UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da
ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica

Carolina de Miranda Silva

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da
ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica

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 de Miranda Silva

Orientadora: Vera Lucia Lanchote

2010

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.

Miranda Silva, Carolina.

Influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica. Ribeirão Preto, 2010.
91p. : il.; 30cm.

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

Orientadora: Vera Lucia Lanchote.

1. Farmacocinética 2. Enantiômeros 3. Ciclofosfamida

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina de Miranda Silva

Influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica

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 de Miranda Silva

Orientadora: Vera Lucia Lanchote

Aprovada 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

A meus pais

João Carlos Silva e Claudete de Miranda Silva

A meus irmãos

Carlos Alexandre de Miranda Silva, Daniele de Miranda Silva e

Gabriel de Miranda Silva

À minha tia/mãe e “personal scientist” Lú – Lucienir Maria da Silva

Ao meu querido Daniel Kawano

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Vera Lucia Lanchote por sua orientação, paciência, incentivo e amizade;

A Daniel Kawano por ser meu companheiro de todas as horas;

À minha tia Lú, pelo apoio incondicional, por sua amizade e carinho;

Às minhas primas Natasha, Teodora, Ana e Vitória, por alegrarem o meu dia;

Às minhas amigas Marlene e Lourdes, pela companhia, atenção e carinho;

À meus pais e meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado mesmo morando estando tão distantes;

À minha família de Monte Alto, a saber: Maria Aparecida, Paulo, Rosemeire, Roberto, Paulo Roberto, Ana Cláudia e meus sobrinhos Beatriz, Guilherme, Rafaela e Gabriel, por apoio, compreensão e carinho;

Aos meus voluntários, que tornaram este trabalho possível;

À minhas amigas Maria Paula e Vanessa pelo carinho, apoio e amizade;

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Farmacocinética e Metabolismo, Vanessa, Daniel, Carolina, Estela, Adriana, Natalino, Natália, Natalícia, Ana Leonor, Juciane, Rodrigo, Francine e Eduardo pelo companheirismo e amizade;

Ao Dr. Hartmut Derendorf e a meus colegas da University of Florida, por ter me dado a oportunidade de realizar estágio no seu laboratório;

Aos funcionários do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por todo o auxílio na parte experimental;

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado;

À CAPES, pela concessão da bolsa PDEE para a realização de estágio no exterior;

A todos não citados aqui, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"One's mind, once stretched by a new idea, never regains its original dimensions."
(Oliver Wendell Holmes)

RESUMO

MIRANDA SILVA, C. **Influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica**. 91f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida (CPA) foi avaliada em pacientes portadores de nefrite lúpica distribuídos em dois grupos de acordo com o *clearance* da creatinina: Grupo 1 90,6-144,6mL/min/1,73² e Grupo 2 42,8-76,4mL/min/1,73². Os pacientes foram tratados com doses de 0,75 a 1,3g de ciclofosfamida racêmica sob forma de infusão com duração de 2h e com 1mg de midazolam (MDZ) administrado via endovenosa para a avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A. As concentrações plasmáticas dos enantiômeros da CPA e do MDZ foram avaliadas por LC-MS/MS. Os enantiômeros da CPA foram resolvidos na coluna Chiralcel OD-R, com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila e água (75:25, v/v) adicionada de 0,2% de ácido fórmico. Os enantiômeros da CPA foram extraídos do plasma com recuperações maiores que 95% e o limite de quantificação obtido foi de 2,5ng de cada enantiômero da CPA/mL plasma. As seguintes diferenças (teste de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) foram observadas nos parâmetros farmacocinéticos entre os enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA para os pacientes do Grupo 1: $AUC^{0-\infty}$ 152,41 vs 129,25 μ g.h/mL; Cl 3,28 vs 3,89L/h; Vd 31,38 vs 29,74L e $t_{1/2}$ 6,79 vs 5,56h e para os pacientes do Grupo 2: $AUC^{0-\infty}$ 167,20 vs 139,08 μ g.h/mL; Cl 2,99 vs 3,59L/h e $t_{1/2}$ 6,15 vs 4,99h. Não foi observada diferença (teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$) nos parâmetros farmacocinéticos de ambos os enantiômeros entre os grupos 1 e 2. Não foi observada correlação entre o *clearance* do MDZ (2,92-16,40mL/min.kg) e o *clearance* de cada enantiômero da CPA. Concluindo, a farmacocinética da CPA é enantiosseletiva em pacientes portadores de nefrite lúpica com acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-CPA e a farmacocinética de ambos os enantiômeros da CPA não é alterada pela agravamento da função renal.

Palavras-chave: ciclofosfamida; enantiômeros; nefrite lúpica, farmacocinética, midazolam.

ABSTRACT

MIRANDA SILVA, C. **Influence of glomerular filtration rate on the pharmacokinetics of cyclophosphamide enantiomers in patients with lupus nephritis.** 91f.Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The pharmacokinetics of cyclophosphamide (CYC) enantiomers was evaluated in patients with lupus nephritis distributed in two groups according to creatinine clearance; Group 1 - 90.6-144.6mL/min/1.73m² and Group 2 - 42.8-76.4mL/min/1.73m². All patients were treated with 0.75 to 1.3g of racemic CYC as a 2-hour infusion and with 1mg intravenous midazolam as a drug marker. CYC enantiomers and midazolam concentrations in plasma were measured by LC-MS/MS. CYC enantiomers were separated on a Chiralcel OD-R column, with the mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and water (75:25, v/v) plus 0.2% formic acid. Recovery rates were higher than 95% and the quantification limit was 2.5ng/ml plasma for both enantiomers. The coefficients of variation and the relative errors obtained for the validation of intra- and interassay precision and accuracy were less than 10%. The following differences in the pharmacokinetic parameters (Wilcoxon test, $p \leq 0.05$) were observed between the (S)-(-) and (R)-(+) enantiomers for Group 1 $AUC^{0-\infty}$ 152.41 vs 129.25 μ g.h/mL, Cl 3.28 vs 3.89L/h, Vd 31.38 vs 29.74L and $t_{1/2}$ 6.79 vs 5.56h and for Group 2 $AUC^{0-\infty}$ 167.20 vs 139.08 μ g.h/mL, Cl 2.99 vs 3.59 L/h and $t_{1/2}$ 6.15 vs 4.99 h. No differences (Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) were observed between Groups 1 and 2 in the pharmacokinetics parameters of both enantiomers. No significant relationship was observed between midazolam clearance (2.92-16.40 ml/min.kg) and clearance of each CYC enantiomer. In conclusion, CYC kinetic disposition is enantioselective resulting in higher exposure of (S)-(-)-CYC in lupus nephritis patients and the pharmacokinetic parameters of both enantiomers are not altered by the worsening of renal condition.

Keywords: cyclophosphamide; enantiomers; lupus nephritis; pharmacokinetics; midazolam.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da ciclofosfamida	04
Figura 2. Procedimento de extração dos enantiômeros da CPA em plasma	18
Figura 3. Íons da ciclofosfamida.	30
Figura 4. Cromatogramas da CPA em plasma	31
Figura 5. Concentrações plasmáticas médias ($\pm$ EPM) da (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA observadas para os pacientes do Grupo 1 (n=10) até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica	34
Figura 6. Concentrações plasmáticas médias ($\pm$ EPM) da (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA observadas para os pacientes do Grupo 2 (n=8) até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica.	35
Figura 7. Razões (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA observadas após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica nos pacientes pertencentes ao Grupo 1. Os dados estão representados como média e erro padrão da média (n=10).	36
Figura 8. Razões (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA observadas após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica nos pacientes pertencentes ao Grupo 2. Os dados estão representados como média e erro padrão da média (n=8).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios revisados do <i>ACR</i> 1997 de diagnóstico do LES.	14
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos referentes aos pacientes do Grupo 1	26
Tabela 3. Dados individuais dos pacientes incluídos no Grupo 1	27
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos referentes aos pacientes do Grupo 2	28
Tabela 5. Dados individuais dos pacientes incluídos no Grupo 2	29
Tabela 6. Limites de confiança para a análise enantiosseletiva da ciclofosfamida em plasma	32
Tabela 7. Testes de estabilidade (valores de p) da ciclofosfamida em plasma	33
Tabela 8. Efeito da matriz na análise dos enantiômeros da CPA em diferentes lotes de plasma	33
Tabela 9. Disposição cinética dos enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA nos pacientes portadores de nefrite lúpica, tratados com 750 a 1300mg de CPA racêmica, inseridos nos grupos 1 (n=10) e 2 (n=8)	37
Tabela 10. Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A utilizando o midazolam como fármaco marcador.	38
Tabela 11. Equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre os <i>clearances</i> da (S)-(-)-CPA e do MDZ e entre os <i>clearances</i> da (R)-(+)-CPA e do MDZ avaliados em 18 pacientes portadores de nefrite lúpica	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

↵ CYC – ciclofosfamida

↵ MDZ – midazolam

↵ LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas *in tandem*

↵ m/z – razão massa carga

↵ $AUC^{0-\infty}$ – área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo a partir do tempo 0 ao infinito

↵ CI – *clearance*

↵ Vd – volume de distribuição

↵ $t_{1/2}$ – meia-vida de eliminação

↵ k_{el} – constante de eliminação

↵ LES – lupus eritematoso sistêmico

↵ ALDH – aldeído desidrogenase

↵ CYP – citocromo P450

↵ 4-OH-CPA – 4-hidroxiciclofosfamida

↵ CARBOXICPA – carboxifosfamida

↵ ALDOCPA – aldofosfamida

↵ 4-CETOCPA – 4-cetociclofosfamida

↵ DESCLOROETILCPA – descloroetilciclofosfamida

↵ i.v. – intravenoso

↵ p.o. – *per oral*

↵ RNA – ácido ribonucleico

↵ LPS – lipopolissacarídeo

- ↪ OATP – transportador de ânions orgânicos
- ↪ Pgp – glicoproteína P
- ↪ DNA – ácido desoxirribonucléico
- ↪ ANTI-Sm – anticorpo anti SM
- ↪ ANTI-DNA – anticorpo anti-DNA dupla hélice
- ↪ IgG – imunoglobulina G
- ↪ IgM – imunoglobulina M
- ↪ IL- β – interleucina β
- ↪ IL-6 – interleucina 6
- ↪ IFN – interferon
- ↪ TNF- α – Fator de necrose tumoral α
- ↪ ANTI-IL-6 – anticorpo anti interleucina 6
- ↪ ACR – American College of Rheumatology
- ↪ MRM – *multiple reaction monitoring*
- ↪ PI – padrão interno
- ↪ CV – coeficiente de variação
- ↪ HPLC – *High performance liquid chromatography*
- ↪ IC – intervalo de confiança
- ↪ MS – *mass spectrometry*
- ↪ CG-MS – cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas
- ↪ UV – ultravioleta
- ↪ EPM – erro padrão da média
- ↪ rac – racêmica
- ↪ ESI – *electrospray*
- ↪ UI – unidade internacional

↵↵v/v – volume/volume

↵® – marca registrada

↵Σ – somatório

↵[MH]⁺ – íon molecular

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Protocolo Clínico	13
3.1.1. Critérios de inclusão	15
3.1.2. Critérios de exclusão	15
3.1.3. Aspectos éticos	15
3.2. Análise enantiosseletiva da ciclofosfamida em plasma	16
3.2.1. Reagentes e soluções padrão	16
3.2.2. Instrumentação	16
3.2.3. Preparação das amostras	17
3.2.4. Determinação da ordem de eluição	19
3.2.5. Estudo de racemização	19
3.2.6. Efeito da matriz	20
3.2.7. Validação do método	20
3.2.7.1. Linearidade	21
3.2.7.2. Recuperação	21
3.2.7.3. Precisão e exatidão intra e inter-ensaios	21
3.2.7.4. Limite de quantificação	22
3.2.7.5. Estabilidades de curta duração e pós-processamento	22
3.3. Análise do midazolam em plasma	22
3.4. Análise farmacocinética e estatística	23
3.4.1. Avaliação da disposição cinética enantiosseletiva da CPA	23
3.4.2. Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Protocolo clínico	26
4.2. Análise enantiosseletiva da ciclofosfamida em plasma	30
4.3. Análise farmacocinética e estatística	34
4.3.1. Avaliação da disposição cinética enantiosseletiva da ciclofosfamida	34
4.3.2. Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A	38
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	61
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

O Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica com maior prevalência em mulheres, acometendo, em média, 8,1-12 mulheres para cada homem. A prevalência do LES nos Estados Unidos da América e na Europa varia entre 1,9 e 31,9 casos/100.000 habitantes (BORCHERS et al., 2010). Os estudos no Brasil relatam taxa de incidência de 8,7/100.000/ano e prevalência de 98/100.000 habitantes de ambos os sexos (SENNÁ et al., 2004; VILAR; SATO, 2002).

Dentre as manifestações do LES, o comprometimento renal ocorre em 25 a 75% dos pacientes, sendo definido por proteinúria persistente acima de 500mg em 24h, presença de cilindros celulares no sedimento urinário e alterações histopatológicas (MAVRAGANI; MOUTSOPOULOS, 2003; BORCHERS et al., 2010). A nefrite lúpica é classificada de acordo com a análise histopatológica do tecido renal, com base nos critérios da Organização Mundial da Saúde, como: classe I normal, classe II glomerulonefrite mesangial, classe III glomerulonefrite proliferativa focal segmental, classe IV glomerulonefrite proliferativa difusa, classe V glomerulonefrite membranosa difusa e classe VI glomerulonefrite esclerosante avançada (CHURG; BERNSTEIN; GLASSOCK, 1995).

