UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da doença renal crônica e da hemodiálise na farmacodinâmica e farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos

DANIEL VALENTE NEVES

Ribeirão Preto
2013

DANIEL VALENTE NEVES

Influência da doença renal crônica e da hemodiálise na farmacodinâmica e farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2013

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Neves, Daniel Valente
Influência da doença renal crônica e da hemodiálise na farmacodinâmica e farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos. Ribeirão Preto, 2013.
114p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.
Orientadora: Lanchote, Vera Lucia

1. Nebivolol. 2. Doença Renal Crônica. 3. Farmacocinética. 4. Fenótipo
5. CYP2D6

Capa da tese: http://www.paraiba.com.br/2012/12/18/85218-sociedade-medica-quer-cuidado-precoce-para-doenca-renal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Valente Neves
Influência da doença renal crônica e da hemodiálise na farmacodinâmica e farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Daniel Valente Neves

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedico esse trabalho

À meus queridos pais,
José Jamírio Neves (*in memorian*) e Gerva Valente Neves

À minha irmã,
Ana Rita Neves

À minha querida companheira de todas as horas,
Amanda Oliveira

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote**

pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência

e pela confiança durante todo o período do doutorado.

AGRADECIMENTOS

À **Clínica Médica** (médicos, residentes e equipe de enfermagem) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, em especial ao responsável clínico deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fakhreddin Jamali** e à **Dra. Forughalsadat Sanaee** pela colaboração durante meu estágio na *University of Alberta.*

Ao **Prof. Dr. Marcio Dantas**, pela preciosa colaboração como membro da banca de qualificação.

Aos médicos **Paulo Cesar Lopes e Carlos Eduardo Paiva**, pela ajuda na avaliação e internação dos pacientes.

À **Maria Paula Marques** pelos ensinamentos e instruções para a utilização correta dos equipamentos do laboratório de toxicologia.

Ao **Natalino Bocardo** pela amizade e ajuda constante em relação às análises feitas no laboratório.

Às **enfermeiras e auxiliares de enfermagem** da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas e do Serviço de Nefrologia de Ribeirão Preto (SENERP) pela ajuda prestada durante a seleção e colheitas de amostras de pacientes.

Aos amigos do laboratório de farmacocinética e metabolismo: **Adriana Rocha**, **Ana Leonor Godoy, Carolina de Miranda, Carolina Vieira, Daniela Miarelli, Diego Cusinato, Eduardo Tozatto, Estela Schaab, Flávia Silva, Francine Castro, Gabriel Tavares, Gabriela Campos, Glauco Nardoto, Juciane Cardoso, Leonardo Pinto, Marília Oliveira, Natália Valadares, Natalícia Antunes, Otávio Rocha, Roberta Cestari, Rodrigo Ribeiro e Teresa Carvalho,** pelo companheirismo e amizade.

À **CAPES** pela concessão de bolsa de doutorado.

RESUMO

RESUMO

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

A doença renal crônica (DRC) está associada com inibição de sistemas enzimáticos e de transportadores de fármacos. O nebivolol, um β bloqueador de terceira geração, seletivo para receptores β_1 adrenérgicos e com atividade vasodiladora, é metabolizado principalmente por hidroxilação aromática dependente do CYP2D6, hidroxilação alicíclica e por glicuronidação. O estudo avalia a influência da DRC estágios 3 e 4 e da hemodiálise na farmacodinâmica e na farmacocinética dos isômeros do nebivolol. Os pacientes investigados divididos nos Grupos controle (n=12), DRC estágios 3 e 4 (n=12) e Hemodiálise (n=11) receberam dose única p.o. de 10 mg de nebivolol racêmico. As amostras seriadas de sangue foram coletadas até 48h após a administração do fármaco. Em cada tempo de colheita de sangue, a frequência cardíaca foi avaliada na situação de exercício isométrico durante 2 min com o *handgrip*, a 30% da contratilidade voluntária máxima. Todos os pacientes foram fenotipados como metabolizadores rápidos do metoprolol, exceto um paciente do Grupo controle fenotipado como metabolizador lento. Os isômeros do nebivolol foram analisados em plasma como concentração total empregando LC-MS/MS e coluna de fase quiral. O método foi linear no intervalo de concentrações de 25-2500 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados empregando o programa WinNonlin. O teste de Wilcoxon foi empregado para avaliar as razões isoméricas diferentes da unidade ($p<0,05$) e o teste de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar os parâmetros farmacocinéticos entre os três Grupos investigados. A disposição cinética do nebivolol nos pacientes do Grupo controle é enantiosseletiva com acúmulo plasmático (Cmax 1,32 *vs* 0,88 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 8,02 *vs* 4,25 ng.h/mL), menores valores de *clearance* oral aparente (623,58 vs 1176,40 L/h) e menores valores de volume aparente de distribuição (5383,30 e 6397,70 L) para o isômero *l*-nebivolol. Os parâmetros farmacocinéticos do *l*-nebivolol e *d*-nebivolol para os pacientes do Grupo DRC (n=12) permitem inferir, à semelhança do Grupo controle, maiores valores de Cmax e AUC (Cmax 2,40 *vs* 1,67 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 10,20 *vs* 8,37 ng.h/mL) e menores valores de *clearance* oral aparente (491,51 vs 604,58 L/h) e de volume aparente de distribuição (3527,00 e 5232,50 L) para o isômero *l*-nebivolol. Semelhante aos Grupos controle e DRC, o Grupo Hemodiálise também apresenta enantiosseletividade com acúmulo acúmulo plasmático (Cmax 1,35 *vs* 0,78 ng/mL e $AUC^{0-\infty}$ 6,74 *vs* 4,50 ng.h/mL), menores valores de *clearance* oral aparente (742,26 *vs* 1112,10 L/h) e menores valores de volume aparente de distribuição (5704,70 *vs* 9477,10 L) para o isômero *l*-nebivolol. A farmacocinética dos isômeros do nebivolol no paciente investigado do Grupo controle, fenotipado como metabolizador lento, difere dos dados apresentados para os pacientes do Grupo controle (n=11), Grupo DRC (n=12) e Grupo Hemodiálise (n=11), fenotipados como metabolizadores rápidos, com observação de razão isomérica de AUC *l/d* de 4,77 e redução nos valores de *clearance* oral aparente de ambos os isômeros do nebivolol (67,24 *vs* 122,07 L/h, respectivamente para os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol). Concluindo, a DRC estágios 3 e 4 e a Hemodiálise não alteram a farmacocinética de ambos os isômeros do nebivolol, o volume aparente de distribuição de ambos os isômeros do nebivolol não mostra correlação com o peso dos pacientes, assim como os valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros não mostram correlação com o peso ou com os valores de *clearance* da creatinina dos pacientes investigados. No entanto, os valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros do nebivolol mostram correlação significativa com a atividade do CYP2D6 avaliada através da RM_{plasma}

