisa da Profa Dra Vera Lucia Lanchote.

8- Caso houverem gastos ou necessidades de indenização por problemas decorrentes da pesquisa, estes serão ressarcidos pelos recursos destinados a mesma.

Ribeirão Preto, ... de.....de.....

Assinatura do paciente ou de seu responsável	Responsável pela obtenção do TCLE.

Telefones para contato: (16) 36024195 – Carolina Pinto Vieira

(16) 36353706 – Dr Evandro José Cesarino

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1-..... .....
Assinatura identificação

2-..... .....
Assinatura identificação

Apêndices

APÊNDICE A – Parâmetros bioquímicos

Tabela I: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos dos pacientes do **Grupo controle** investigados

Pacientes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
ALT até 41U/L	19	19	14	19	18	34	23	6	26	33	13,2
AST até 38U/L	22	22	21	18	18	26	26	18	22	29	14
Gama GT 11-50 U/L	34	20	25	22	37	34	59	31	24	19	23
Bilirrubina Direta até 0,4 mg/dL	0,17	0,09	0,39	0,10	0,14	0,13	0,12	0,12	0,39	0,11	0,16
Total até 1,2 mg/dL	9,53	0,59	0,71	0,47	0,39	0,48	0,5	0,85	1,29	0,52	0,85
Proteína C reativa ultra-sensível até 3 mg/L	7,98	1,02	11,7	4,15	1,1	3,73	6,7	1,15	0,31	1,02	5,78
Uréia 10-50mg/dL	17	28	31	60	59	44	28	32	35	53	29
Creatinina plasmática 0,7-1,5 mg/dL	0,7	0,9	0,9	1,5	1,0	1,3	0,7	0,9	1,2	1,3	0,84
Colesterol Total < 200mg/dL	219	197	166	151	153	193	157	178	167	224	162
Triglicerides 80-150mg/dL	98	136	66	110	152	99	87	132	213	151	87
HDL > 35 mg/dL	67	42	47	29	45	35	57	37	40	47	58
LDL < 130 mg/dL	132	127	106	100	78	138	82	114	85	147	86
Hemoglobina Glicada 4,1-6,5%	6,3	6,3	6,7	5,5	5,2	4,9	4,2	5,8	5,4	5,5	5,5
Glicemia 70 – 99 mg/dL	90	84	104	99	37	90	89	90	94	105	84
Fosfatase alcalina 65- 300U/L	172	259	235	115	250	157	161	115	238	170	138
Microalbuminúria até 30 mg/dL	7,7	12,8	4,1	10,5	6,6	0,2	12	3,46	4,8	7,4	9,2
K+ 3,5 – 5 mEq/L	4,1	4,5	4,0	4,2	3,9	4,3	3,9	4,7	4,8	4,4	4,1
Na+ 135 – 150 mEq/L	142	140	140	142	141	142	141	141	139	139	136
Fração de ejeção no Ecocardiograma > 0,58	0,66	0,65	0,70	0,74	0,66	0,72	0,69	0,72	0,43	0,66	0,72
Trypanossoma Cruzi, Anticorpos (Imunoensaio enzimático)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela II: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos dos pacientes do **Grupo doença de Chagas** investigados

Pacientes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
ALT até 41U/L	14	24	34	9	11	2	23	11	24	29	15
AST até 38U/L	5	21	30	17	14	20	21	15	18	23	16
Gama GT 11-50 U/L	30	25	25	28	19	21	35	41	21	26	16
Bilirrubina Direta até 0,4 mg/dL	0,24	0,19	0,14	0,23	0,18	0,10	0,18	0,16	0,15	0,14	0,11
Total até 1,2 mg/dL	0,55	0,46	0,32	0,38	0,65	0,34	0,62	0,65	0,98	0,73	0,82
Proteína C reativa ultra-sensível até 3 mg/L	0,3	0,81	1,2	0,5	1,28	2,24	4,01	1,54	1,50	1,20	4,01
Uréia 10-50mg/dL	52	67	35	15	54	30	41	34	27	37	27
Creatinina plasmática 0,7-1,5 mg/dL	1,4	1,1	0,6	0,9	0,7	0,8	1,04	0,77	0,78	1,36	1,1
Colesterol Total < 200mg/dL	223	189	152	150	156	240	190	179	217	220	169
Triglicerides 80-150mg/dL	128	83	185	89	132	90	129	135	105	166	47
HDL > 35 mg/dL	34	44	30	69	36	79	47	51	54	49	46
LDL < 130 mg/dL	164	129	85	109	93	143	118	101	142	138	11
Hemoglobina Glicada 4,1-6,5%	5,9	5,7	6,6	6,5	5,8	5,4	6	5,1	6,1	6,3	5,1
Glicemia 70 – 99 mg/dL	105	97	114	87	89	90	106	93	88	99	76
Fosfatase alcalina 65- 300U/L	237	162	179	241	197	216	151	190	181	102	197
Microalbuminúria até 30 mg/L	5,8	11	15	5,2	13,5	8,1	8,8	6,03	2,50	6,22	2
K+ 3,5 – 5 mEq/L	4,5	4,5	4,7	4,0	4,3	3,8	4,4	3,6	4,8	4,5	4,3
Na+ 135 – 150 mEq/L	140	134	135	143	139	137	137	139	139	147	135
Fração de ejeção no Ecocardiograma > 0,58	0,74	0,69	0,81	0,62	0,65	0,75	0,45	0,64	0,64	0,65	0,75
Trypanossoma Cruzi, Anticorpos (Imunoensaio enzimático)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