Os esquemas terapêuticos compostos pela administração de ciclofosfamida (CPA) (pulsos endovenosos mensais ou administração via oral contínua) têm se mostrado efetivos na terapia das nefrites lúpicas proliferativas. A associação de pulsos de metilprednisolona à terapia de CPA resulta em melhora da lesão renal sem aumento da toxicidade (NTALI; BERTSIAS; BOUMPAS, 2005).

A CPA é um pró-fármaco com metabolismo dependente do CYP (citocromo P450); Figura 1. Aproximadamente 80% da dose de ciclofosfamida é ativada para 4-hidroxíciclofosfamida (4-OH-CPA), a qual encontra-se em equilíbrio com seu tautômero, a aldofosfamida (aldoCPA). Na bioativação da ciclofosfamida participam o CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C18 e CYP2C19, sendo o CYP2B6 o de maior relevância. A aldoCPA, por meio de reação espontânea, libera mostarda de fosforamida, o metabólito citotóxico ativo, e acroleína, a qual é tóxica para a maioria das células. Devido à alta permeabilidade das células à 4-OH-CPA, mas não à mostarda de fosforamida, acredita-se que a 4-OH-CPA funcione como uma molécula transportadora de mostarda de fosforamida para o interior das células. Portanto

acredita-se que as concentrações de 4-OH-CPA sejam um melhor indicador do efeito alquilante da CPA (DE JONGE et al., 2005).

A aldoCPA e a 4-OH-CPA são inativadas através de processos oxidativos à carboxifosfamida (carboxiCPA) e 4-cetociclofosfamida (4-cetoCPA), respectivamente. A formação de carboxiCPA a partir de aldoCPA representa a via mais importante de eliminação da CPA, sendo observada a participação das aldeído desidrogenases (ALDH), dentre elas a ALDH1. Além da oxidação à carboxiCPA, a aldoCPA também pode sofrer redução à alcofosfamida catalisada por aldose redutase (reação não mostrada na Figura 1). As álcool desidrogenases estão envolvidas na oxidação da 4-OH-CPA, resultando na formação de 4-cetoCPA. Além disso, a N-desalquilação oxidativa da cadeia lateral da CPA leva à formação de N-descloroetilciclofosfamida (descloroetilCPA, metabólito inativo) e de cloroacetaldeído (DE JONGE et al., 2005). A formação de descloroetilCPA e cloroacetaldeído é mediada principalmente pelo CYP3A4 (BOHNENSTENGEL et al., 1996; HUANG; ROY; WAXMAN, 2000). A glutathione-S-transferase participa do processo de eliminação da 4-OH-CPA, da mostarda de fosforamida e da acroleína (DE JONGE et al., 2005).

Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da ciclofosfamida. As reações de inativação estão indicadas horizontalmente, enquanto que as de ativação estão indicadas verticalmente (DE JONGE et al., 2005).

A grande variabilidade inter-individual nos efeitos clínicos da CPA (tanto eficácia quanto toxicidade) é resultante de diferenças inter-pacientes no metabolismo do fármaco. As variações no perfil metabólico da CPA podem ocorrer devido a mudanças no equilíbrio entre as reações de 4-hidroxilação, N-descloroetilação e eliminação renal

da CPA. Diversos processos podem provocar essas mudanças, como doenças, auto-indução, interação com outros fármacos e fatores genéticos (DE JONGE et al., 2005).

O CYP3A, envolvido na descloroetilação da CPA apresenta atividade enzimática com ampla variabilidade interindividual (NELSON et al., 1996).

A identificação de substratos específicos ou de marcadores para uma isoforma do CYP é essencial na investigação de fatores genéticos, fisiológicos, patológicos ou ambientais que podem alterar a atividade da enzima (NELSON et al., 1996). O midazolam (MDZ) é um fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP3A. Após a administração intravenosa (i.v.) há predominância do metabolismo hepático com formação principalmente do metabólito 1'-hidroximidazolam e recuperação urinária de aproximadamente 70% da dose como conjugado glicuronídeo do metabólito hidroxilado. Considerando que uma quantidade significativa do CYP3A é encontrada nos enterócitos do intestino delgado e nos hepatócitos, na administração *per oral* (p.o.) o MDZ é hidroxilado pelo CYP3A hepático e intestinal. O *clearance* (Cl) total do MDZ reflete a atividade *in vivo* do CYP3A, com a possibilidade de marcação *in vivo* da atividade somente do CYP3A hepático (administração i.v.) ou do CYP3A hepático e intestinal (administração p.o.) (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* em ratos e *in vitro* em humanos relatam que estados inflamatórios alteram a expressão de enzimas CYP e transportadores de fármacos no fígado e nos enterócitos. As citocinas pró-inflamatórias tais como a Interleucina (IL)-1 β , IL-6 e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e os Interferons (IFNs) podem reduzir a expressão de enzimas CYP *in vivo* e em culturas de hepatócitos em estados inflamatórios (MORGAN, 2009; RENTON, 2001). A redução na expressão do CYP é precedida ou acompanhada da redução de RNAs mensageiro, implicando na transcrição como um mecanismo primário (MORGAN, 2009). Ashino et al., (2007) reportam que camundongos com artrite reumatóide experimental mostram redução de 45% em relação aos controles nos níveis e atividade do RNA mensageiro de CYP3A11 e CYP3A. Além disso, os autores observaram a reversibilidade desse efeito após uma injeção de anticorpos anti-IL-6. Quanto aos transportadores, estudos *in vitro* e *in vivo* realizados em ratos relatam que o lipopolissacarídeo (LPS), o TNF- α , a IL-1 β ou a IL-6 diminuem os níveis de RNA mensageiro de diversos transportadores entre eles

transportadores de ânions orgânicos (OATP) e transportadores ABC (AITKEN; RICHARDSON; MORGAN, 2006).

Consequentemente, o estado inflamatório observado em pacientes portadores de LES pode modular a farmacocinética por diferentes mecanismos. As alterações na atividade e expressão de proteínas transportadoras e enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos podem modificar a biodisponibilidade, a distribuição, o clearance e consequentemente a resposta dos fármacos empregados na clínica. Além disso, a redução na atividade inflamatória observada no decorrer do tratamento da doença inflamatória crônica pode alterar as concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio de alguns fármacos resultando em concentrações plasmáticas inferiores ao intervalo terapêutico em razão do retorno da atividade do CYP aos níveis considerados normais (MORGAN, 2009).

Embora o LES possa alterar a função renal, existem poucos estudos em relação à farmacocinética da CPA na presença de disfunção renal. Mouridsen e Jacobsen (1975) relataram acúmulo plasmático da CPA inalterada e de seus metabólitos em 5 pacientes portadores de insuficiência renal crônica. Bramwell et al. (1979) não mostram resultados semelhantes, apenas observaram acúmulo na atividade alquilante nos pacientes com função renal alterada. Entretanto, Juma, Rogers e Trounce (1981), ao investigarem 7 pacientes portadores de insuficiência renal crônica moderada e compará-los a pacientes com função renal inalterada, relataram relação curvilínea entre o CI de creatinina e a meia-vida de eliminação da CPA; ou seja, pacientes com CI de creatinina muito baixo mostraram prolongamento da meia-vida de eliminação da CPA, que diminui à medida em que o CI da creatinina aumenta, até alcançar um platô.

Haubitz et al. (2002) estudaram a farmacocinética CPA em 15 pacientes portadores de doenças auto-imunes (poliangite microscópica, granulomatose de Wegener, nefrite lúpica, espondiloartrite com amiloidose e nefropatia de Imunoglobulina A progressiva com presença de crescentes na biópsia renal) com diferentes graus de disfunção renal. Os autores relataram aumento na exposição sistêmica da CPA associado à redução no CI e ao prolongamento na meia-vida de eliminação, sendo a amplitude dessas alterações relacionada com o grau da disfunção renal. Além disso, os autores observaram correlação entre o CI de creatinina e os *clearances* renal e

sistêmico da CPA, mostrando correlação inversa entre o CI de creatinina e a área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo da CPA. Entretanto, devido à ausência de correlação entre a concentração plasmática da CPA ou atividade alquilante e toxicidade, os autores questionaram sobre a necessidade de alteração das doses para pacientes portadores de disfunção renal, pois não se sabe se a toxicidade apresentada na clínica por estes pacientes ocorreu devido ao acúmulo da CPA e seus metabólitos ou à mielossupressão promovida pelas doenças auto-imunes. Pelo fato do grupo controle (que apresentava função renal dentro dos índices de normalidade) ter sido composto por pacientes portadores de câncer de mama (BUSSE et al., 1997), o estudo de Haubitz et al., (2002) não nos permite inferir sobre a presença de alterações farmacocinéticas devido às doenças auto-imunes.

A insuficiência renal crônica pode alterar o transporte e o metabolismo de fármacos. Estudos com animais de experimentação mostram que fatores urêmicos circulantes podem reduzir a expressão e a atividade hepática e intestinal particularmente do CYP2C e CYP3A. Os estudos clínicos mostram redução na atividade do CYP2C9 e CYP2C19 e redução na atividade dos transportadores OATP e Pgp (DREISBACH; LERTORA, 2008). Vale ressaltar que na bioativação da ciclofosfamida participam o CYP2C9 e CYP2C19, entre outras isoformas (DE JONGE, 2005).

O fenômeno da enantioseletividade é característico nos processos de interação fármaco-macromoléculas quirais como na absorção dependente de carreadores, na ligação às proteínas plasmáticas, nos processos de secreção biliar, renal e no metabolismo. O metabolismo manifesta-se como o processo capaz de introduzir maior grau de enantioseletividade na disposição de fármacos quirais e infere a dependência da via de administração, dos fatores genéticos e da interação de fármacos na expressão do fenômeno (JAMALI; MEHVAR; PASSUTO, 1989). É facilmente compreensível que várias alterações na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos podem modificar a disposição cinética enantioseletiva (KROEMER; FROMM; EICHELBAUM, 1996). Dos fatores relacionados ao metabolismo, a indução e a inibição enzimática podem afetar os enantiômeros de um fármaco quiral em diferentes extensões (JAMALI; MEHVAR; PASSUTO, 1989; KROEMER; FROMM;

EICHELBAUM, 1996). No entanto, essas alterações são mais expressivas quando os enantiômeros sofrem biotransformação através de diferentes enzimas ou pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades (JAMALI; MEHVAR; PASSUTO, 1989). Sabe-se que os enantiômeros de fármacos que possuem estrutura quiral podem apresentar atividades biológicas diferentes, e que certos enantiômeros sofrem metabolismo em diferentes extensões (COX et al., 1976). O entendimento do metabolismo enantiosseletivo pode então, contribuir para uma aproximação mais racional e menos subjetiva na definição da relevância da quiralidade para a farmacoterapia (KROEMER; FROMM; EICHELBAUM, 1996).

A CPA está disponível na clínica como mistura racêmica das suas duas formas enantioméricas, (R)-(+)-CPA e (S)-(-)-CPA. Dados pré-clínicos demonstram diferenças na eficácia e toxicidade dos enantiômeros da CPA, com o enantiômero (S)-(-)-CPA exibindo maior índice terapêutico e maior eficácia (COX et al., 1976, KLEINROK et al., 1986; PAPROCKA et al., 1986; KUSNIERCZYK et al., 1986; PAPROCKA; RADZIKOWSKI, 1986). Cox et al., (1976) relatam índice terapêutico (DL_{50}/DE_{90}) 2 vezes maior para a (S)-(-)-CPA quando comparada a (R)-(+)-CPA (128,1 vs 68,9) em estudos com células tumorais ADJ/PC6 provenientes de camundongos. Comparando-se as propriedades farmacológicas dos enantiômeros da CPA em ratos e camundongos, Kleinrok et al., (1986) relatam maior toxicidade da forma (R)-(+)-CPA. Os autores também reportam maior atividade antineoplásica da (S)-(-)-CPA quando comparada ao seu antípoda, no entanto o enantiômero (S)-(-)-CPA apresenta maior toxicidade quando comparado ao racemato. Os mesmos resultados foram observados por Paprocka et al., (1986) e Kusnierczyk et al., (1986) relatam não somente maior efeito antineoplásico da (S)-(-)-CPA como também maior índice terapêutico nos modelos de carcinoma de pulmão, adenocarcinoma mamário de camundongo 16/C e melanoma B16. Paprocka e Radzikowski (1986) reportam maior atividade antiproliferativa da (S)-(-)-CPA em modelos de células tumorais.

O conhecimento da enantiosseletividade na farmacocinética e farmacodinâmica da CPA em humanos é ainda muito limitado. Cox et al. (1976) investigaram 3 pacientes tratados por via intravascular com CPA racêmica e observaram excreção renal favorecida para o enantiômero (S)-(-)-CPA. Jarman et al. (1979) investigaram a

disposição cinética da CPA em 4 pacientes portadores de câncer de pulmão submetidos à administração intravascular de CPA racêmica e dos enantiômeros puros, após intervalos de 3 semanas entre as doses. Os autores não observaram diferenças enantioespecíficas na disposição cinética da CPA, administrada como mistura racêmica ou enantiômero puro. Holm et al. (1990) investigaram 9 pacientes com diferentes tipos de câncer, tratados com CPA racêmica intravascular e observaram ausência de enantiosseletividade na fase de eliminação dos enantiômeros. Corlett e Chrystyn (1996) também não observaram diferenças entre os *clearances* dos enantiômeros da CPA administrada por via intravascular a 6 pacientes com doença não descrita. Williams et al. (1999) investigaram a enantiosseletividade na disposição cinética da CPA e do seu metabólito descloroetilado em 12 pacientes portadores de câncer tratados com CPA por via intravascular. Os autores mostram diferenças enantioespecíficas na formação do metabólito descloroetilado; o clearance de formação da (R)-descloroetil CPA é aproximadamente o dobro do seu antípoda (S)-descloroetil CPA.