metoprolol/α-hidroximetoprolol. A análise PK-PD foi realizada incluindo os 34 pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos. O modelo Emax inibitório descreveu a análise PK-PD empregando a variação da frequência cardíaca como parâmetro farmacodinâmico em função das concentrações plasmáticas do *d*-nebivolol, resultando em valores de Emax de 15,42 bpm e de EC50 de 2,26 ng/mL, seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.
Palavras-chave: nebivolol, doença renal crônica, farmacocinética, fenótipo, CYP2D6.

ABSTRACT

NEVES, D. V. **Influence of chronic kidney disease and hemodialysis on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of nebivolol isomers in hypertensive patients**. 2013. 114p. Doctoral Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Chronic kidney disease (CKD) is related to inhibition of enzyme systems and drug transporters. Nebivolol, a third generation β-blocker, is a selective β1-adrenoceptor antagonist and has vasodilatory properties. It undergoes aromatic hydroxylation through the CYP2D6, alicyclic hydroxylation and glucuronidation. The study evaluates the influence of CKD stages 3 and 4 and hemodialysis on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of nebivolol isomers. The investigated patients were divided into 3 groups: control group (n = 12), CKD stages 3 and 4 (n = 12) and hemodialysis (n = 11). They received a single oral dose of 10 mg of racemic nebivolol and serial blood samples were collected up to 48h. At each time of blood sampling, heart rate was assessed in the situation of isometric exercise during 2 min with handgrip at 30% of maximal voluntary contractility. All patients were phenotyped as extensive metabolizers (EM) of metoprolol, except one patient in the control group phenotyped as poor metabolizer (PM). The isomers of nebivolol were analyzed in plasma samples by LC-MS/MS using a chiral phase column. The method was linear over the concentration range of 25-2500 pg of each isomer of nebivolol/mL of plasma. Pharmacokinetic parameters were calculated using the WinNonlin program. The Wilcoxon test was used to assess isomeric ratios different from unit ($p < 0.05$) and the Kruskal-Wallis test was used to compare the pharmacokinetic parameters among the 3 groups investigated. The kinetic disposition of nebivolol was stereoselective in control group with plasma accumulation (Cmax 1.32 *vs* 0.88 ng/mL and AUC0 0-∞ 8.02 *vs* 4.25 ng.h/mL), lower values of apparent clearance (623.58 *vs* 1176.40 L/h) and apparent volume of distribution (5383.30 and 6397.70 L) for the *l*-nebivolol isomer. The kinetic disposition of nebivolol was also stereoselective in CKD group (n=12) showing higher Cmax and AUC (Cmax 2.40 *vs* 1.67 ng/mL and AUC0-∞ 10.20 vs 8.37 ng.h/mL) and lower values of apparent clearance (491.51 *vs* 604.08 L/h) and apparent volume of distribution (3527.00 *vs* 5232.50 L) for the *l*-nebivolol isomer. Similarly to CKD and control groups, the Hemodialysis Group showed stereoselectivity with plasma accumulation (Cmax 1.35 *vs* 0.78 ng/mL and AUC0-∞ 6.74 *vs* 4.50 ng.h/mL), lower values of apparent clearance (742.26 *vs* 1112.10 L/h) and apparent volume of distribution (5704.70 *vs* 9477.10 L) for the *l*-nebivolol isomer. The pharmacokinetics of nebivolol isomers in the patient phenotyped as PM differed from the data presented to the patients phenotyped as EM, with observation of isomeric ratios AUC *l*/*d* of 4.77 and reduced values of apparent clearance of both nebivolol isomers (67.24 *vs* 122.07 L/h, respectively for *l*- and *d*-nebivolol). Concluding, CKD stages 3 and 4 and Hemodialysis did not alter the pharmacokinetics of both nebivolol isomers (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$), the apparent volume of distribution of both nebivolol isomers showed no correlation with the weight of the patients, the apparent clearance of both isomers also showed no correlation with the weight or with the creatinine clearance of the investigated patients. However, the values for apparent clearance for both nebivolol isomers showed a significant correlation with the CYP2D6 activity evaluated by the metabolic ratios plasma metoprolol/α-hidroximetoprolol. PK-PD analysis was evaluated including all the investigated patients phenotyped as EM (n=34). The inhibitory Emax model described the PK-PD analysis using heart rate variation as a pharmacodynamic parameter plotted against the plasma concentrations of the isomer *d*-

nebivolol, showing Emax values of 15.42 bpm and EC50 of 2.26 ng/mL, following administration of a single oral dose of 10 mg of racemic nebivolol.
Keywords: nebivolol, chronic kidney disease, pharmacokinetics, phenotype, CYP2D6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do nebivolol e seus principais sítios de metabolismo. 24
Figura 2: Metabolismo do nebivolol no homem. 27
Figura 3: Gráfico do tamanho da amostra em relação ao poder de teste. 33
Figura 4: Modelo efeito Emax inibitório, utilizando o programa WinNonlin na análise PK/PD. 43
Figura 5: Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto do nebivolol. 45
Figura 6: Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto do padrão interno tramadol. 46
Figura 7: Cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma. 47
Figura 8: Cromatograma referente à ordem de eluição dos isômeros do nebivolol. 48
Figura 9: Cromatogramas referente ao teste de racemização dos isômeros do nebivolol. 51
Figura 10: Cromatogramas referentes à análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma. 52
Figura 11: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo controle (n=11) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. 57
Figura 12: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em um paciente do Grupo controle tratado com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico e fenotipado como PM do CYP2D6. 59
Figura 13: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo DRC (n=12) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. 61
Figura 14: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo Hemodiálise tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=11). 63
Figura 15: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* total aparente do isômero *l*-nebivolol e a razão metabólica plasmática do metoprolol/α-hidroximetoprolol (n=34 pacientes fenotipados como EM). 67
Figura 16: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* total aparente do isômero *d*-nebivolol e a razão metabólica plasmática do metoprolol/α-hidroximetoprolol (n=34 pacientes fenotipados como EM). 67
Figura 17 Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* total aparente do isômero *l*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35). 69
Figura 18 Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* total aparente do isômero *d*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35). 69
Figura 19 Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *l*-nebivolol e o *clearance* da creatinina de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35). 70
Figura 20 Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *d*-nebivolol e o *clearance* da creatinina de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35). 70