APÊNDICE B– Valores individuais dos laudos do eletrocardiograma e ecocardiograma

Tabela III: Dados individuais dos pacientes idosos hipertensos portadores da forma crônica da doença de Chagas (*n* = 11)

PACIENTE	ELETROCARDIOGRAMA	ECOCARDIOGRAMA	Forma da doença de Chagas
1	Defeito da condução ramo esquerdo e ramo direito; Desvio moderado do eixo para esquerda	---	Cardíaca
2	Repolarização precoce do segmento ST	Valva aórtica com folhetos um pouco espessados e com ligeira calcificação, apresentando estenose discreta;	Indeterminada
3	---	Ventrículo esquerdo com hipertrofia excêntrica; IAo e IM discretas	Indeterminada
4	Bradicardia	---	Indeterminada
5	Bradicardia; Desvio moderado do eixo para esquerda; Anormalidade em onda T	Dilatação discreta do AE; VE com dilatação discreta, hipertrofia excêntrica, apresentando função contrátil normal	Indeterminada
6	Repolarização precoce do segmento ST em parede lateral	Dilatação discreta do átrio esquerdo; IM e IT discretas; IAo mínima	Indeterminada
7	Bradicardia; Desvio moderado do eixo para a esquerda; Repolarização precoce do segmento ST em parede lateral	Dilatação discreta do átrio esquerdo; IM e IT discretas; IAo mínima	Indeterminada
8	Anormalidade em onda T em parede lateral; Desvio anormal do eixo para a esquerda	VE com hipertrofia excêntrica, apresentando alteração da mobilidade segmentar, com função contrátil deprimida em grau discreto; IM e IT discretas	Cardíaca
9	Anormalidade em onda T em parede inferior lateral; Desvio anormal do eixo para a esquerda	Sinais indiretos de disfunção diastólica leve (tipo relaxamento); Insuficiência aórtica discreta; Dilatação leve de aorta ascendente e de raiz da aorta	Indeterminada
10	Repolarização precoce do segmento ST em parede lateral	Dilatação discreta do átrio esquerdo; IM e IT discretas; IAo mínima	Indeterminada
11	Defeito da condução ramo direito; Possível alargamento AE; Desvio moderado do eixo para esquerda	---	Cardíaca

AE: átrio esquerdo; VE: ventrículo esquerdo; IAo: insuficiência aórtica; IM: insuficiência mitral; IT: insuficiência tricúspide

Tabela IV: Dados individuais dos pacientes idosos hipertensos não portadores da forma crônica da doença de Chagas (*n* = 11)

PACIENTE	ELETROCARDIOGRAMA	ECOCARDIOGRAMA
1	Bradicardia	IM e IT discretas
2	Bradicardia; Repolarização precoce presente em parede lateral alta; Possível alargamento AE	Dilatação discreta do AE; Dilatação discreta da raiz da aorta; IT discreta
3	Desvio moderado do eixo para esquerda	Dilatação discreta do AE; VE com dilatação discreta, hipertrofia excêntrica, apresentando função contrátil normal; IAo discreta e IM mínima
4	Bradicardia; Extra sístoles supraventriculares; Possível alargamento AE	Dilatação discreta do AE; VE com dilatação discreta, hipertrofia excêntrica, apresentando função contrátil normal; Dilatação discreta da raiz da aorta
5	Extra sístoles supraventriculares; Possível alargamento AE; Desvio anormal do eixo para esquerda	DLM discreta a moderada; IAo discreta; IT mínima; Dilatação acentuada do AE; VE com dilatação discreta, hipertrofia excêntrica, apresentando função contrátil normal
6	Onda T achatada em V3 e AVF; Desvio normal do eixo para esquerda	VE com disfunção diastólica discreta; Dilatação discreta da raiz da aorta; IAo, IM e IT discretas
7	Anormalidade de onda T, presente em parede inferior lateral; Desvio moderado do eixo para esquerda	VE com hipertrofia excêntrica, funções sistólica e diastólica normais; IAo, IM e IT discretas
8	Bradicardia; Possível alargamento AE; Desvio moderado do eixo para esquerda	---
9	Defeito de condução ramo direito; IAM inferior; HVD; Desvio moderado do eixo para a esquerda	Dilatação discreta do AE; VE com remodelamento concêntrico, apresentando alteração da mobilidade segmentar, com função contrátil deprimida em grau discreto; IM discreta
10	Defeito de condução ramo esquerdo e direito; Onda T invertida em V3 e AVF; Desvio anormal do eixo para a esquerda	---
11	Extra sístoles supraventriculares; Possível alargamento AE	DLM discreta a moderada; IAo discreta; IT mínima