Considerando que o LES é uma doença inflamatória crônica (BORCHERS et al., 2010), considerando que a expressão e a atividade de enzimas CYP são reduzidas durante a resposta inflamatória (MORGAN et al., 2001) com potencial de comprometimento do clearance e da ativação metabólica da CPA, considerando que o clearance não renal de muitos fármacos é reduzido em pacientes com doença renal crônica (DREISBACH; LERTORA, 2008), o presente estudo visa avaliar a influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida empregando midazolam como marcador da atividade do CYP3A *in vivo* em pacientes portadores de nefrite lúpica.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Analisar a influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica.

Objetivos específicos

- Desenvolver e validar o método de análise dos enantiômeros da ciclofosfamida em plasma.
- Avaliar as razões enantioméricas de concentrações plasmáticas da ciclofosfamida diferentes da unidade, em pacientes com função renal normal e alterada.
- Avaliar a influência da função renal na farmacocinética enantiosseletiva da ciclofosfamida.
- Avaliar a correlação entre o *clearance* dos enantiômeros da ciclofosfamida e o *clearance* do midazolam (marcador do CYP3A).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Protocolo clínico

Foram investigados 18 pacientes portadores de LES, avaliados com base nos critérios revisados da classificação de Lupus Eritematoso Sistêmico de 1997 do *American College of Rheumatology* (ACR) (HOCHBERG, 1997) (Tabela 1) em seguimento nos ambulatórios da Divisão de Imunologia Clínica e da Divisão de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O diagnóstico foi realizado com base na presença de no mínimo 4 critérios, seriadamente ou simultaneamente, durante qualquer intervalo de observação (TAN et al., 1982).

Os pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo a velocidade de filtração glomerular estimada através do *clearance* de creatinina:

- Grupo 1- pacientes portadores de nefrite lúpica apresentando *clearance* de creatinina $> 90\text{mL/min/1,73m}^2$;
- Grupo 2- pacientes portadores de nefrite lúpica apresentando *clearance* de creatinina entre 40mL/min/1,73m^2 e 89 mL/min/1,73m^2 .

Os pacientes foram tratados com doses mensais de ciclofosfamida racêmica injetável (Cycram[®], Meizler), em doses individuais de 750 a 1300mg, durante 120 minutos de infusão, sendo internados durante a administração das doses de ciclofosfamida para a realização das colheitas seriadas de sangue. Para a avaliação da atividade do CYP3A hepático, os pacientes receberam uma dose i.v. de 1mg de midazolam (Dormonid[®], Roche) (TATEISHI et al., 2001) concomitante à administração da infusão de CPA. As amostras seriadas de sangue (volumes de aproximadamente 5mL) foram colhidas em seringas heparinizadas (Liquemine[®] 5000UI, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos AS, São Paulo) imediatamente antes da administração do fármaco e em 15, 30, 45 e 60 minutos; e 1,15; 1,30; 2,0; 3,0; 5,0; 8,0; 12,0; 14,0; 16,0; 20,0 e 24,0 horas após o início da infusão. Os plasmas obtidos após a centrifugação das amostras de sangue foram mantidos a uma temperatura de -70°C até a análise.

Tabela 1 - Critérios revisados do ACR 1997 de diagnóstico do LES (HOCHBERG, 1997).

CRITÉRIO	DEFINIÇÃO
Eritema malar	Eritema fixo, plano ou em relevo, sobre as eminências malares, com tendência de atingir a região nasolabial
Eritema discóide	Placas eritematosas em relevo com escamas aderentes e ligação folicular; cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões antigas
Fotossensibilidade	Eritema na pele como resultado de uma reação anormal à luz solar
Úlceras orais	Ulceração oral ou naso-faríngea indolor
Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas caracterizada por edema e derrame de líquido articular
Serosites	Pleurite ou pericardite: pleurite documentada por eletrocardiograma, esfregaço, ou evidência de derrame pericardial
Alteração renal	Proteinúria persistente maior do que 0,5g/L/dia ou cilindros celulares
Alteração neurológica	Convulsões ou psicose
Alteração hematológica	Anemia hemolítica ou leucopenia (menos de 4000 células/dL) ou linfopenia (menos de 1500 células/dL) ou trombocitopenia (menos de 100.000 plaquetas/dL na ausência de drogas)
Alteração imunológica	Anti-DNA (anticorpo anti-DNA dupla hélice em títulos anormais) ou presença de anticorpos antifosfolípídeo, incluindo anticorpos IgG ou IgM anticardiolipina e anticoagulante lúpico ou anti-Sm (anticorpo anti antígeno nuclear Sm) ou teste sorológico falso positivo para sífilis
Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou ensaio equivalente

3.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes adultos (idade entre 18 e 54 anos) portadores de nefrite lúpica, avaliada através de exames clínicos e biópsia renal, com indicação do uso de ciclofosfamida associada ou não a corticoesteróides.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes que não tiveram indicação clínica do uso de ciclofosfamida para o tratamento de nefrite lúpica e pacientes em tratamento dialítico. Também foram excluídos do estudo pacientes com história de doença pulmonar obstrutiva crônica grave, devido ao risco de apnéia pelo midazolam (fármaco que foi empregado como marcador da atividade *in vivo* do CYP3A).

3.1.3. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em 02 de agosto de 2005, Processo HCRP 5105/2005 (ANEXO A).

As colheitas de sangue foram realizadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) dos pacientes portadores de nefrite lúpica em uso da ciclofosfamida, garantindo-lhe o direito de participar ou não da pesquisa. Foi garantida a liberdade do paciente em recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado e/ou tratamento. Foi garantido, também, o sigilo dos dados obtidos, assegurando a privacidade desses pacientes.

3.2. Análise enantiosseletiva da ciclofosfamida em plasma

3.2.1. Reagentes e soluções padrão

As soluções padrão de ciclofosfamida (ISOPAC, pureza >99,5%, mono-hidratada, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em etanol nas concentrações entre 4-200 µg/mL e armazenadas a -20 °C. O padrão interno (PI) utilizado foi a antipirina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), preparada em etanol na concentração de 0,1 mg/mL.

O plasma humano livre de ciclofosfamida foi obtido de voluntários sadios e fornecido pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras enriquecidas nas concentrações entre 0,5-25,0 µg de cada enantiômero/mL de plasma, utilizadas para a validação do método, foram obtidas pela adição de alíquotas conhecidas (50 µL) das soluções padrão em 200 µL de plasma branco. Os reagentes acetonitrila, acetato de etila e clorofórmio, grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico (88%) foi adquirido da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Toda a água utilizada foi destilada e deionizada com o auxílio do sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2.2. Instrumentação

O sistema de cromatografia líquida foi composto por uma bomba LC10AD e um forno de coluna CTO-10AS da Shimadzu (Kyoto, Japão). Os enantiômeros da ciclofosfamida e o padrão interno antipirina foram separados na coluna Chiralcel[®] ODR (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 10 µm) (Chiral Technologies Inc., Exton, PA, EUA) acoplada a uma pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP 18 (4 x 4 mm, tamanho de partícula de 5 µm) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel constituída de mistura de água: acetonitrila (75:25, v/v) adicionada de 0,2% de ácido fórmico foi empregada na vazão de 0,5 mL por minuto. A coluna foi mantida a uma temperatura de 20 ± 1 °C.

Os enantiômeros da ciclofosfamida foram detectados com o auxílio de um espectrômetro de massas (Quattro Micro LC, Micromass, Manchester, RU) acoplado ao

cromatógrafo líquido e equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* operando no modo íon positivo. A fase móvel proveniente do cromatógrafo líquido foi dividida, sendo que aproximadamente 200µL/min entraram no espectrômetro de massas. A temperatura de dessolvatação foi mantida a 200°C, a fonte em 120°C e a voltagem do capilar foi de 3kV. O nitrogênio e o argônio foram utilizados como gás nebulizador e gás de colisão com fluxo de 415L/h e $2,07 \times 10^{-3}$ mbar de pressão, respectivamente. As voltagens do cone e de colisão foram ajustadas em 25V e 20eV, respectivamente.

As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas através da infusão direta de solução padrão de ciclofosfamida (10µg/mL) retomada na fase móvel e injetada no espectrômetro de massas com o auxílio de uma bomba de infusão em um fluxo de 10µL/min.

Para a quantificação, o espectrômetro de massas foi ajustado para operar no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) de forma a monitorar o PI (transições 189>104) e a CPA (transições 261>141), com um *dwel time* fixado em 1s para cada transição de massas. A aquisição de dados e análise quantitativa foi realizada utilizando-se o sistema MassLynx (Micromass, Manchester, RU) de aquisição de dados, versão 3,5.

3.2.3. Preparação das amostras

À 200µL de plasma foram adicionados 25µL da solução de PI. A ciclofosfamida foi extraída do plasma com 5,0mL da mistura acetato de etila: clorofórmio (75:25, v/v) com agitação horizontal durante 30 minutos. Após centrifugação a 2000g durante 10 minutos, as fases orgânicas foram coletadas e secas sob fluxo de ar. Os resíduos foram retomados em 200µL da fase móvel e em 100µL de hexano. Estes resíduos foram submetidos à agitação tipo vórtex por 20s, seguido de centrifugação a 1000g durante 5 minutos. Uma alíquota de 40µL da fase aquosa de cada amostra foi injetada no sistema cromatográfico (Figura 2).

Figura 2. Procedimento de extração dos enantiômeros da CPA em plasma. Condições cromatográficas: Coluna Chiralcel® ODR, pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18, fase móvel: acetonitrila:água (25:75, v/v) adicionada de 0,2% ácido fórmico, fluxo 0,5mL/min. Condições de detecção: ESI +, m/z : 261>140 para a ciclofosfamida e m/z : 189>104 para a antipirina (PI).

3.2.4. Determinação da ordem de eluição

Alíquotas de 25µL de solução padrão de CPA racêmica na concentração de 4mg/mL foram injetadas na coluna Chiralcel® ODR nas condições anteriormente estabelecidas, empregando fase móvel constituída de mistura de água: acetonitrila (75:25, v/v) adicionada de 0,2% de ácido fórmico na vazão de 0,5mL/min. Os enantiômeros individuais foram coletados na saída do detector ultravioleta operando no comprimento de onda de 195nm. As alíquotas coletadas foram extraídas de acordo com as condições previamente citadas, sendo o extrato seco retomado na fase móvel composta por acetonitrila: tampão fosfato pH 4 0,015M (1:99, v/v) utilizada por Corlett e Chrystyn (1996).

A ordem de eluição dos enantiômeros da CPA foi avaliada pela análise de alíquotas dos enantiômeros individuais na coluna Chiral-AGP® (Chromtech, Stockholm, Suécia) conforme descrito por Corlett e Chrystyn (1996).

3.2.5. Estudo de racemização

Soluções padrão de CPA na concentração de 4mg/mL foram injetadas na coluna Chiralcel® ODR empregando fase móvel constituída de mistura de água: acetonitrila (75:25, v/v) adicionada de 0,2% de ácido fórmico na vazão de 0,5mL/min. Os enantiômeros individuais foram coletados na saída do detector ultravioleta operando no comprimento de onda de 195nm. As frações coletadas, contendo os enantiômeros puros, foram extraídas da fase móvel de acordo com o procedimento de extração. Os extratos foram evaporados até a secura, retomados em 200uL de plasma branco e submetidos ao procedimento de extração. Os cromatogramas obtidos foram comparados àqueles obtidos a partir de soluções padrão na mesma concentração, não submetidas ao procedimento de extração.

3.2.6. Efeito da matriz

A presença de componentes provenientes da matriz que co-eluem com a substância de interesse pode promover supressão ou estimulação da formação do íon que se deseja quantificar em um espectrômetro de massas operando no modo de ionização por *electrospray*, alterando assim a exatidão do método a ser validado. Considera-se um método ausente de efeito da matriz aquele que não possibilita a co-eluição desses componentes juntamente com a substância de interesse, seja pela eficiência do processo de extração, seja pela resolução cromatográfica (THERON et al., 2007).

A presença do efeito da matriz foi avaliada através da análise de alíquotas de 0,2mL de plasma branco proveniente de 4 diferentes lotes obtidos de diferentes voluntários. Essas alíquotas de plasma branco foram submetidas ao procedimento de extração acima descrito sem a adição do PI. Ao extrato orgânico foram adicionadas três concentrações diferentes de CPA de forma a serem obtidas as seguintes concentrações, em triplicata: 0,5; 10,0 e 25,0µg de cada enantiômero/mL de plasma. Após a secagem do extrato orgânico, as amostras foram retomadas em 200µL da fase móvel, em 100µL de n-hexano e injetadas no sistema cromatográfico de acordo com o descrito neste método. As áreas dos picos obtidas foram comparadas com aquelas obtidas da injeção direta de solução padrão de CPA no sistema cromatográfico.

3.2.7. Validação do método

O método desenvolvido para a análise dos enantiômeros da CPA em plasma foi validado de acordo com as recomendações da Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

3.2.7.1. Linearidade

As curvas de calibração para a análise da CPA foram preparadas analisando-se 0,2mL de plasma branco adicionados de 50 μ L das soluções de uso contendo CPA racêmica, resultando em concentrações de 0,5 a 25 μ g de cada enantiômero/mL de plasma. Os gráficos de concentração plasmática de cada enantiômero *versus* a razão entre as áreas dos picos CPA/PI foram construídos e as equações de regressão linear foram utilizadas para a determinação das concentrações dos enantiômeros da ciclofosfamida nas amostras de plasma.

3.2.7.2. Recuperação

A eficiência do procedimento de extração foi confirmada através da análise de alíquotas de 0,2mL de plasma branco adicionadas de três concentrações diferentes de CPA em triplicatas: 0,5; 10,0 e 25,0 μ g de cada enantiômero/mL de plasma. As amostras foram submetidas ao procedimento de extração e o PI foi adicionado aos extratos. As razões entre as áreas dos picos obtidas foram comparadas com aquelas obtidas da injeção direta de CPA e PI no sistema cromatográfico.