Figura 21 Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o Vd total aparente do isômero *l*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35). 71
Figura 22 Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o Vd total aparente do isômero *d*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35). 71
Figura 23 Curvas de variação da frequência cardíaca *versus* tempo para os pacientes investigados classificados como EM (n=34). 73
Figura 24 PK-PD (modelo Emax inibitório) do isômero *d*-nebivolol em função da variação da frequência cardíaca no teste de esforço isométrico com o *handgrip* incluindo todos os pacientes investigados classificados como EM (n=34). 73

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1:	Classificação do estágio da DRC de acordo com grau de lesão renal e TFG (K/DOQI, 2004).	21
Tabela 1:	Tempos de retenção (min) do *l*-nebivolol, *d*-nebivolol e tramadol (PI).	48
Tabela 2:	Efeito matriz para o nebivolol e PI em seis diferentes lotes de plasma humano. Os dados estão apresentados como média (n=6).	49
Tabela 3:	Estudo de estabilidade do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.	49
Tabela 4:	Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.	50
Tabela 5:	Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol (n=35).	54
Tabela 6:	Características antropométricas dos pacientes investigados (n=35). Grupo controle (n=12), Grupo DRC (n=12) e Grupo Hemodiálise (n=11).	56
Tabela 7:	Disposição cinética dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo controle (n=11) tratados com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg.	58
Tabela 8:	Disposição cinética dos isômeros do nebivolol no paciente do Grupo controle fenotipado como PM do CYP2D6 (n=1) e tratado com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg.	60
Tabela 9:	Disposição cinética dos isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol em pacientes do Grupo DRC (n=12) tratados com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg.	62
Tabela 10:	Disposição cinética dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11) tratados com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg.	64
Tabela 11:	Farmacocinética do isômero *l*-nebivolol nos pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11), Grupo DRC (n=12) e Grupo controle (n=11) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.	65
Tabela 12:	Farmacocinética do isômero *d*-nebivolol nos pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11), Grupo DRC (n=12) e Grupo controle (n=11) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.	66
Tabela 13:	Parâmetros obtidos na análise PK-PD (modelo Emax inibitório) relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função da variação na frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico com o *handgrip*	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina transaminase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: Aspartato transaminase

BPM: Batidas por minuto

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo P450

EM: metabolizador rápido do CYP2D6

ESI: eletronebulização

γ-GT: gama glutamil transferase

HDL: High Density Lipoproteiuns

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HCFMRP: Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina Ribeirão Preto

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

IC 95%: índice confiança 95%

IMC: índice de massa corporal

LDL: Low Density Lipoproteins

LIQ: limite inferior de quantificação

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

MRM: monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: espectrometria de massas

PA: pressão arterial

PI: padrão interno

PK-PD: farmacocinética-farmacodinâmica

PM: metabolizador lento

RM_{plasma}: razão metabólica plasmática do metoprolol/α-hidroximetoprolol.

TGO: aspartato transaminase

TGP: alanina transaminase

v/v: volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC $^{0-\infty}$: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de 0 até o infinito

Cl: clearance total

Cl/f: *clearance* aparente.

C_{max}: concentração plasmática máxima

t_{max}: tempo para alcançar C_{max}

α: constante de velocidade de absorção

β: constante de velocidade de eliminação rápida

t1/2: meia-vida plasmática

Vd: volume de distribuição

Vd/f: volume aparente de distribuição

®: marca registrada

SUMÁRIO

RESUMO viii
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE QUADRO E TABELAS xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xv
LISTA DE SÍMBOLOS xvi
1 INTRODUÇÃO 20
2 OBJETIVOS 30
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 32
3.1 Casuística 32
3.2 Protocolo clínico 34
3.3 Métodos 35
3.3.1 Análise do metoprolol e o α-hidroximetoprolol em plasma 35
3.3.2 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma 36
3.3.2.1 Soluções padrão e reagentes 36
3.3.2.2 Sistema de detecção MS/MS 37
3.3.2.3 Procedimento de extração 38
3.3.2.4 Determinação do efeito matriz 38
3.3.2.5 Determinação da ordem de eluição dos isômeros do nebivolol 39
3.3.2.6 Teste de racemização 39
3.3.2.7 Validação 39
3.3.2.7.1 Recuperação 39
3.3.2.7.2 Limite de quantificação e linearidade 40
3.3.2.7.3 Precisão e exatidão 40
3.3.2.7.4 Estabilidade 41
3.3.3 Análise farmacocinética 42
3.3.4. Análise farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) 42
3.3.5 Análise estatística 43
4. RESULTADOS 45
4.1 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma 45
4.2 Análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma 51
4.3 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol 53

4.4 Características dos pacientes investigados 55

4.5 Farmacocinética dos isômeros do nebivolol 57

4.6 Correlação entre a atividade *in vivo* do CYP2D6 e a farmacocinética dos isômeros do nebivolol 66

4.7 Correlações entre parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol *versus* peso e *clearance* da creatinina 68

4.8 PK-PD do isômero d-nebivolol em função da variação da frequência cardíaca no teste de esforço isométrico com o handgrip. 72

5. DISCUSSÃO 76

6. CONCLUSÕES 89

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

8. APÊNDICES 99

9. ANEXOS 112

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) representa um grande problema de saúde pública no Brasil devido ao grande número de pacientes mantidos em programa crônico de diálise nos últimos anos. O censo realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia relata um total de 42695 pacientes em diálise no ano 2000 e 91314 pacientes em diálise no ano 2011. Os dados ainda mostram que 90,6% dos pacientes estão em hemodiálise e apenas 9,4% em diálise peritoneal (SESSO et al., 2012). O diagnóstico de base relatado por Sesso et al. (2012) no ano de 2011 dos pacientes em diálise mostra que 35% dos pacientes eram hipertensos e 28% eram diabéticos.