AE: átrio esquerdo; VE: ventrículo esquerdo; IAo: insuficiência aórtica; IM: insuficiência mitral; IT: insuficiência tricúspide; DLM: dupla lesão mitral

APÊNDICE C– Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos

Tabela V: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *l*-nebivolol. Dados individuais

Pacientes	DC	AUC (ng.h/mL)	Cmax (ng/mL)	t_{max} (h)	Cl/F (L/h)	t ½ (h)	Vd/F (L)	α (h^{-1})	β (h^{-1})
1	1	7,63	0,87	1,04	655,42	16,56	9784,41	1,06	0,04
2	1	13,19	3,81	0,50	379,06	9,88	2453,15	0,96	0,07
3	1	10,77	3,10	1,02	464,18	9,85	3103,32	1,22	0,07
4	1	12,70	3,60	0,41	393,81	17,92	6008,01	1,17	0,04
5	1	8,64	2,18	0,89	578,68	11,10	4676,77	1,03	0,06
6	1	6,15	1,81	0,66	812,62	11,19	5908,71	1,29	0,06
7	1	7,63	2,20	2,02	655,46	10,96	5683,72	1,93	0,06
8	1	11,29	3,28	0,85	442,94	12,72	4405,89	1,12	0,05
9	1	13,26	3,44	0,65	377,15	15,59	4459,90	0,84	0,04
10	1	8,59	1,85	1,11	581,84	21,83	5392,18	0,42	0,03
11	0	14,73	3,84	0,42	339,42	11,06	3351,22	4,95	0,06
12	0	10,09	2,00	0,93	495,36	15,29	6837,37	1,41	0,04
13	0	13,09	3,37	1,01	381,98	18,01	4851,42	0,91	0,04
14	0	10,17	2,15	0,77	491,82	14,59	4229,28	0,63	0,05
15	0	10,07	2,76	0,68	496,39	10,04	4250,87	1,77	0,07
16	0	11,76	1,82	1,01	425,08	19,18	7734,04	1,42	0,04
17	0	12,22	4,37	0,73	408,98	8,92	3409,78	2,65	0,08
18	0	7,31	1,55	0,69	683,61	14,52	8275,43	1,41	0,05
19	0	9,76	2,81	0,56	512,25	15,28	5699,19	1,22	0,44
20	0	6,36	1,22	2,07	786,15	15,62	5035,85	0,70	0,04
21	0	7,70	1,72	0,61	652,70	13,89	7095,06	0,83	0,04

Cmax: concentração plasmática máxima; Tmax: tempo para alcançar Cmax; $AUC^{0-\infty}$: área sob a curva de 0 a infinito; T1/2: meia-vida de eliminação; Vd/F: volume de distribuição aparente; CL/F: *clearance* aparente; α: Constante de distribuição; β: Constante de eliminação; DC=1: presença da doença de Chagas; DC=0: ausência da doença de Chagas.

Tabela VI: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *d*-nebivolol. Dados individuais