3.2.7.3. Precisão e exatidão intra e inter-ensaios

A exatidão e a precisão inter e intra-ensaio foram determinadas em três concentrações através da análise de alíquotas de plasma branco adicionadas de 0,5; 10,0 e 25,0 μ g de cada enantiômero/mL. Alíquotas dessas amostras foram armazenadas a -20 °C e analisadas em replicatas (n = 10) utilizando-se uma única curva de calibração para a determinação da exatidão e precisão intra-ensaio. Para a determinação da precisão e exatidão inter-ensaios foram preparadas amostras em replicatas (n = 5) durante cinco dias consecutivos.

3.2.7.4. Limite de quantificação

De acordo com a definição, o limite de quantificação é a menor concentração de fármaco que pode ser quantificada no material em questão, neste caso o plasma, com um coeficiente de variação de até 20%. Para a análise dos enantiômeros da CPA em plasma, o limite de quantificação foi determinado através da análise em replicata (n=5) de plasma branco adicionado de alíquotas conhecidas de cada enantiômero da CPA.

3.2.7.5. Estabilidades de curta duração e pós-processamento

As estabilidades de curta duração e pós-processamento da CPA foram avaliadas através da análise em triplicata, de alíquotas de plasma branco adicionadas de CPA nas concentrações de 0,5 e 25µg de cada enantiômero/mL de plasma. A estabilidade de curta duração da (R)-(+)-CPA e da (S)-(-)-CPA em plasma foi determinada em amostras mantidas na bancada durante 4h a temperatura ambiente (25°C), enquanto que a estabilidade pós-processamento dos extratos foi avaliada no autoinjeter (16°C) durante 12h. As razões de áreas CPA/PI foram comparadas àquelas obtidas de amostras recém extraídas.

3.3. Análise do midazolam em plasma

A análise do midazolam (MDZ) em plasma foi realizada por LC-MS/MS de acordo com o método anteriormente descrito pelo grupo (Jabor et al., 2005). Resumidamente, a 1mL de plasma foram adicionados 25µL da solução de padrão interno clobazam (solução 0,1µg/mL) e alcalinizado com 100µL de solução de hidróxido de sódio 0,1mol/L. Em seguida foram adicionados 4mL do solvente extrator (tolueno e álcool isoamílico 100:1, v/v). Após agitação em agitador horizontal durante 30 minutos, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000g, sendo as fases orgânicas transferidas para tubos cônicos e evaporadas à secura em um sistema de evaporação a vácuo. O resíduo foi retomado em 100µL da fase móvel, sendo que uma alíquota de 75µL foi injetada no sistema cromatográfico.

O MDZ e o padrão interno clobazam foram separados na coluna Purospher® RP18 (150mm x 4.6mm, tamanho de partícula de 5µm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) acoplada a uma pré-coluna LiChrospher® 100 RP 18-e (4x4mm, tamanho de partícula de 5µm) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel consistia em uma mistura de solução aquosa de acetato de amônia 10mmol/L: acetonitrila (50:50, v/v) e foi bombeada pelo cromatógrafo na vazão de 0,75mL/min. A coluna foi mantida na temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

O MDZ e o PI foram detectados com o auxílio de um espectrômetro de massas (Quattro Micro LC, Micromass) acoplado a cromatógrafo líquido e equipado com interface de ionização por *electrospray* operando no modo íon positivo. O fluxo do cromatógrafo líquido foi dividido, sendo que aproximadamente 200µL/min entraram no espectrômetro de massas. A temperatura de dessolvatação foi mantida a 275°C , a fonte em 120°C e a voltagem do capilar foi de 3kV. O nitrogênio e o argônio foram utilizados como gás nebulizador e gás de colisão em fluxo de 415L/h e $2,7 \times 10^{-3}$ mbar de pressão, respectivamente. As voltagens do cone e da energia de colisão foram otimizadas para cada analito no modo *full scan acquisition* do LC-MS/MS.

Para a quantificação, o espectrômetro de massas foi ajustado para operar no modo MRM de forma a monitorar o PI (transições 301>259) e o MDZ (transições 326>291), com um *dwell time* fixado em 0,1s para cada transição de massas. A aquisição de dados e análise quantitativa foi realizada utilizando-se o sistema MassLynx (Micromass) de aquisição de dados, versão 3,5.

3.4. Análise farmacocinética e estatística

3.4.1. Avaliação da disposição cinética enantiosseletiva da CPA

A disposição cinética enantiosseletiva da CPA na administração i.v. em pacientes portadores de nefrite lúpica, foi avaliada através do modelo monocompartimental e cinética de primeira ordem, com o auxílio do programa WinNonlin, versão 4,0 (Pharsight Corp., Mountain View, EUA). A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ($\text{AUC}^{0-\infty}$) foi determinada no intervalo de 0 – 24 horas, através do método dos trapézios

e extrapolada para o infinito através da razão entre a última concentração plasmática avaliada e a constante de velocidade de eliminação (k_{el}). A constante de velocidade de eliminação foi obtida através da equação $k_{el} = 0,693/t_{1/2}$. O *clearance* total (Cl) de cada enantiômero da CPA foi estimado através da equação $Cl = \text{dose}/AUC^{0-\infty}$ e o volume de distribuição (Vd) dividindo-se o *clearance* total (Cl) pela respectiva constante de velocidade de eliminação (GABRIELSSON; WEINER, 2000).

Os resultados estão expressos através das medianas e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Os testes estatísticos para a análise dos dados experimentais foram realizados com o auxílio do software Graphpad Instat[®], versão 3,0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste de Wilcoxon foi empregado para avaliar as razões enantioméricas (S)-(-)/(R)-(+) diferentes da unidade e o teste de Mann-Whitney foi empregado para avaliar diferenças nos parâmetros farmacocinéticos entre os grupos. Para ambos os testes foi fixada significância em $p < 0,05$.

3.4.2. Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A

A disposição cinética do MDZ administrado via endovenosa nos pacientes acima citados foi avaliada através do modelo monocompartimental e cinética de primeira ordem com o auxílio do programa WinNonlin. Com o auxílio do programa foram obtidos os seguintes parâmetros: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ($AUC^{0-\infty}$), determinada no intervalo de 0 – 6 horas, constante de velocidade de eliminação (k_{el}), meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), volume de distribuição (Vd) e *clearance* total (Cl) do MDZ (GABRIELSSON; WEINER, 2000).

Os resultados estão expressos através das medianas e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Os testes estatísticos para a análise dos dados experimentais foram realizados com o auxílio do software Graphpad Instat[®], versão 3,0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste de regressão ortogonal foi empregado para avaliar a relação entre o Cl do MDZ e o Cl de cada enantiômero da CPA, com significância fixada em $p \leq 0,05$, de acordo com as equações descritas no estudo de Schellens et al., (1988). O teste de regressão ortogonal foi realizado com o auxílio do programa GMC (Geraldo Maia Campos, GMC – pesquisa biológica - versão 6,6).

4. RESULTADOS

4.1. Protocolo clínico

As Tabelas 2 e 3 apresentam os parâmetros individuais referentes aos 10 pacientes pertencentes ao Grupo 1 e as Tabelas 4 e 5 apresentam os parâmetros individuais referentes aos 8 pacientes pertencentes ao Grupo 2.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos referentes aos pacientes do Grupo 1 (n=10).

Pacientes	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	Fosfatase alcalina (U/L)	Albumina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Clearance de Creatinina (mL/min/1,73m ²)
(1)	43	52	112	273	2,5	0,78	144,6
(5)	18	16	22	196	2,9	0,74	97,4
(6)	20	15	24	166	3,9	0,72	144,2
(7)	24	23	27	----	4,3	0,73	96,8
(9)	43	39	171	168	2,0	0,83	123,4
(12)	23	41	74	221	3,9	0,88	113,4
(13)	29	22	24	196	4,0	1,03	90,6
(15)	19	12	24	141	3,0	0,84	94,3
(16)	17	15	56	161	3,8	0,68	99,8
(17)	14	18	69	247	3,8	0,82	100,3
Valores de Referência	até 32	até 31	11– 50	65- 300	3,5-4,8	0,4-1,3	97-137 homens; 88-128 mulheres

Tabela 3. Dados individuais dos pacientes incluídos no Grupo 1 (n=10).

Paciente	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	Estágio da doença renal crônica*	Glomerulonefrite	Fármacos associados	Dose de CPA racêmica (g)
(1)	18,5	21,69	1	Classe IV	1, 2, 3, 4, 7, 19, 20	1,0
(5)	39,92	24,94	1	Classe IV	4, 5, 6, 9, 16, 20	1,0
(6)	24	21,06	1	Classe IV	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 20	1,3
(7)	32,92	23,01	1	Classe IV	1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 13, 15, 20	1,1
(9)	24,67	22,01	1	Classe IV	2, 4, 6, 18, 20	0,8
(12)	25,17	19,44	1	Classe III	1, 2, 4, 5, 6, 20	1,0
(13)	42,25	34,13	1	Classe IV	1, 2, 4, 6, 9, 20, 23, 24	1,0
(15)	30,17	22,92	1	Classes IV e V	1, 2, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22, 25	0,9
(16)	24,92	22,15	1	Classe III	1, 2, 4, 6, 19, 20	1,0
(17)	36,25	21,6	1	Classes IV e V	1, 2, 4, 6, 7, 10, 20, 22	1,0

* Critérios de classificação da doença renal crônica estabelecida pelo estudo K/DOQI (USA NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

** Classificação da Organização Mundial da Saúde do envolvimento renal no Lupus Eritematoso Sistêmico (CHURG; BERNSTEIN; GLASSOCK, 1995).

*** (1) prednisona, (2) metilprednisolona, (3) ácido acetil salicílico, (4) furosemida, (5) difosfato de cloroquina, (6) ondansetrona, (7) bromoprida, (8) dipirona (9) enalapril, (10) captopril, (11) hidroclortiazida, (12) clonidina, (13) nifedipina, (14) alendronato, (15) azatioprina, (16) metformina, (17) vitamina D, (18) paracetamol, (19) carbonato de cálcio, (20) mesna, (21) tiroxina, (22) amlodipina, (23) fluoxetina, (24) amitriptilina (25) atenolol (26) hidroxicloroquina, (27) losartan (28) propranolol, (29) carbonato de sódio, (30) sulfato ferroso

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos referentes aos pacientes do Grupo 2 (n=8).

Pacientes	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	Fosfatase alcalina (U/L)	Albumina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Clearance de Creatinina (mL/min/1,73m ²)
(2)	17	-----	41	197	3,9	1,09	50,3
(3)	36	13	38	207	3,3	1,13	55,2
(4)	21	7	25	139	3,6	1,4	42,8
(8)	26	24	47	260	2,2	1,99	46,9
(10)	12	18	23	106	4,0	0,99	76,4
(11)	18	14	51	138	3,2	0,97	65,3
(14)	47	20	25	158	2,5	1,6	60
(18)	16	25	-----	140	3,9	1,55	48,7
Valores de Referência	até 32	até 31	11– 50	65- 300	3,5-4,8	0,4-1,3	97-137 homens; 88-128 mulheres

Tabela 5. Dados individuais dos pacientes incluídos no Grupo 2 (n=8).

Paciente	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	Estágio da doença renal crônica*	Glomerulonefrite**	Fármacos associados***	Dose de CPA racêmica (g)
(2)	48,17	21,59	3	Classe IV	1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 20	1,0
(3)	54	26,93	3	Classes IV e V	1, 2, 4, 6, 10, 14, 17, 19, 20	1,0
(4)	41,42	22,33	3	Classe IV	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 17, 19, 20	1,0
(8)	21,25	20,58	3	Classe IV	2, 4, 6, 9, 11, 20	0,8
(10)	24,92	20,46	2	Classe IV	1, 6, 20	0,75
(11)	23,08	19,06	2	Classe III	1,2, 4, 5, 6, 17, 19, 20, 21	1,0
(14)	28,5	27,49	2	Classe V	1, 2, 4, 6, 10, 15, 19, 20, 22, 26, 27	0,8
(18)	44,83	24,8	3	Classes IV e V	1, 2, 4, 12, 20, 22, 28, 29, 30	1,0

* Critérios de classificação da doença renal crônica estabelecida pelo estudo K/DOQI (USA NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

** Classificação da Organização Mundial da Saúde do envolvimento renal no Lupus Eritematoso Sistêmico (CHURG; BERNSTEIN; GLASSOCK, 1995).

*** (1) prednisona, (2) metilprednisolona, (3) ácido acetil salicílico, (4) furosemida, (5) difosfato de cloroquina, (6) ondansetrona, (7) bromoprida, (8) dipirona (9) enalapril, (10) captopril, (11) hidroclortiazida, (12) clonidina, (13) nifedipina, (14) alendronato, (15) azatioprina, (16) metformina, (17) vitamina D, (18) paracetamol, (19) carbonato de cálcio, (20) mesna, (21) tiroxina, (22) amlodipina, (23) fluoxetina, (24) amitriptilina (25) atenolol (26) hidroxicloroquina, (27) losartan (28) propranolol, (29) carbonato de sódio, (30) sulfato ferroso

4.2. Análise enantiosseletiva da ciclofosfamida em plasma

A Figura 3 apresenta os íons da ciclofosfamida, sendo o íon molecular $[MH]^+$ representado pela razão massa carga (m/z) 261 e o seu íon produto representado pela m/z 141.

Figura 3. Íons da ciclofosfamida. (A) íon molecular $[MH]^+$ representado pela m/z 261 e (B) o seu íon produto representado pela m/z 141.