A prevalência de pacientes com DRC estágio 5 no Brasil é de 475 pacientes por milhão de pessoas (pmp) (SESSO et al., 2012), enquanto em outros países da América do Sul, como Chile e Uruguai, a prevalência é de 1000/ppm. A prevalência de pacientes com DRC estágio 5 em países da Europa (Holanda 926/ppm; Portugal 1590/ppm; Espanha 1046/ppm; França 1060/ppm) e da América do Norte (Estados Unidos da América 1870/ppm; Canadá 1144/pmp) é bem mais elevada quando comparada com a do Brasil (U.S. Renal Data System. 2012 USRDS Annual Data Report). A grande diferença na prevalência de pacientes com DRC estágio 5 entre o Brasil e outros países, sugere que a DRC não é adequadamente diagnosticada ou tratada em todo o território brasileiro (LUGON, 2009). Um estudo conduzido no Brasil (BASTOS et al., 2009) para verificar a prevalência dos estágios da DRC revelou que 9,6% dos pacientes investigados eram portadores de DRC, dos quais de acordo com a classificação K/DOQI 2004, 93,6% situavam-se no estágio 3, 3,9% no estágio 4 e 2,6% no estágio 5.

A DRC é definida pela *National Kidney Foundation* de acordo com o critério definido abaixo (K/DOQI, 2004):

1) lesão presente por um período igual ou superior a 3 meses, definida por anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem decréscimo da taxa de filtração glomerular (TFG),

manifestada por marcadores de função renal, incluindo alterações sanguíneas, urinárias e nos exames de imagem ou anormalidades patológicas.

2) TFG < 60 mL/min/1,73 m^2 por um período maior ou igual a 3 meses, com ou sem lesão renal.

O estágio da DRC, de acordo com a classificação proposta pela K/DOQI, deve ser avaliado com base na função renal, independente do diagnóstico da doença renal.

Quadro 1. Classificação do estágio da DRC de acordo com o grau da lesão renal e a TFG (K/DOQI, 2004).

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73 m^2)
1	Lesão renal com TFG normal ou aumentada	≥ 90
2	Lesão renal com leve diminuição da TFG	60-89
3	Lesão renal com moderada diminuição da TFG	30-59
4	Lesão renal com acentuada diminuição da TFG	15-29
5	Falência renal funcional ou em terapia renal substitutiva	< 15

Em pacientes com DRC, a excreção do fármaco e de seus metabólitos pode ser prejudicada, acarretando excessiva acumulação no organismo. Desta forma, os pacientes com DRC podem apresentar efeitos adversos mais pronunciados em relação aos pacientes com função renal normal. A principal alteração farmacocinética na DRC é a redução na excreção renal, com observação de redução do *clearance* renal e acúmulo plasmático principalmente de fármacos com alta fração eliminada na urina sob a forma inalterada. Além disso, pode ocorrer aumento no volume de distribuição dos fármacos hidrofílicos devido à retenção de líquidos e diminuição da concentração plasmática de proteínas, como a albumina que pode estar significativamente reduzida, acarretando modificações nos processos de distribuição e eliminação. Os pacientes com DRC podem apresentar aumento da concentração livre de fármacos devido ao acúmulo de componentes endógenos como uréia, hormônio paratireoidiano, sulfato de indoxila e citocinas (toxinas urêmicas), os quais deslocam o fármaco de seus sítios de ligação com a proteína

plasmática. Além disso, as toxinas urêmicas estão relacionadas com várias comorbidades que contribuem para a morbidade e/ou mortalidade cardiovascular como a insuficiência cardíaca congestiva, os transtornos de coagulação, a hipertensão, a inflamação, a resistência à insulina, as doenças vasculares, entre outras (LAM et al., 1997; VERBEECK; MUSUAMBA, 2009; NEIRYNCK et al., 2013). Os pacientes com DRC também podem apresentar aumento das concentrações plasmáticas da proteína de fase aguda α1-glicoproteína ácida com consequente aumento da ligação de fármacos de caráter básico (LAM et al., 1997; VERBEECK; MUSUAMBA, 2009). O metabolismo de fármacos com *clearance* não renal também pode ser alterado na DRC devido a ocorrência de sub-regulação do CYP2C9 (DREISBACH et al., 2003), CYP3A (DOWLING et al., 2003), CYP2C19, CYP2B6 (DREISBACH, 2009) em consequência do acúmulo de fatores urêmicos, tais como o paratormônio e as citocinas. As reações de acetilação e conjugação com o ácido glicurônico também são reduzidas (SIMARD et al., 2008; DREISBACH, 2009; MOMPER; VENKATARAMANAN; NOLIN; 2010). Dreisbach (2009) relata que a atividade das enzimas envolvidas nas reações de conjugação com o ácido glicurônico (UGT2B7) e as reações de acetilação dependentes da NAT-2 são significativamente reduzidas em pacientes com DRC. A DRC também está relacionada com modificações na expressão e/ou atividade dos transportadores de fármacos como a glicoproteina-P (P-gp), a proteína resistente a múltiplas drogas (MRP) e o polipeptídeo transportador de ânion orgânico (OATP) (NAUD et al., 2008; NAUD et al., 2012). Estudos clínicos com eritromicina marcada com C^{14} mostram que a atividade do CYP3A4, da OATP e da P-gp retornam para os níveis normais após uma sessão de hemodiálise (NOLIN et al., 2006; NOLIN, 2008).