Pacientes	DC	AUC (ng.h/mL)	Cmax (ng/mL)	t_{max} (h)	Cl/F (L/h)	t ½ (h)	Vd/F (L)	α (h^{-1})	β (h^{-1})
1	1	5,10	0,52	1,01	979,10	24,47	12407,8	0,23	0,03
2	1	5,52	1,49	0,77	905,52	25,04	14337,46	0,66	0,03
3	1	6,68	1,56	1,12	748,85	9,92	4811,35	0,88	0,07
4	1	7,34	2,21	0,63	680,86	10,33	5624,06	1,16	0,07
5	1	4,09	0,86	0,81	1220,93	23,86	20431,77	0,85	0,03
6	1	7,64	1,94	0,74	654,00	11,26	5610,82	0,91	0,06
7	1	5,22	1,19	2,16	958,16	10,05	7507,73	1,50	0,07
8	1	7,06	0,74	1,69	707,97	11,28	5764,94	0,95	0,06
9	1	5,16	1,79	0,49	968,40	9,78	6027,34	1,19	0,07
10	1	10,48	2,27	0,74	476,88	8,09	3801,78	3,15	0,08
11	0	6,32	1,41	0,61	790,62	11,96	7671,72	1,22	0,06
12	0	5,23	1,06	0,85	955,71	14,68	11057,05	0,84	0,05
13	0	4,69	1,75	0,94	1066,87	13,03	7475,29	0,98	0,05
14	0	5,80	0,94	0,89	861,38	15,36	8403,89	0,54	0,04
15	0	6,30	1,33	0,64	793,23	10,20	6934,14	1,63	0,07
16	0	5,32	0,91	0,99	940,31	10,77	8167,44	1,03	0,06
17	0	8,43	1,90	0,89	593,32	11,68	3274,12	0,48	0,06
18	0	2,97	0,73	0,68	1683,83	13,47	17503,82	1,53	0,05
19	0	5,42	1,51	0,60	922,12	12,70	8676,49	1,32	0,05
20	0	3,94	1,26	1,87	1269,53	14,43	11681,24	0,94	0,05
21	0	5,54	1,33	0,77	902,27	11,37	8531,28	1,16	0,06

Cmax: concentração plasmática máxima; Tmax: tempo para alcançar Cmax; $AUC^{0-\infty}$: área sob a curva de 0 a infinito; T1/2: meia-vida de eliminação; Vd/F: volume de distribuição aparente; CL/F: *clearance* aparente; α: Constante de distribuição; β: Constante de eliminação; DC=1: presença da doença de Chagas; DC=0: ausência da doença de Chagas.

Tabela VII: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *l*-glicuronídeo nebivolol. Dados individuais

Pacientes	DC	AUC (ng.h/mL)	Cmax (ng/mL)	t_{max} (h)	t ½ (h)
1	1	44,9	4,52	2,33	13,18
2	1	74,63	8,59	1,68	9,30
3	1	78,48	12,05	1,65	6,63
4	1	62,76	10,38	1,09	11,37
5	1	82,58	11,79	1,58	5,31
6	1	80,53	10,51	1,36	9,52
7	1	71,25	10,47	2,81	8,98
8	1	79,48	13,56	1,38	7,87
9	1	59,94	10,89	0,56	9,52
10	1	53,45	6,35	1,83	11,66
11	0	73,95	14,20	1,05	7,78
12	0	61,00	8,83	1,54	7,37
13	0	106,37	12,20	1,68	9,82
14	0	62,25	6,68	1,60	11,31
15	0	65,30	7,81	1,58	6,43
16	0	51,19	4,57	1,45	9,84
17	0	46,90	7,29	1,73	8,81
18	0	72,87	13,31	1,33	13,14
19	0	80,06	7,55	1,58	10,29
20	0	107,95	10,35	3,26	9,69
21	0	59,16	7,22	1,70	10,43

Cmax: concentração plasmática máxima; Tmax: tempo para alcançar Cmax; $AUC^{0-\infty}$: área sob a curva de 0 a infinito; T1/2: meia-vida de eliminação; DC=1: presença da doença de Chagas; DC=0: ausência da doença de Chagas.

Tabela VIII: Parâmetros farmacocinéticos para o isômero *d*-glicuronídeo nebivolol. Dados individuais

Pacientes	DC	AUC (ng.h/mL)	Cmax (ng/mL)	t_{max} (h)	t ½ (h)
1	1	293,24	33,89	2,65	8,24
2	1	256,24	35,09	1,83	7,93
3	1	513,64	76,61	1,83	7,83
4	1	312,41	77,96	1,33	6,28
5	1	325,52	58,16	1,69	5,92
6	1	296,80	59,13	1,11	6,17
7	1	310,74	42,76	3,11	6,43
8	1	446,80	79,06	1,24	12,05
9	1	183,11	40,68	1,20	4,61
10	1	329,57	37,97	2,97	7,43
11	0	403,57	93,83	1,44	5,54
12	0	220,72	46,53	1,73	7,30
13	0	340,79	54,96	1,90	6,76
14	0	456,35	54,99	2,35	9,22
15	0	488,16	66,07	1,58	10,04
16	0	231,56	26,49	1,79	12,32
17	0	286,23	52,56	1,47	15,34
18	0	215,39	47,13	1,40	7,45
19	0	310,77	40,90	1,30	10,27
20	0	1040,81	105,33	3,13	13,10
21	0	335,23	55,49	1,73	7,52

Cmax: concentração plasmática máxima; Tmax: tempo para alcançar Cmax; $AUC^{0-\infty}$: área sob a curva de 0 a infinito; T1/2: meia-vida de eliminação; DC=1: presença da doença de Chagas; DC=0: ausência da doença de Chagas.