A Figura 4 apresenta o cromatograma de um plasma branco, o cromatograma de um plasma branco adicionado de ciclofosfamida na concentração de $10\mu\text{g/mL}$ e o cromatograma de um paciente portador de nefrite lúpica 3h após o início da infusão de 1g de ciclofosfamida. O PI foi eluído com tempo de retenção de 12,83min e a (S)-(-)-ciclofosfamida e a (R)-(+)-ciclofosfamida com tempos de retenção de 15,11 e 16,94 minutos, respectivamente.

Figura 4. Cromatogramas da CPA em plasma. (A) Plasma branco; (B) Plasma branco adicionado de ciclofosfamida na concentração de 10µg/mL; (C) plasma de paciente 3h após o início da infusão de 1g de CPA . Picos: (1) antipirina (PI); (2) (S)-(-)-ciclofosfamida; (3) (R)-(+)-ciclofosfamida.

Os parâmetros da validação do método de análise dos enantiômeros da ciclofosfamida em plasma humano encontram-se sumarizados nas Tabelas 6 e 7. Os valores obtidos em relação à recuperação relativa dos enantiômeros da ciclofosfamida demonstram que os mesmos possuem recuperação de aproximadamente 100% em plasma. O método é linear nas concentrações entre 0,0025 e 25,0µg/mL, sendo o coeficiente de regressão linear $r = 0,99$ para ambos os enantiômeros.

Tabela 6. Limites de confiança para a análise enantiosseletiva da ciclofosfamida em plasma

	(S)-(-)-CPA	(R)-(+)-CPA
Recuperação % (n=3)		
0,5µg/mL	105,3	103,6
10,0µg/mL	98,0	99,8
25,0µg/mL	96,5	97,9
Linearidade (µg /mL)	0,0025 – 25,0	0,0025 – 25,0
Coeficiente de correlação	r = 0,99	= 0,99
Limite de Quantificação (ng/ml)	2,5	2,5
Precisão intra-ensaio (CV%; n=10)	9,3	8,8
Exatidão intra-ensaio (desvio %)	-0,7	-2,0
Precisão intra-ensaio (CV %; n=10)		
0,5µg/mL	2,0	2,0
10,0µg/mL	2,6	2,8
25,0µg/mL	1,6	1,2
Precisão inter-ensaios (CV %; n=5)		
0,5µg/mL	1,9	1,0
10,0µg/mL	3,5	4,3
25,0µg/mL	2,6	2,7
Exatidão intra-ensaio (desvio %; n=10)		
0,5µg/mL	1,0	1,0
10,0µg/mL	4,3	4,5
25,0µg/mL	5,9	6,1
Exatidão inter-ensaio; (desvio %; n=5)		
0,5µg/mL	2,8	1,4
10,0µg/mL	5,0	4,6
25,0µg/mL	8,3	8,0

O limite de quantificação obtido foi de 2,5ng/mL, com coeficiente de variação menor que 10% para ambos os enantiômeros. Os coeficientes de variação obtidos na avaliação da precisão inter e intra-ensaio foram inferiores a 10% para a (S)-(-)-CPA e para a (R)-(+)-CPA. As porcentagens de desvio foram inferiores a 10 na avaliação da exatidão inter e intra-ensaio para ambos os enantiômeros.

A tabela 7 apresenta os resultados relativos à estabilidade de curta duração e de pós-processamento dos enantiômeros da ciclofosfamida. Os resultados dos testes de curta duração e pós-processamento foram comparados com os valores obtidos de amostras recém-preparadas empregando o teste t de *Student*.

Tabela 7. Testes de estabilidade (valores de p) da ciclofosfamida em plasma.

Estabilidade	(S)-(-)-Ciclofosfamida	(R)-(+)-Ciclofosfamida
Curta Duração (4h)		
0,5µg/mL	0,5286	0,7735
25,0µg/mL	0,4301	0,2029
Pós-Processamento (12h)		
0,5µg/mL	0,0742	0,2697
25,0µg/mL	0,2737	0,1375

* Teste t de *Student*, $p < 0,05$

A Tabela 8 apresenta os resultados relativos ao efeito da matriz na análise dos enantiômeros da CPA em plasma.

Tabela 8. Efeito da matriz na análise dos enantiômeros da CPA em diferentes lotes de plasma.

Concentração Nominal (µg/mL)	Efeito da Matriz (%)		
	(S)-(-)-CPA	(R)-(+)-CPA	PI
0,5	105,4	104,3	97,0
10,0	98,0	98,0	
25,0	97,0	97,0	

4.3. Análise farmacocinética e estatística

4.3.1. Avaliação da disposição cinética enantiosseletiva da ciclofosfamida

As Figuras 5 e 6 apresentam os perfis farmacocinéticos da (S)-(-)-CPA e da (R)-(+)-CPA, representados pelas médias das concentrações plasmáticas obtidas em função dos diferentes tempos de coleta e seus respectivos erros padrão da média para os pacientes do Grupo 1 (n=10) e do Grupo 2 (n=8), respectivamente.

Figura 5. Concentrações plasmáticas médias ($\pm$ EPM) da (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA observadas para os pacientes do Grupo 1 (n=10) até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica.

Figura 6. Concentrações plasmáticas médias ($\pm$ EPM) da (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA observadas para os pacientes do Grupo 2 (n=8) até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica.

As Figuras 7 e 8 apresentam as razões (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA obtidas em função dos tempos, representadas pelas médias e seus respectivos erros padrão da média, para o Grupo 1 e para o Grupo 2, respectivamente.

Figura 7. Razões (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA observadas após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica nos pacientes pertencentes ao Grupo 1. Os dados estão representados como média e erro padrão da média (n=10).

Figura 8. Razões (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA observadas após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica nos pacientes pertencentes ao Grupo 2. Os dados estão representados como média e erro padrão da média (n=8).

A Tabela 9 apresenta a análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos entre os enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA no Grupo 1 (n=10) e no Grupo 2 (n=8).

Tabela 9. Disposição cinética dos enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA nos pacientes portadores de nefrite lúpica, tratados com 750 a 1300mg de CPA racêmica, inseridos nos grupos 1 (n=10) e 2 (n=8). Os dados estão representados como mediana e IC 95%.

Parâmetros	Grupo 1		Grupo 2	
	(S)-(-)-CPA	(R)-(+)-CPA	(S)-(-)-CPA	(R)-(+)-CPA
Vd (L)	31,38 (26,07-39,61)	29,74† (24,92-28,25)	27,08 (24,24-29,43)	27,55 (18,48-44,72)
Vd (L/kg)	0,51 (0,42-0,63)	0,48† (0,40-0,61)	0,47 (0,45-0,51)	0,50 (0,36-0,75)
Kel (h ⁻¹)	0,10 (0,09- 0,13)	0,12† (0,10- 0,17)	0,11 (0,09-0,13)	0,13† (0,10-0,18)
t _{1/2} (h)	6,79 (5,72-7,49)	5,56† (4,42-6,51)	6,15 (5,18-7,19)	4,99† (4,04-6,24)
AUC ^{0-∞}	152,41	129,25†	167,20	139,08†
(h*ug/mL)**	(130,58-169,86)	(108,03-148,62)	(145,48-186,64)	(97,84-157,19)
Cl (L/h)	3,28 (2,95-3,92)	3,89† (3,35-4,85)	2,99 (2,66-3,49)	3,59† (2,97-5,63)
Cl (L/h.kg)	0,055 (0,046-0,064)	0,062† (0,052-0,079)	0,055 (0,030-0,068)	0,070† (0,053-0,101)

** Valor de AUC^{0-∞} corrigido em função de dose de 1g de CPA racêmica.

† p < 0,05 Teste de Wilcoxon, (S)-(-)-CPA vs (R)-(+)-CPA

* p < 0,05 Teste de Mann-Whitney, Grupo 1 vs Grupo 2

4.3.2. Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A

A Tabela 10 apresenta a avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A utilizando o midazolam como fármaco marcador, obtida a partir da administração de 1mg de midazolam i.v. aos pacientes do Grupo 1 (n=10) e aos pacientes do Grupo 2 (n=8). A Tabela 11 apresenta as equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre os *clearances* da (S)-(-)-CPA e do MDZ e entre os *clearances* da (R)-(+)-CPA e do MDZ avaliados em 18 pacientes portadores de nefrite lúpica.

Tabela 10. Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A utilizando o midazolam como fármaco marcador.

Pacientes	Clearance do midazolam (ml/min.kg)
Grupo 1	
(1)	6,31
(5)	12,66
(6)	9,15
(7)	8,95
(9)	5,75
(12)	2,92
(13)	3,78
(15)	12,98
(16)	15,13
(17)	16,40
Grupo 2	
(2)	7,92
(3)	3,63
(4)	5,93
(8)	4,26
(10)	13,01
(11)	9,03
(14)	7,63
(18)	10,00

Tabela 11. Equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre os *clearances* da (S)-(-)-CPA e do MDZ e entre os *clearances* da (R)-(+)-CPA e do MDZ avaliados em 18 pacientes portadores de nefrite lúpica

Clearance do midazolam	
Clearance (S)-(-)-CPA	-4,1867 + 85,3069x r=0,2467
Clearance (R)-(+)-CPA	-15,2261 + 222,2901x r=0,0465

$y = a + bx$, sendo $a = \bar{y}_m - b \cdot \bar{x}_m$
 $b = \frac{\sum (y - \bar{y}_m)^2 \sum (x - \bar{x}_m)^2 + [(\sum (y - \bar{y}_m) - \sum (x - \bar{x}_m))^2 + 4 \sum ((x - \bar{x}_m) \cdot (y - \bar{y}_m))^2]^{1/2}}{2 \sum (x - \bar{x}_m) \cdot (y - \bar{y}_m)}$;
 onde $\bar{x}_m = (\sum x)/n$ e $\bar{y}_m = (\sum y)/n$ (SCHELLENS et al., 1988).

5. DISCUSSÃO

A investigação da enantiosseletividade na farmacocinética da CPA em pacientes lúpicos portadores de doença renal crônica exige o desenvolvimento e a validação de um método analítico com sensibilidade compatível com as baixas concentrações plasmáticas observadas na administração de pulsos endovenosos de CPA.

Os métodos para a quantificação da CPA como mistura enantiomérica em plasma humano empregam a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV) (CORLETT; CHRYSTYN, 1996; REID; STOBAUGH; STERNSON, 1989), a cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (KALHORN et al., 1999), a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (WILLIAMS et al., 1999) e a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (BAUMANN et al., 1999; LIU et al., 2004).

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS) tem sido empregada na quantificação da CPA como mistura enantiomérica em diferentes matrizes biológicas. Sottani et al. (2005), Barbieri et al. (2006) e Kasel et al. (2004) desenvolveram e validaram métodos para a análise da CPA, seus metabólitos e outros quimioterápicos em urina. Hedmer, Jonsson e Nygren (2004) e Sabatini et al. (2005) validaram métodos para a quantificação da CPA e outros quimioterápicos em amostras de superfície para controle da exposição ocupacional. Sadagopan et al. (2001) descreveram um método para a quantificação de CPA e seu metabólito 4-OH-CPA em plasma e baço de ratos. A quantificação plasmática da CPA e seu metabólito 4-OH-CPA associada ou não a outros fármacos tais como tiotepa, tepa, doxorubicina e doxorubicinol foi também descrita por vários autores (DE JONGE et al., 2004; EKHART et al., 2007; DiFRANCESCO et al., 2007; HEDMER et al., 2006).

A análise enantiosseletiva da CPA em plasma é descrita empregando colunas quirais ou reagentes de derivação quiral com a utilização de HPLC-UV ou GC-MS (CORLETT; CHRYSTYN, 1996; MASUREL; WAINER, 1989; REID; STOBAUGH; STERNSON, 1989; WILLIAMS et al., 1999). Masurel e Wainer (1989) reportam a separação dos enantiômeros da CPA na coluna Chiralcel OD acoplada ao detector ultravioleta (UV). Corlett e Chrystyn (1996) analisaram os enantiômeros da CPA em soro humano empregando a coluna Chiral-AGP com detecção por UV. Reid, Stobaugh and Sternson (1989) quantificaram os enantiômeros da CPA em plasma humano

através de derivação quiral e separação do derivado diastereoisomérico na coluna Hypersil ODS seguida de detecção por UV. Williams et al. (1999) relatam a quantificação dos enantiômeros da CPA em plasma humano e urina utilizando CG-MS com o emprego de coluna capilar com fase estacionária quiral.

O presente estudo reporta pela primeira vez o desenvolvimento e a validação de um método de análise dos enantiômeros da CPA em plasma utilizando coluna quiral acoplada ao LC-MS/MS com aplicação em estudos de farmacocinética. Os enantiômeros da CPA foram separados na coluna quiral Chiralcel OD-R com fase móvel composta por mistura de acetonitrila: água (25:75 v/v) adicionada de 0,2% de ácido fórmico. A ordem de eluição dos enantiômeros da CPA foi determinada de acordo com o método descrito por Corlett e Chrystyn (1996). Os enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA foram eluídos com tempos de retenção de 15,11 e 16,94 minutos, respectivamente (Figura 4). O enantiômero (S)-(-)-CPA foi o primeiro a eluir da coluna Chiralcel OD-R, sendo o oposto observado na eluição do enantiômero pela coluna Chiral-AGP descrita por Corlett e Chrystyn (1996).

Os enantiômeros da CPA foram recuperados do plasma por procedimento líquido-líquido empregando a mistura acetato de etila e clorofórmio (75:25, v/v) como solvente extrator. A recuperação de ambos os enantiômeros da CPA foi maior do que 95% e independente da concentração analisada (Tabela 6). Em relação a mistura enantiomérica, Sadagopan et al. (2001); De Jonge et al. (2004) e Ekhardt et al. (2007) reportam resultados similares empregando precipitação protéica com acetonitrila ou com a mistura acetonitrila-metanol (50:50, v/v). Baumann et al. (1999); Liu et al. (2004) e DiFrancesco et al. (2007) empregam procedimento de extração em fase sólida (C18) e reportam recuperações para a mistura enantiomérica da CPA variando de 80-100%.