Os pacientes que atingem os estágios avançados da DRC, avaliados com TFG < 15 mL/min/1,73m^2, são inseridos em programas de diálise ou de transplante renal. O impacto da diálise na farmacocinética dependerá da modalidade da diálise em uso pelo paciente (diálise

peritoneal ou hemodiálise) e das características físico-químicas do fármaco. A capacidade de remoção do fármaco pelo procedimento de diálise depende do peso molecular do fármaco, da ligação às proteínas plasmáticas, da hidrossolubilidade, do volume de distribuição e do *clearance*, assim como das características técnicas do procedimento de diálise tais como da membrana de diálise, do fluxo do sangue e do fluido de diálise e do tempo do tratamento dialítico. De um modo geral, os fármacos com peso molecular maior que 1000 daltons, com volume de distribuição maior que 2L/Kg e com alta ligação às proteínas plasmáticas sofrem pouca ou nenhuma influência do processo de diálise (BAUER, 2001; REDON; MARTINEZ; CHEUNG, 2010).

A ativação do sistema nervoso simpático é comum em pacientes com DRC e desempenha um papel importante tanto na gênese da hipertensão quanto na progressão do estágio da DRC, estando associada ao aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular. A ativação adrenérgica representa um fenômeno não restrito somente a DRC em estágio 5, como previamente descrito por diferentes autores, mas um processo já detectado nos estágios iniciais da DRC. A magnitude do aumento da atividade simpática depende do estágio da DRC, ou seja, o processo é mais pronunciado quanto maior o estágio da DRC. Estas observações sugerem que o aumento da ativação simpática, avaliado pelas concentrações plasmáticas de norepinefrina e pela microneurografia do nervo peroneal, juntamente com outros fatores, participaria da progressão da DRC (ZILCH et al., 2007; GRASSI et al., 2011).

As doenças cardíacas representam as principais causas de mortes em pacientes com DRC em tratamento dialítico, sendo responsáveis por 40-45% da mortalidade. Além disso, se considerarmos as mortes cardíacas súbitas entre os pacientes em tratamento dialítico, o número chega a 60% (HERZOG, C.A., 2003; FRANCZYK-SKÓRA et al., 2012; WHITMAN; FELDIMAN; DEO, 2012). Considerando o controle rigoroso da pressão arterial como principal mecanismo para a prevenção da progressão da DRC, a busca de agentes terapêuticos

que reduzam o risco cardiovascular e melhorem a expectativa de vida do paciente, representa um dos focos atuais para os pacientes com DRC (BAKRIS et al., 2006; FAQAH; JAFAR, 2011).

O nebivolol, 1-(6-fluor-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)-2-{[2-(6-fluor-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)-2-hidroxietil]amino}etan-1-ol (Fig. 1), usado na clínica no tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca crônica, é um β bloqueador de terceira geração, altamente seletivo para receptores β_1 adrenérgicos e com propriedades farmacológicas que diferem dos outros β bloqueadores convencionais, pois possui ação vasodilatadora mediada pelo óxido nítrico e com efeitos benéficos na função endotelial vascular (GAO et al., 1991; SELVAN et al., 2007; GUPTA; WRIGHT, 2008).

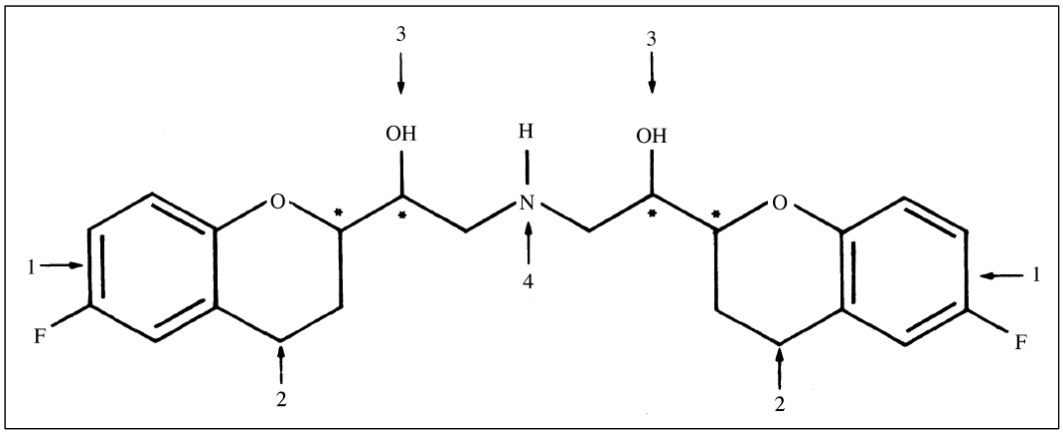


Figura 1. Estrutura do nebivolol. * Centro quiral; → principais sítios de metabolismo; 1 hidroxilação aromática, 2 oxidação alicíclica, 3 glicuronidação; 4 N-desalquilação.

O nebivolol está disponível na clínica como mistura racêmica dos isômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS), com atividade anti-hipertensiva atribuída principalmente ao *d*-nebivolol, o qual quando comparado ao *l*-nebivolol apresenta afinidade aproximadamente 175 vezes maior para os receptores β_1 adrenérgicos (PAUWELS; VAN GOMPEL; LEYSEN, 1991). Este β bloqueador não possui atividade simpatomimética intrínseca e é um dos mais seletivos bloqueadores β_1 adrenérgicos com afinidade de 321 vezes maior para o receptor β_1 adrenérgico do que para o receptor β_2 adrenérgico (BRIXIUS et al., 2001; BRISTOW et al., 2005). Vários outros mecanismos, além do bloqueio de receptores adrenérgicos β_1, estão envolvidos nas

propriedades hemodinâmicas do nebivolol. O nebivolol aumenta a produção e ou atividade do óxido nítrico (NO) através de vários mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. O efeito vasodilatador do nebivolol dependente do endotélio é mediado via *l*-arginina/NO no leito vascular. A liberação de NO causada pelo nebivolol é principalmente dependente do isômero *l*-nebivolol (EVANGELISTA et al., 2007). O nebivolol ativa a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) que através da transformação da *l*-arginina em *l*-citrulina libera o NO no músculo liso onde exercerá sua atividade vasodilatadora. O nebivolol também aumenta a produção de NO no coração ao estimular os receptores adrenérgicos β_3 (MAFFEI et al., 2007; TOBLLI et al., 2012; VANHOUTTE; GAO, 2013). Além de estimular os receptores adrenérgicos β_3 e ativar diretamente a eNOS, o nebivolol também reduz a concentração de dimetil-arginina assimétrica (ADMA), que é responsável por inibir a eNOS, logo a eNOS produziria mais NO no endotélio (GARBIN et al., 2007; SEN et al., 2009). O nebivolol também exerce ação anti-oxidante inibindo a nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) oxidase, a qual preserva a biodisponibilidade do NO através da prevenção do desacoplamento da óxido nítrico sintetase e da formação de peroxinitrito (OELZE et al., 2006; IGNARRO, 2008; MONIGKA et al., 2012).