O limite de quantificação para ambos os enantiômeros da CPA foi de 2,5ng/mL com a extração de alíquotas de apenas 200µL de plasma. Corlett e Chrystyn (1996) e Reid, Stobaugh e Sternson (1989) reportam, respectivamente, limites de quantificação de 1,25 e 0,99µg/mL para ambos os enantiômeros da CPA empregando a cromatografia líquida com detecção UV. Williams et al. (1999) quantificaram os enantiômeros da CPA em plasma através de CG-MS e relataram limites de quantificação de 0,2µg/mL para ambos os enantiômeros. Sadagopan et al. (2001), De

Jonge et al. (2004) e Ekhardt et al. (2007) reportam limites de quantificação para a mistura enantiomérica da CPA empregando LC-MS/MS de 200ng/mL, 200ng/mL e 3,1ng/mL, respectivamente.

Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que o método é preciso e exato. Os coeficientes de variação e os erros relativos obtidos são inferiores a 10% em todas as concentrações analisadas. Os enantiômeros da CPA são estáveis em plasma mantido a 25°C durante 4h e os extratos de plasma podem ser mantidos no autoinjeter a 16°C até 12h (Tabela 7). O efeito da matriz (plasma) sob a ionização (indução ou supressão) da CPA e do PI pode ser considerado ausente (Tabela 8).

Os parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros da CPA em plasma humano empregando coluna quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS são compatíveis com a aplicação em estudo clínico de disposição cinética. O limite de quantificação de 2,5ng/mL para cada enantiômero da CPA permitiu a análise de amostras de plasma coletadas até 24h após a administração de 1g de CPA racêmica a pacientes portadores de nefrite lúpica (Figuras 5 e 6).

O presente estudo investiga a farmacocinética dos enantiômeros da CPA em pacientes portadores de nefrite lúpica. Foram incluídos pacientes com glomerulonefrite comprovada através de biópsia ou exame clínico laboratorial, apresentando *clearance* da creatinina variando entre 42,8 a 144,6mL/min/1,73 m² e com indicação do uso de pulso endovenoso de CPA (Tabelas 2, 3, 4, e 5). Os pacientes foram tratados com 0,75-1,30g de CPA racêmica.

Inicialmente os pacientes seriam divididos em grupos, de acordo com a classificação de doença renal crônica estabelecida pelo estudo *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)* da *National Kidney Foundation* - EUA (USA NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002) (Tabela 12). No entanto, considerando o número limitado de pacientes atendidos na Instituição durante o período do estudo que preenchiam os critérios de inclusão do presente protocolo, como por exemplo, parâmetros bioquímicos dentro do valor da normalidade, a não utilização de fármacos anticonvulsivantes ou contraceptivos orais, dentre outros, os pacientes incluídos na presente investigação com valores de *clearance* da creatinina entre 30 e 89 mL/min/1,73m² foram alocados no Grupo 2, considerando os estágios 2 e 3 de

classificação da doença renal crônica, enquanto os pacientes com valores de *clearance* da creatinina maior que 90mL/min/1,73m² foram alocados no Grupo 1, considerando o estágio 1 de classificação da doença renal crônica (Tabela 12).

Tabela 12. Critérios de classificação da doença renal crônica estabelecida pelo estudo K/DOQI (USA NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

Estágio	Descrição	clearance da creatinina (mL/min/1,73m ²)
1	Presença de lesão renal associada a taxa de filtração glomerular normal ou elevada	>90
2	Presença de lesão renal associada a taxa de filtração glomerular levemente reduzida	60-89
3	Presença de lesão renal associada a taxa de filtração glomerular reduzida	30-59
4	Presença de lesão renal associada a taxa de filtração glomerular muito reduzida	15-29
5	Falência renal comprovada	<15 ou em tratamento dialítico

A enantiosseletividade na farmacocinética da CPA foi avaliada somente em pacientes com câncer. Os dados ainda são contraditórios com observações de ausência de enantiosseletividade na farmacocinética, favorecimento da excreção renal para o enantiômero (S)-(-)-CPA ou ainda favorecimento no *clearance* de formação do metabólito (R)-(+)-descloroetil CPA (COX et al., 1976; CORLETT; CHRYSTYN, 1996; JARMAN et al., 1979; WILLIAMS et al., 1999).

Dentre os 18 pacientes avaliados no presente estudo, os pacientes 1, 9, 14 e 17 (Tabelas 2 e 4) apresentam valores das enzimas hepáticas acima dos limites da normalidade. No entanto, os valores de área sob a curva concentração plasmática versus tempo de ambos os enantiômeros da CPA observados nestes pacientes estão dentro da faixa de variação observada para os demais pacientes investigados (Tabelas I, II, III e IV Apêndice).

Os pacientes portadores de nefrite lúpica investigados (Tabelas 3 e 5) foram tratados concomitantemente com outros fármacos que não puderam ser retirados durante o período da investigação. A ondansetrona, administrada a todos os pacientes portadores de nefrite lúpica investigados com exceção do paciente 1 (Tabela 3), é considerada um fármaco indutor do metabolismo da CPA com relatos de redução da área sob a curva concentração plasmática versus tempo da CPA, em aproximadamente 17%, em pacientes portadores de câncer de mama (GILBERT et al., 1998). Os glucocorticóides (metilprednisolona, prednisona, prednisolona) são considerados indutores do CYP, da glicoproteína P e das glucuronosiltransferases (CZOCK et al., 2005). Faber, Mouridsen e Skovsted (1974) relatam aumento da velocidade de eliminação da CPA e aumento da concentração de seus metabólitos no plasma de pacientes tratados com prednisona durante 12 dias. No entanto, a administração concomitante de prednisolona endovenosa promoveu inibição da eliminação da CPA. Os autores sugeriram a ocorrência de inibição do metabolismo da CPA devido a competição pelas enzimas responsáveis por sua metabolização.

A Figura 5 apresenta o perfil farmacocinético dos enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+)-CPA para os pacientes do Grupo 1. Pode-se observar que, mesmo com a presença de medicações associadas distintas (Tabela 3) existe uma baixa variação inter paciente nos parâmetros farmacocinéticos, sendo observados coeficientes de variação de 31% e 27% para os valores de área sob a curva concentração plasmática vs tempo da (S)-(-)-CPA e da (R)-(+)-CPA, respectivamente. A Figura 6 apresenta o perfil farmacocinético da (S)-(-) e da (R)-(+)-CPA para os pacientes do Grupo 2. Foram observados coeficientes de variação de 25% e 35% para os valores de área sob a curva concentração plasmática vs tempo da (S)-(-)-CPA e da (R)-(+)-CPA, mesmo com a presença de medicações associadas (Tabela 5).

A farmacocinética da CPA é enantiosseletiva em pacientes portadores de nefrite lúpica com observação de maiores valores de área sob a curva concentração plasmática versus tempo para o enantiômero (S)-(-)-CPA (152,41 vs 129,25µg.h/mL para os pacientes do Grupo 1 e 167,20 vs 139,08µg.h/mL para os pacientes do Grupo 2) (Tabela 9).

Os dados apresentados na Figura 7 mostram que as razões enantioméricas de concentrações plasmáticas (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA aumentam em função do tempo, com observações de valores próximos a unidade logo após o início da infusão até valores próximos a 1,5 observados 24h após o início da infusão para o Grupo 1. Já para o Grupo 2, os dados apresentados na Figura 8 mostram que as razões enantioméricas de concentrações plasmáticas (S)-(-)-CPA/(R)-(+)-CPA também aumentam em função do tempo, com valores próximos a 2,5 observados 24h após o início da infusão. Os dados apresentados sugerem que o enantiômero (R)-(+)-CPA seja o preferencialmente metabolizado nos pacientes investigados, tanto para o Grupo 1 quanto para o Grupo 2.

Para os pacientes do Grupo 1 os volumes de distribuição dos enantiômeros da CPA apresentaram diferenças com significância estatística entre si (Tabela 9; 0,51 vs 0,48L/kg, respectivamente para os enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA). Para o Grupo 2 não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os volumes de distribuição dos enantiômeros (Tabela 9; 0,47 vs 0,50L/kg respectivamente para os enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA). A ausência de enantiosseletividade no volume de distribuição da CPA é um dado esperado em função da baixa ligação da CPA, como mistura enantiomérica, às proteínas plasmáticas (valores próximos a 13%; BAGLEY; BOSTICK; DeVITA, 1973). Corlett e Chrystyn (1996) relataram volumes de distribuição de 0,43 e 0,45L/kg, respectivamente para os enantiômeros (R)-(+)-CPA e (S)-(-)-CPA, em seis pacientes com doença não descrita. Jarman et al. (1979) reportam maiores valores de volumes de distribuição (50,6 e 49,6L, respectivamente para os enantiômeros (R)-(+)-CPA e (S)-(-)-CPA) em 04 pacientes com carcinoma de pulmão quando comparados aos dados obtidos na presente investigação (Tabela 9).

Na presente investigação, o *clearance* do enantiômero (R)-(+)-CPA foi significativamente maior do que o do (S)-(-)-CPA para ambos os grupos (Tabela 9; 3,89L/h para a (S)-(-)-CPA nos pacientes do Grupo 1 e 3,59L/h para a (S)-(-)-CPA nos pacientes do Grupo 2 vs 3,28 para o (R)-(+)-CPA nos pacientes do Grupo 1 e 2,99L/h para a (R)-(+)-CPA nos pacientes do Grupo 2). Os valores de *clearance* total relatados por Williams et al. (1999) em pacientes portadores de câncer e por Corlett e Chrystyn (1996) em pacientes com doença não descrita não mostram enantiosseletividade. Os referidos autores reportaram valores, respectivamente, de 6,9L/h e 0,049L/h.kg para o

(R)-(+)-CPA e 7,2L/h e 0,048L/h.kg para o (S)-(-)-CPA. Os maiores valores de *clearance* total reportados por Williams et al. (1999) para ambos os enantiômeros da CPA (6,9 e 7,2 L/h) podem ser explicados em função da inclusão de crianças e adolescentes além dos pacientes adultos.

A meia-vida de eliminação, um parâmetro dependente do volume de distribuição e do *clearance*, também mostrou enantiosseletividade para ambos os grupos investigados; Tabela 9. A meia-vida de eliminação foi mais prolongada para o enantiômero (S)-(-)-CPA, 6,79h (Grupo 1) e 6,15h (Grupo 2) quando comparada ao enantiômero (R)-(+)-CPA 5,56h (Grupo 1) e 4,99h (Grupo2), como consequência do menor *clearance* total. Williams et al. (1999) relatam meias-vidas de eliminação de 5,8 e 5,7h, respectivamente, para os enantiômeros (R)-(+)-CPA e (S)-(-)-CPA em pacientes portadores de câncer tratados com infusão de CPA racêmica. Corlett e Chrystyn (1996) relataram valores semelhantes de 6,82 e 7,13h, respectivamente, para os enantiômeros (R)-(+)-CPA e (S)-(-)-CPA. Jarman et al. (1979) relataram meias-vidas de eliminação de 7,25 e 7,90h, respectivamente, para os enantiômeros (R)-(+)-CPA e (S)-(-)-CPA em pacientes com câncer de pulmão.

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que não há diferença com significância estatística entre os grupos 1 e 2 para os parâmetros farmacocinéticos de ambos os enantiômeros da CPA, inferindo que os estágios II e III da doença renal crônica (grupo 2), quando comparados ao estágio I (grupo 1), não modificam a farmacocinética de ambos os enantiômeros da CPA. Os dados sugerem que ajustes de dose da CPA não são necessários para pacientes portadores de nefrite lúpica nos estágios II ou III da doença renal crônica. No entanto, Haubitz et al. (2002) reportaram que o *clearance* da CPA como mistura enantiomérica depende da função renal, com relatos de valores de 4,7L/h para pacientes com função renal normal, 3,42L/h para pacientes com *clearance* da creatinina de 25-50mL/min e 2,82L/h para pacientes com *clearance* da creatinina de 10-24mL/min. No entanto, pacientes com função renal normal e câncer de mama, mas sem doença autoimune, foram referenciados como grupo controle no estudo publicado por Haubitz et al. (2002). Juma et al. (1981) observaram valores de *clearance* de 48,8mL/h.kg para a mistura enantiomérica da CPA em pacientes apresentando *clearances* de creatinina entre 18 e 51 mL/min.

Várias enzimas CYP estão envolvidas nas reações de bioativação (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4) e desintoxicação (CYP3A) da CPA (DE JONGE et al., 2005). Embora o CYP3A não seja quantitativamente a principal enzima envolvida no metabolismo da CPA, ela apresenta grande variabilidade interindividual em sua atividade em função de fatores genéticos e não genéticos tais como fatores hormonais e ambientais, entre outros (WOJNOWSKI; KAMDEM, 2006). A atividade *in vivo* do CYP3A avaliada em 18 pacientes, expressa na forma de *clearance* do midazolam administrado via endovenosa na forma de bolus, está apresentada na Tabela 10. Foi observada uma variação de aproximadamente 5 vezes nos valores do *clearance* de midazolam nos pacientes avaliados (2,92-16,40 ml/min.kg; Tabela 10). Os valores de *clearance* de midazolam para os pacientes portadores de nefrite lúpica estão de acordo com outros estudos que empregaram o midazolam i.v. como fármaco marcador da atividade do CYP3A. Chen et al. (2006) reportam valores de *clearance* de midazolam i.v. variando de 5,8-11,5 ml/min.kg em 37 mulheres e de 5,5 a 9,5 ml/min.kg em 29 homens. Os mesmos valores foram reportados por Kharasch et al. (2007) na investigação de 99 voluntários sadios ($7,6 \pm 2,2$ ml/min.kg, média e desvio padrão). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no *clearance* do midazolam entre os pacientes dos Grupos 1 e 2.

Apesar do midazolam administrado via endovenosa ser amplamente utilizado como fármaco marcador da atividade do CYP3A hepático, Rogers et al. (2003) recomendam cautela na interpretação dos dados, em função de duas características do MDZ: a) a razão de extração hepática (E), sendo $E = 0,55$ e b) a porcentagem de ligação à albumina, $>95\%$. Considerando o midazolam como um fármaco de E intermediário, (baixo E: $E < 0,3$; alto E: $E > 0,7$), o seu *clearance* depende da ligação às proteínas plasmáticas e do fluxo sanguíneo hepático. Portanto, para se avaliar a atividade do CYP3A através do *clearance* do midazolam administrado via endovenosa, Rogers et al. (2003) recomendaram a determinação da ligação do midazolam às proteínas plasmáticas na população estudada e a padronização do protocolo de colheita das amostras de forma a manter o débito cardíaco constante.

Aproximadamente a metade dos pacientes avaliados nesse estudo (pacientes 1, 3, 5, 8, 9, 11, 14 e 15) apresenta concentrações de albumina plasmática abaixo dos

valores de referência (Tabelas 2 e 4). Além disso, podem estar associados na terapia fármacos com alta ligação à albumina. Apesar da proximidade dos valores de *clearance* do midazolam observados neste estudo em relação aos estudos da literatura, o *clearance* do midazolam neste estudo pode não estar refletindo a atividade do CYP3A hepático e sim a alteração da fração livre do midazolam.

A Tabela 11 apresenta as equações de regressão ortogonal e seus respectivos coeficientes de correlação r entre os *clearances* da (S)-(-)-CPA e do midazolam ($r=0,2467$) e entre os *clearances* da (R)-(+)-CPA e do midazolam ($r=0,0465$). Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre o *clearance* do midazolam e os *clearances* dos enantiômeros da CPA, sendo os pacientes avaliados dentro de cada grupo ou em conjunto, sugerindo que o fenótipo do CYP3A não contribui na individualização da dose de CPA.

Concluindo, a farmacocinética da CPA é enantiosseletiva com observação de acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-CPA em pacientes portadores de nefrite lúpica classificados como pertencentes aos estágios I ou II e III da doença renal crônica. No entanto, a relevância clínica do acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-CPA no tratamento da nefrite lúpica ainda necessita ser estabelecida.

6. CONCLUSÕES

- 1- O método de análise dos enantiômeros da CPA em plasma empregando coluna quiral e LC-MS/MS apresenta limite de quantificação de 2,5ng de cada enantiômero/mL, linearidade de 2,5ng/mL-25µg de cada enantiômero/mL, precisão intra e inter-ensaios com coeficientes de variação menores que 5% e exatidão intra e inter-ensaios com porcentagens de desvio inferiores a 10%. O método permitiu a quantificação dos enantiômeros da CPA até 24h após a administração de dose única endovenosa de aproximadamente 1 g de CPA racêmica a pacientes portadores de nefrite lúpica.
- 2- A farmacocinética da CPA é enantiosseletiva com observação de maiores concentrações plasmáticas para o enantiômero (S)-(-)-CPA, referido como o de maior índice terapêutico, em pacientes portadores de nefrite lúpica apresentando *clearance* de creatinina entre 144 e 42mL/min/1,73m².
- 3- Não foram observadas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos para ambos os enantiômeros da CPA entre os pacientes portadores de nefrite lúpica com *clearance* de creatinina >90mL/min (Grupo 1) e *clearance* de creatinina entre 40 e 89mL/min (Grupo 2).
- 4- Não foram observadas correlações significativas entre o *clearance* do midazolam e o *clearance* de cada enantiômero da CPA nos pacientes portadores de nefrite lúpica com *clearance* de creatinina entre 144 e 42mL/min/1,73m².

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. No ar desde 2003. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=#>>. Acesso em 15 abril 2006.

AITKEN, A.E.; RICHARDSON, T.A.; MORGAN, E.T. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 46, p. 123-149, 2006.

ASHINO, T.; ARIMA, Y.; SHIODA, S.; IWAKURA, Y.; NUMAZAWA, S.; YOSHIDA, T. Effect of interleukin-6 on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expressions in arthritic mouse liver. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 558, p. 199-207, 2007.

BAGLEY, C.M.; BOSTICK, F.; DeVITA, V.T. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. **Cancer Research**, Chicago, v. 33, p. 226-233, 1973.

BARBIERI, A.; SABATINI, L.; INDIVERI, P.; BONFIGLIOLI, R.; LODI, V.; VIOLANTE, F.S. Simultaneous determination of low levels of methotrexate and cyclophosphamide in human urine by micro liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 20, p. 1889-1893, 2006.

BAUMANN, F.; LORENZ, C.; JAEHDE, U.; PREISS, R. Determination of cyclophosphamide and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 729, 1-2, p. 297-305, 1999.

BOHNENSTENGEL, F.; HOFMANN, U.; EICHELBAUM, M.; KROEMER, H.K.. Characterization of the cytochrome P450 involve in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin v. 51, 3-4, p. 297-301, 1996.

BORCHERS, A.T.; NAGUWA, S.M.; SHOENFELD, Y.; GERSHWIN, M.E. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, epub ahead of print, 2010.

BRAMWELL, V.; CALVERT, R.T.; EDWARDS, G.; SCARFFE, H.; CROWTHER, D. The disposition of cyclophosphamide in a group of myeloma patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 3, 4, p. 253-259, 1979.

BUSSE, D.; BUSCH, F.W.; BOHNENSTENGEL, F.; EICHEILBAUM, M.; FISCHER, P.; OPALINSKA, J.; SCHUMACHER, K.; SCHWEIZER, E.; KROEMER, H. K. Dose Escalation of Cyclophosphamide in Patients with Breast Cancer: Consequences for Pharmacokinetics and Metabolism. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 15, 5, p. 1885-1896, 1997.

CHEN, M.; MA, L.; DRUSANO, G.L.; BERTINO JUNIOR, J.S.; NAFZIGER, A.N. Sex differences in CYP3A activity using intravenous and oral midazolam. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 80, p. 531-538, 2006.

CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R.J. **Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease**. New York, Tokyo: Igaku-Shoin, 1995, p. 151-156.

CORLETT, S.A.; CHRYSTYN, H. High-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of cyclophosphamide in serum. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 682, 2, p. 337-342, 1996.

COX, P.J.; FARMER, P. B.; JARMAN, M.; JONES, M. Observations on the differential metabolism and biological activity of the optical isomers of cyclophosphamide. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 25, 8, p. 993-996, 1976.

CZOCK, D.; KELLER, F.; RASCHE, F.M.; HAUSSLER, U. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v.44, 1, p. 61-98, 2005.

DE JONGE, M. E.; HUITEMA, A.D.R.; RODENHUIS, S.; BEIJNEN, J.H. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 44, 11, p. 1135-1164, 2005.

DE JONGE, M. E.; VAN DAM, S.M.; HILLEBRAND, M.J.X.; ROSING, H.; HUIITEMA, A.D.R.; RODENHUIS, S.; BEIJNEN, J.H. Simultaneous quantification of cyclophosphamide, 4-hydroxycyclophosphamide, *N, N', N''*-triethylenethiophosphoramidate (thiotepa) and *N, N', N''*-triethylenephosphoramidate (tepa) in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 39, 3, p. 262-271, 2004.

DiFRANCESCO, R.; GRIGGS, J.J.; DONNELLY, J.; DiCENZO, R. Simultaneous analysis of cyclophosphamide, doxorubicin and doxorubicinol by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 852, p. 545-553, 2007.

DREISBACH, A.W.; LERTORA, J.J.L. The Effect of Chronic Renal Failure on Drug Metabolism and Transport. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, London, v. 4(8), p. 1065-1074, 2008.

EKHART, C.; GREBETENSAE, A.; ROSING, H.; RODENHUIS, S.; BEIJNEN, J.H.; HUIITEMA, A.D.R. Simultaneous quantification of cyclophosphamide and its active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 854, p. 345-349, 2007.

FABER, O. K.; MOURIDSEN, H. T.; SKOVSTED, L. The biotransformation of cyclophosphamide in man: influence of prednisone. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, Copenhagen, v. 35, 3, p. 195-200, 1974.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts & Applications**. 3rd ed. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 2000. 924p.

GILBERT, C.J.; PETROS, W.P.; VREDENBURG, J.; HUSSEIN, A.; ROSS, M.; RUBIN, P.; FEHDRAU, R.; CAVANAUGH, C.; BERRY, D.; McKINSTRY, C.; PETERS, W.P. Pharmacokinetic interaction between ondansetron and cyclophosphamide during high-dose chemotherapy for breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 42, 6, p. 497-503, 1998.

HAUBITZ, M.; BOHNENSTENGEL, F.; BRUNKHORST, R.; SCHWAB, M.; HOFMANN, U8.; BUSSE, D. Cyclophosphamide pharmacokinetics and dose requirements in patients with renal insufficiency. **Kidney International**, New York, v. 61, 4, p. 1495-1501, 2002.

HEDMER, M.; JONSSON, B.A.; NYGREN, O. Development and validation of methods for environmental monitoring of cyclophosphamide in workplaces. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 12, p. 979-984, 2004.

HOCHBERG, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 40, 9, p. 1725, 1997.

HOLM, K.A.; KINDBERG, C. G.; STOBAUGH, J. F.; SLAVIK, M.; RILEY, C. M. Stereoselective pharmacokinetics and metabolism of the enantiomers of cyclophosphamide. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 39, 8, p. 1375-1384, 1990.

HUANG, Z.; ROY, P.; WAXMAN, D. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing n-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 59, 8, p. 961-972, 2000.

JABOR, V.A.; COELHO, E.B.; SANTOS, N.A.G.; BONATO, P.S.; LANCHOTE, V.L. A highly sensitive LC-MS-MS assay for analysis of midazolam and its major metabolite in human plasma: Applications to drug metabolism. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 822, 1-2, p. 27-32, 2005.

JAMALI, F.; MEHVAR, R.; PASSUTO, F.M. Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutics pitfalls. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 78, 9, p. 695-715, 1989.

JARMAN, M.; MILSTED, R.; SMYTH, J.F.; KINAS, R.W.; PANKIEWICZ, K.; STEC, W.J. Comparative metabolism of 2-[Bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-oxide (cyclophosphamide) and its enantiomers in humans. **Cancer Research**, Chicago, v. 39, p. 2762-2767, 1979.

JUMA, F.D.; ROGERS, H.J.; TROUNCE, J.R. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and some of its metabolites. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 19, 6, p. 443-451, 1981.

KALHORN, T.F.; REN, S.; HOWALD, W.N.; LAWRENCE, R.F.; SLATTERY, J.T. Analysis of cyclophosphamide and five metabolites from human plasma using liquid

chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-nitrogen-phosphorous detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 732, p. 287-298, 1999.

KHARASH, E.D.; WALKER, A.; ISOHERRANEN, N.; HOFFER, C.; SHEFFELS, P.; THUMMEL, K.E.; WHITTINGTON, D.; ENSIGN, D. Influence of CYP3A5 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytochrome P4503A probes alfentanil and midazolam. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis. v. 82, 4, p. 410-426, 2007.

KASEL, D.; JETTER, A.; HARLFINGER, S.; GEBHARDT, W.; FUHR, U. Quantification of cyclophosphamide and its metabolites in urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 18, p. 1472-1478, 2004.

KLEIROK, Z.; CHMIELEWSKA, B.; CZUCZWAR, J.S.; KOZICKA, M.; RAJTAR, G.; JARZABEK, G.; SAWINIEC, Z. Comparison of pharmacological properties of cyclophosphamide and its enantiomers. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Basel, v. 34 (3), p. 263-273, 1986.

KROEMER, H.K.; FROMM, M.F.; EICHELBAUM, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action: effects of enzyme inhibition and induction. **Therapeutic Drug Monitoring**, Hagerstown, v. 18, 4, p. 388-392, 1996.

KUSNIERCZYK, H.; RADZIKOWSKI, C.; PAPROCKA, M.; BUDZYNSKI, W.; RAK, J.; KINAS, R.; MISIURA, K.; STEC, W. Antitumor activity of optical isomers of cyclophosphamide, ifosfamide and trofosfamide as compared to clinically used racemates. **Journal of Immunopharmacology**, New York, v. 8(4), p. 455-480, 1986.

LIU, J.J.; KESTELL, P.; FINDLAY, M.; RILEY, G.; ACKLAND, S.; SIMPSON, A.; ISAACS, R.; McKEAGE, M.J. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to monitoring plasma cyclophosphamide levels in phase I trial cancer patients. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 31, 10, p. 677-682, 2004.

MASUREL, D.; WAINER, I.W. Analytical and preparative high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of ifosfamide, cyclophosphamide and trofosfamide and their determination in plasma. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 490, 1, p. 133-143, 1989.

MAVRAGANI, C. P.; MOUTSOPOULOS, H.M. Lupus nephritis: current issues. **Annals of Rheumatic Diseases**, London, v. 62, 9, p. 795- 798, 2003.

MORGAN, E.T. Impact of infectious disease an inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 85(4), p. 434-438, 2009.

MOURIDSEN, H.T.; JACOBSEN, E. Pharmacokinetics of cyclophosphamide in renal failure. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, Copenhagen, v. 36, suppl. 5, p. 409-414, 1975.

NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, London, v. 6, 1, p. 1-42, 1996.

NTALI, S.; BERTSIAS, G.; BOUMPAS, D.T. Cyclophosphamide and lupus nephritis; when, how, for how long? **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, Totowa, epub ahead of print, 2010.