O nebivolol é um fármaco altamente lipofílico (coeficiente de distribuição octanol/água log P= 4,03 em pH 11,8) com eliminação dependente principalmente do metabolismo. A excreção renal do fármaco inalterado é menor que 0,05% da dose (CHEYMOL et al., 1997).

O metabolismo do nebivolol é dependente do CYP2D6, uma enzima com atividade dependente de polimorfismo genético. A freqüência de metabolizadores lentos (PM) do CYP2D6 na população caucasiana é de 7 a 10% (FUX et al., 2005; FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

A alta eliminação pré-sistêmica do nebivolol é responsável por sua baixa biodisponibilidade (12%) em pacientes fenotipados como metabolizadores rápidos (EM), enquanto em pacientes fenotipados como PM os valores atingem 96% (VAN PEER et al., 1991). O tempo para o nebivolol atingir a concentração plasmática máxima (tmax) é de 0,5-2h em

pacientes EM é de 3-6h em pacientes PM. A administração oral de 5mg de nebivolol/dia, durante 7 dias, resulta em maiores valores de concentração plasmática máxima (Cmax) em pacientes PM do que em pacientes EM (VAN PEER et al., 1991).

O volume de distribuição do nebivolol é alto, com valores variando de 10,1-39,4 $L.Kg^{-1}$. A meia-vida de eliminação do nebivolol é de aproximadamente 8h em pacientes EM e de 27h em pacientes PM. As diferenças observadas nos valores de meia-vida de eliminação entre pacientes EM e PM são decorrentes dos valores de *clearance*, os quais são aproximadamente 4 vezes menores em pacientes PM (111 *vs* 30L/h). O nebivolol é um fármaco altamente ligado às proteínas plasmáticas (principalmente à albumina) de maneira não estereosseletiva (98,1 ±0,2% para *d*-nebivolol e 98,0 ± 0,3% para *l*-nebivolol) (VAN PEER et al., 1991).

A hidroxilação aromática representa a principal via de metabolismo do nebivolol em pacientes EM. Em pacientes PM e também em pacientes EM, a glicuronidação e a oxidação alicíclica constituem importantes vias metabólicas (Figura 2). A N-desalquilação é uma via metabólica pouco significativa tanto em pacientes EM quanto em pacientes PM (VAN PEER et al., 1991).

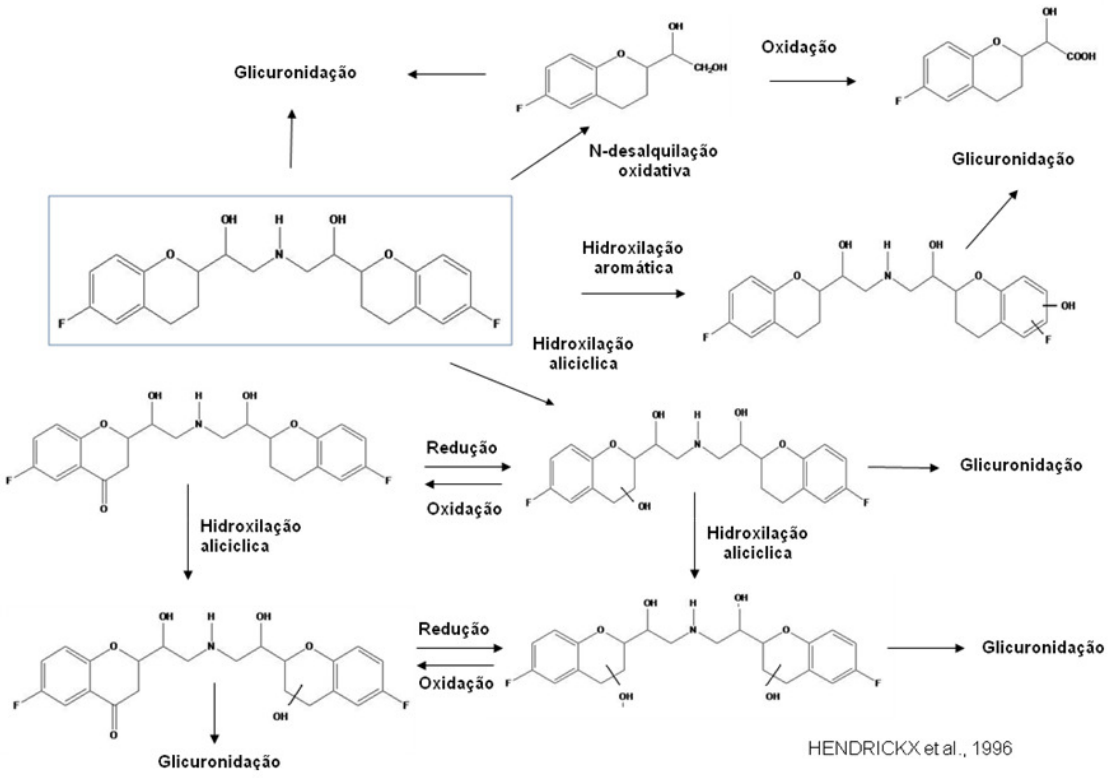


Figura 2: Metabolismo do nebivolol no homem (HENDRICKX et al., 1996)

Os conjugados com o ácido glicurônico são considerados farmacologicamente ativos e os metabólitos hidroxilados do *d*-nebivolol apresentam atividade β bloqueadora, enquanto os metabólitos hidroxilados do *l*-nebivolol retém a capacidade do fármaco inalterado de induzir a produção vascular de NO, desta forma como os metabólitos hidroxilados e os conjugados são considerados ativos, os efeitos clínicos do nebivolol não são diferentes entre os pacientes EM ou PM para o CYP2D6 (MAFFEI et al., 2006; PRISANT, 2008; LINDAMOOD et al., 2011).