PAPROCKA, M.; KUSNIERCZYK, H.; BUDDZYNSKI, W.; RAK, J.; RADZIKOWSKI, C. Comparative studies on biological activity of /+/R and /-/S enantiomers of cyclophosphamide and ifosfamide. I. Antitumour affect of cyclophosphamide and ifosfamide enantiomers. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Basel, v. 34 (3), p.275-284, 1986.

PAPROCKA, M.; RADZIKOWSKI, C. Comparative studies on biological activity of /+/R and /-/S enantiomers of cyclophosphamide and ifosfamide. II. Antiproliferative activity of cyclophosphamide and ifosfamide enantiomers. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Basel, v. 34 (3), p. 285- 291, 1986.

REID, J.; STOBAUGH, J.F.; STERNSON, L.A. Liquid chromatographic determination of cyclophosphamide enantiomers in plasma by precolumn chiral derivatization. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 61, 5, p. 441-446, 1989.

RENTON, K.W. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, Amsterdam, v. 92, p. 147-163, 2001.

ROGERS, J.F.; ROCCI JUNIOR, M.L.; HAUGHEY, D.B.; BERTINO JUNIOR, J.F. An evaluation of the suitability of intravenous midazolamas an in vivo marker for cytochrome P4503a activity. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 73, p. 153-158, 2003.

SABATINI, L.; BARBIERI, A.; TOSI, M.; VIOLANTE, F.S. A new high-performance liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 40, p. 669-674, 2005.

SADAGOPAN, N.; COHEN, L.; ROBERTS, B.; COLLARD, W.; OMER, C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric quantitation of cyclophosphamide and its hydroxyl metabolite in plasma and tissue for determination of tissue distribution. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 759, 2, p. 277-284, 2001.

SCHELLENS, J.H.M.; VAN DER WART, J.H.F.; DANHOF, M.; VAN DER VELDE, E.A.; BREIMER, D.D. Relationship between the metabolism of antipyrine, hexobarbitone and theophylline in man as assessed by a 'cocktail' approach. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 26, p. 373-384, 1988.

SENNA, E.R.; DE BARROS, A.L.; SILVA, E.O.; COSTA, I.F.; PEREIRA, L.V.; CICONELLI, R.M.; FERRAZ, M.B. Prevalence of rheumatic disease in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 31, 3, p. 594-597, 2004.

SOTTANI, C.; TRANFO, G.; FARANDA, P.; MINOIA, C. Highly sensitive high-performance liquid chromatography/selective reaction monitoring mass spectrometry method for the determination of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of health care workers exposed to antineoplastic agents. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 19, p. 2794-2800, 2005.

STREETMAN, D.S.; JR. BERTINO, J.S.; NAFZIGER; A.N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. **Pharmacogenetics**, London, v. 10, 3, p. 187-216, 2000.

TAN, E. M.; COHEN, A.S.; FRIES, J.F.; MASI, A.T.; McSHANE, D.J.; ROTHFIELD, N.F.; SCHALLER, J.G.; TALAL,N.; WINCHESTER, R.J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 25, 11, p. 1271-1277, 1982.

TATEISHI, T.; WATANABE, M.; NAKURA, H.; ASOH, M.; SHIRAI, H.; MIZOROGI, Y.; KOBAYASHI, S.; THUMMEL, K.; WILKINSON, G.R. CYP3A activity in european american and japanese men using midazolam as an in vivo probe. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v.69, 5, p.333-339, 2001.

THERON, H.B.; VAN DER MERWE, M.J.; SWART, K.J.; VAN DER WESTHUIZEN, J.H. Employing atmospheric pressure photoionization in liquid chromatography/tandem mass spectrometry to minimize ion suppression and matrix effects for the quantification of venlafaxine and O-desmethylenlafaxine. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 21, 10, p. 1680-1686, 2007.

USA NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **NKF K/DOQI GUIDELINES: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification**. No ar desde 2002. Disponível em <http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/p4_class_g1.htm>. Acesso em 07 jan. 2008.

VILAR, M.J.; SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, Hampshire, v. 11, 8, p. 528-532, 2002.

WILLIAMS, M.L.; WAINER, I.W.; GRANVIL, C.P.; GEHRCKE, B.; BERNSTEIN, M.L.; DUCHARME, M. Pharmacokinetics of (R) - and (S) - cyclophosphamide and their dechloroethylated metabolites in cancer patients. **Chirality**, New York, v. 11, 4, p. 301-308, 1999.

WOJNOWSKI, L.; KAMDEM, LK. Clinical implications of CYP3A polymorphisms. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, London, v. 2(2), p. 171-182, 2006.

APÊNDICE

As Tabelas I e II apresentam os parâmetros farmacocinéticos individuais referentes aos enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA, respectivamente (n=10), para os pacientes do Grupo 1. As Tabelas III e IV apresentam os parâmetros farmacocinéticos individuais referentes aos enantiômeros (S)-(-)-CPA e (R)-(+)-CPA, respectivamente (n=8), para os pacientes do Grupo 2. As Figuras I e II apresentam os perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas nos pacientes do Grupo 1. As Figuras III e IV apresentam os perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (R)-(+)-CPA observadas nos pacientes do Grupo 1. As Figuras V e VI apresentam os perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas nos pacientes do Grupo 2. As Figuras VII e VIII apresentam os perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (R)-(+)-CPA observadas nos pacientes do Grupo 2.

Tabela I. Parâmetros farmacocinéticos referentes ao enantiômero (S)-(-)-CPA nos pacientes do Grupo 1. Dados individuais (n=10).

Paciente	Parâmetros farmacocinéticos				
	Vd	Kel	AUC	t _{1/2}	Cl
	(L)	(1/h)	(h*ug/mL) *	(h)	(L/h)
(1)	33,69	0,09	155,33	7,25	3,22
(5)	46,28	0,11	101,3	6,5	4,93
(6)	47,37	0,08	127,85	8,4	3,91
(7)	29,08	0,11	157,24	6,34	3,18
(9)	39,77	0,09	132,21	7,29	3,78
(12)	36,24	0,09	150,44	7,56	3,32
(13)	26,29	0,12	154,37	5,63	3,24
(15)	26,34	0,1	194,07	7,09	2,58
(16)	20,01	0,18	140,93	3,91	3,55
(17)	23,34	0,11	188,49	6,1	2,65

* Valor de AUC corrigido em função de dose de 1g de rac-CPA.

Tabela II. Parâmetros farmacocinéticos referentes ao enantiômero (R)-(+)-CPA nos pacientes do Grupo 1. Dados individuais (n=10).

Paciente	Parâmetros farmacocinéticos				
	Vd (L)	Kel (1/h)	AUC (h*ug/mL)*	t _{1/2} (h)	Cl (L/h)
(1)	31,44	0,11	141,66	6,17	3,53
(5)	44,19	0,15	75,88	4,65	6,59
(6)	46,75	0,09	117,35	7,61	4,26
(7)	28,04	0,13	138,56	5,38	3,61
(9)	37,90	0,12	109,45	5,75	4,57
(12)	36,24	0,09	144,68	7,05	3,46
(13)	26,29	0,12	119,93	4,25	4,17
(15)	26,34	0,1	179,68	6,55	2,78
(16)	20,01	0,18	108,54	2,78	4,61
(17)	23,34	0,11	147,50	4,50	3,39

* Valor de AUC corrigido em função de dose de 1g de rac-CPA.

Tabela III. Parâmetros farmacocinéticos referentes ao enantiômero (S)-(-)-CPA nos pacientes do Grupo 2. Dados individuais (n=8).

Paciente	Parâmetros farmacocinéticos				
	Vd	Kel	AUC	t _{1/2}	Cl
	(L)	(1/h)	(h*ug/mL) *	(h)	(L/h)
(2)	24,89	0,16	122,99	4,24	4,06
(3)	28,98	0,11	150,89	6,06	3,31
(4)	25,01	0,11	180,87	6,27	2,76
(8)	29,46	0,08	201,92	8,25	2,48
(10)	25,19	0,12	159,68	5,58	3,13
(11)	21,53	0,12	184,83	5,51	2,70
(14)	30,09	0,09	174,72	7,29	2,86
(18)	29,56	0,11	152,56	6,25	3,28

* Valor de AUC corrigido em função de dose de 1g de rac-CPA.

Tabela IV. Parâmetros farmacocinéticos referentes ao enantiômero (R)-(+)-CPA nos pacientes do Grupo 2. Dados individuais (n=8).

Paciente	Parâmetros farmacocinéticos				
	Vd (L)	Kel (1/h)	AUC (h*ug/mL)*	t _{1/2} (h)	Cl (L/h)
(2)	24,65	0,24	84,09	2,87	5,95
(3)	69,62	0,11	66,79	6,45	7,49
(4)	26,21	0,13	141,72	5,15	3,53
(8)	29,32	0,1	170,2	6,92	2,94
(10)	25,14	0,14	136,44	4,75	3,66
(11)	19,74	0,17	150,28	4,11	3,33
(14)	30,09	0,09	151,11	6,05	3,31
(18)	29,56	0,11	119,49	4,84	4,18

* Valor de AUC corrigido em função de dose de 1g de rac-CPA.

Figura I. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 1. Dados individuais (pacientes 1, 5, 6, 7, 9 e 12).

Figura II. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 1. Dados individuais (pacientes 13, 15, 16 e 17).

Figura III. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (R)-(+)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 1. Dados individuais (pacientes 1, 5, 6, 7, 9 e 12).

Figura IV. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 800 a 1300mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 1. Dados individuais (pacientes 13, 15, 16 e 17).

Figura V. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 2. Dados individuais (pacientes 2, 3, 4 e 8).

Figura VI. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 2. Dados individuais (pacientes 10, 11, 14 e 18).

Figura VII. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (R)-(+)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 2. Dados individuais (pacientes 2, 3, 4 e 8).

Figura VIII. Perfis farmacocinéticos individuais das concentrações plasmáticas de (S)-(-)-CPA observadas até 24 h após a infusão durante 120 minutos de 750 a 1000mg de CPA racêmica nos pacientes do Grupo 2. Dados individuais (pacientes 10, 11, 14 e 18).

ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: (16) 3602-2228 / Fax: (16) 3633-1144 cep@hcrp.fmrp.usp.br www.hcrp.fmrp.usp.br		Campus Universitário - Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Ribeirão Preto, 10 de maio de 2006

Ofício nº 1296/2006
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5105/2005

Prezada Senhora:

O Comitê de Ética em Pesquisa, recebeu a carta de Vossa Senhoria datada de 24 de abril de 2006 solicitando alteração do título do projeto de pesquisa e inclusão do procedimento de genotipagem dos pacientes para as variantes do CYP450 2C9, 2C19 e 2B6.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 224ª reunião ordinária, realizada no dia 08/05/2006, aprovou a alteração do título para **"INFLUÊNCIA DA FUNÇÃO RENAL NA FARMACOCINÉTICA DOS ENANTIÔMEROS DA CICLOFOSFAMIDA EM PACIENTES PORTADORES DE NEFRITE LÚPICA"** assim como a inclusão do procedimento proposto.

Aproveito a oportunidade para renovar protestos de estima e consideração.

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

Ilustríssima Senhora
CAROLINA DE MIRANDA SILVA
PROFª DRª VERA LÚCIA LANCHOTE (Orientadora)
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP
 Área de Toxicologia
 Em mãos

ANEXO B

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

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

NOME DA PESQUISA: Influência da função renal na farmacocinética dos enantiômeros da ciclofosfamida em pacientes portadores de nefrite lúpica.

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi (FMRP-USP)

Dra. Lucienir Maria da Silva (HCFMRP-USP)

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–USP.

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 implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

“A doença que o Sr (Sr.^a) tem, chamada de Lupus Eritematoso Sistêmico, causa uma inflamação no corpo todo inclusive nas juntas e rins, provocando dor nas juntas e alterando a urina. O remédio usado para melhorar o funcionamento dos rins é a ciclofosfamida. O objetivo deste trabalho é avaliar a ação do remédio nos rins e como ele é armazenado e distribuído no seu organismo. Além disso, alguns doentes podem eliminar a ciclofosfamida mais rapidamente do que outros, interferindo na ação do remédio. Então, analisaremos também em que grupo de pacientes o Sr. (a) está incluído. Inicialmente, o Sr. (Sr.^a) receberá uma injeção da ciclofosfamida, juntamente com um medicamento chamado midazolam. O midazolam será utilizado para entender melhor a eliminação da ciclofosfamida. Necessitamos obter

sangue e urina para medir a quantidade de ciclofosfamida.. Para realizar este estudo o Sr (Sr.ª) precisa ficar internado durante 24 horas. Para colhermos o sangue, o Sr (Sr.ª) será picado uma só vez, sendo mantida uma pequena agulha na sua veia para as retiradas posteriores de sangue, num volume total equivalente a três colheres das de sopa. Pediremos também para o Sr (Sr.ª) colher a sua urina por um período de 24 horas. Os inconvenientes dessa pesquisa são a picada da agulha para colher sangue e a internação durante 1 dia. A sua colaboração permitirá entender como o lupus eritematoso sistêmico afeta o funcionamento de alguns medicamentos, possibilitando no futuro ajustar melhor as doses para obter um melhor tratamento para você e para pacientes com doença semelhante a sua”.

2- Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve a que eu deixe de ser tratado como os demais pacientes na Instituição.

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

4- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.

5- A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.

6- O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:.....

Ribeirão Preto,.....de.....de 200.....

assinatura do paciente ou
de seu responsável

Pesquisador
Responsável

Assinatura do médico que
obteve o consentimento
(carimbo ou nome legível com
CRM)

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1-.....
assinatura identificação

2-.....
assinatura identificação

Pesquisador Responsável: Carolina de Miranda Silva Tel.: (16)6024195, (16)97687622