Os metabólitos do nebivolol são excretados nas fezes e na urina de pacientes EM, respectivamente representando 44% e 38% da dose. Em pacientes PM, os valores correspondentes são de 13% e 66% da dose (VAN PEER et al., 1991).

O presente estudo apoia-se nos seguintes dados: 1- o uso de β bloqueadores no tratamento da hipertensão reduz a progressão da DRC avaliada pela TFG e albuminúria (HART; BAKRIS, 2007); 2- a utilização de β bloqueadores em pacientes com DRC em tratamento

hemodialítico está associada com a redução da mortalidade relacionada com o sistema cardiovascular (MATSUE et al., 2011); 3- o nebivolol é um β_1 bloqueador usado no tratamento da hipertensão arterial com observação de aumento do fluxo renal plasmático e da TFG em ratos (BAKRIS; HART; RITZ, 2006).

Considerando que o nebivolol é um fármaco essencialmente eliminado por hidroxilação aromática, glicuronidação e oxidação alicíclica (a excreção renal do fármaco inalterado é menor que 0,05% da dose) (MCNEELY; GOA, 1999), que a DRC está associada com glicuronidação reduzida (DREISBACH, 2009; MOMPER; VENKATARAMANAN; NOLIN; 2010), com redução da atividade do CYP2D6 de acordo com a progressão dos estágios da DRC (ROSTAMI-HODJEGAN; KROEMER; TUCKER, 1999), com redução na expressão e/ou atividade das demais isoformas do CYP relacionadas com o metabolismo de fármacos (PICHETTE; LEBLOND, 2003), o presente estudo visa avaliar a influência da DRC e da hemodiálise na farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos. O estudo ainda visa estabelecer a relação farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) entre as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol e a variação da frequência cardíaca durante o exercício isométrico com o *handgrip* nos pacientes investigados.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a influência da DRC e da hemodiálise na farmacodinâmica e na farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar o método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma empregando LC-MS/MS e com aplicação em estudo de disposição cinética de dose única.

- Avaliar a estereosseletividade na farmacocinética do nebivolol, administrado como racemato em regime de dose única oral, a pacientes hipertensos com função renal normal, pacientes hipertensos com DRC estágios 3 e 4 e pacientes com DRC em estágio 5 em hemodiálise.

- Investigar a influência da DRC e da hemodiálise na farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos.

- Estabelecer a relação PK-PD entre as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol e a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com o *handgrip* em pacientes hipertensos com função renal normal, pacientes hipertensos com DRC e pacientes em hemodiálise.

3.CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, em sua 294ª Reunião Ordinária realizada em 31/08/2009, Processo HCRP n° 7336/2009 (ANEXO A). Os pacientes foram informados em detalhes sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos. Após a assinatura do *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*, os pacientes foram submetidos a exame clínico e testes laboratoriais para a comprovação da normalidade da função hepática (ALT, AST, gama GT, bilirrubina e proteínas totais), avaliação da função renal (uréia, creatinina plasmática e clearance da creatinina) albumina plasmática e avaliação metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL, hemoglobina glicada e glicemia de jejum). Nas situações de intercorrências, tais como o aparecimento de efeitos colaterais, foi garantido o afastamento do voluntário do protocolo de pesquisa e o tratamento apropriado na Instituição. Os pacientes foram internados na Unidade de Pesquisa Clinica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP durante parte da investigação.

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation,* versão 2.1.30 (DUPONT; PLUMMER, 1997), utilizando os parâmetros farmacocinéticos do nebivolol em voluntários sadios. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em $p< 0,05$, poder do teste de 80%, diferença entre as médias de AUC do nebivolol em 50% (AUC 7,76 ng.h/mL e desvio padrão de 3,07 ng.h/mL) (KAMALI et al., 1997). A Figura 3 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral. Como pode ser observada na Figura 2, a inclusão de 11-12 pacientes em cada grupo irá acarretar poder do teste acima de 80%.

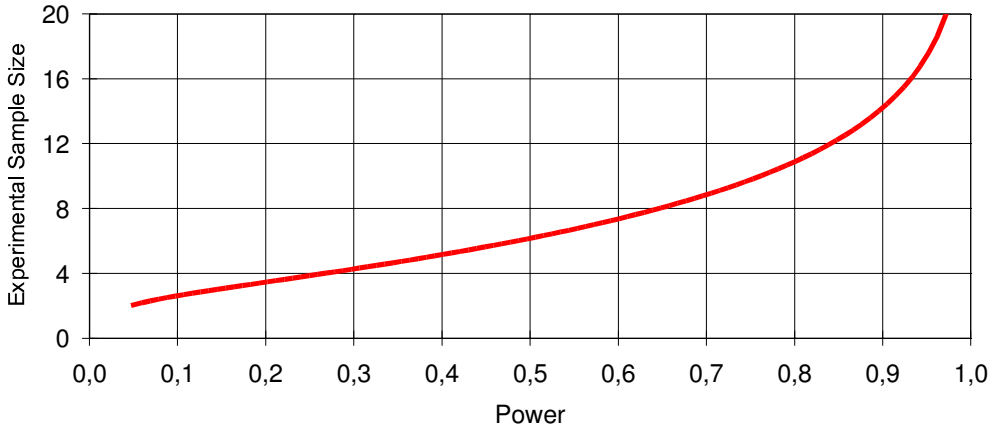


Figura 3. Gráfico do tamanho da amostra em relação ao poder de teste.

Os critérios de inclusão abrangem a investigação de pacientes hipertensos de ambos os sexos, com idade entre 18 a 65 anos, portadores de função renal normal (ausência de alterações no exame de urina tipo I e pelo *clearance* de creatinina maior que 90 mL/min/1,73m^2 de superfície corporal), pacientes portadores de DRC moderada a grave (pacientes com *clearance* da creatinina < 60 mL/min/1,73m^2) e pacientes em tratamento hemodialítico. Durante o estudo foi permitido o uso de medicamentos associados ao tratamento de complicações da DRC, exceto o uso de corticosteróides ou imunossupressores.

Foram excluídos da investigação os pacientes com estenose das artérias renais, hiperaldosteronismo primário, hipertensão grave (pressão arterial acima de 180 x110mmHg), hipertensão refratária (vigência de quatro medicamentos anti-hipertensivos de classes distintas sem controle da PA), acidente vascular encefálico isquêmico ou hemorrágico recente (há menos de 6 meses), angina instável ou infarto agudo do miocárdio há menos 6 meses, doença hepática ativa (vírus B/C, alcoolismo e hepatopatia secundária ao uso de medicamentos), pacientes com histórico de bradicardia, insuficiência vascular periférica, distúrbios de condução atrioventricular, pacientes com situação hemodinâmica instável com tendência a hipotensão arterial (pressão arterial sistólica < 90 mmHg), pacientes com asma brônquica, episódios não

esclarecidos de broncoespasmo e doença pulmonar obstrutiva crônica, pacientes portadores de *Diabetes mellitus* (definido de acordo com os critérios da ADA, ou seja, glicemia de jejum acima de 126mg/dL), pacientes em uso de medicamentos inibidores do CYP2D6 (quinidina, paroxetina, fluoxetina, bupropiona, cimetidina, cetoconazol, clozapina, propafenona e outros) e todos os pacientes que não concordaram em assinar o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram investigados 35 pacientes, com idade entre 18 a 65 anos, em seguimento na Divisão de Nefrologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP ou no Serviço de Nefrologia de Ribeirão Preto (SENERP), distribuídos em 03 grupos, de acordo com a classificação do estágio da DRC (K/DOQI, 2004), sendo 12 pacientes do Grupo controle portadores de hipertensão arterial sistêmica e com função renal dentro dos limites da normalidade (caracterizado de acordo com os critérios da VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2010 e *clearance* da creatinina >90 mL/min/1,73 m^2), 12 pacientes do Grupo DRC (portadores de DRC estágios 3 e 4, *clearance* da creatinina <60 mL/min/1,73m^2) e 11 pacientes do Grupo Hemodiálise (portadores de DRC estágio 5, *clearance* da creatinina <15 mL/min/1,73m^2).

3.2 Protocolo Clínico

Os pacientes investigados, em estado de jejum de 12 h, receberam pela manhã, via oral, dose única de 2 comprimidos de 5 mg de nebivolol racêmico (Nebilet®, Biolab, Brasil) com 200 mL de água. A dieta padrão do hospital foi servida após 3h da administração do nebivolol. As amostras de sangue (10 mL) foram coletadas em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000UI, Roche) nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 30; 36; 42 e 48h após a administração do nebivolol. As alíquotas de plasma para a análise cromatográfica foram obtidas por centrifugação das amostras de sangue (2500 rpm durante 15 min) e, a seguir, armazenadas a - 70 ºC até o momento da análise.

A pressão arterial dos pacientes investigados foi registrada no membro superior não dominante com módulo de pressão arterial não invasiva e a freqüência cardíaca foi registrada empregando o monitor cardíaco Dixtal DX2021. O registro da resposta simpática frente ao teste de esforço isométrico (freqüência cardíaca), utilizando o *handgrip* Jamar® (Simmons Preston, EUA) foi realizado nos mesmos tempos de colheita de sangue.

Os pacientes em posição supina, antes da administração do nebivolol, foram solicitados a utilizar o *handgrip* na sua contratilidade voluntária máxima, com o braço dominante, exceção feita a alguns pacientes do Grupo Hemodiálise que tinham a fístula arteriovenosa confeccionada no braço dominante e, portanto, estes pacientes utilizaram o *handgrip* no braço não dominante. A média da contratilidade voluntária máxima foi obtida após 3 determinações. Em todos os tempos de colheita de sangue (0-48h), os pacientes foram solicitados a realizar durante 2 min o exercício isométrico com o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima (KUBO et al.; 2001). A análise da resposta simpática desencadeada pela manobra do *handgrip* foi realizada calculando-se a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e 1 min antes do início da prova de esforço isométrico durante 2 min.

A avaliação do fenótipo do CYP2D6 foi realizada 48h após a administração do nebivolol. Os pacientes investigados receberam dose única oral de 1 comprimido de 100 mg de tartarato de metoprolol (Seloken, AstraZeneca) com 200 mL de água. Após 3 horas foi coletada uma única amostra de 5mL de sangue com seringa heparinizada (Liquemine® 5000UI, Roche) e o plasma armazenado a –70ºC até o momento da análise.

3.3. Métodos

3.3.1 Análise do metoprolol e o α-hidroximetoprolol em plasma

A análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma foi realizada de acordo com método desenvolvido e avaliado em estudo anterior do grupo (SILVA, 2008). Em resumo, para a

análise do metoprolol e do α-hidroximetoprolol em plasma foi empregado um sistema cromatográfico constituído por bomba, auto-injetor com controlador de temperatura em 12ºC e detector por fluorescência, operando em 229 nm (excitação) e 298 nm (emissão). Foi empregada a coluna Select B LiChrospher 60 RP (125 x 4 mm, tamanho da partícula 5 µm, Merck) com fase móvel constituída de tampão fosfato 0,05M pH 3,5: acetonitrila (9:1 v/v) com fluxo de 1 mL/min. Alíquotas de 1000 µL de plasma foram adicionadas de 25 µL da solução de padrão interno (tramadol 50µg/mL), 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M, 100 mg de cloreto de sódio e 4 mL do solvente extrator diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v). A extração foi realizada através de agitação durante 30 min em agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min), seguida de centrifugação a 1800 g durante 5 min, separação das fases orgânicas (3,5 mL) e concentração sob fluxo de ar em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados em 100µL de fase móvel, dos quais 25µL foram submetidos à análise cromatográfica.

As curvas de calibração para a análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma foram construídas com dados obtidos após a análise de alíquotas de 1000µL de plasma branco (obtido de voluntário sadio não tratado com medicamentos nas últimas 72h) enriquecidas de 25µL de cada solução de uso de metoprolol e α-hidroximetoprolol. Assim, as concentrações correspondem a 10-800 ng/mL de plasma tanto para o metoprolol quanto para o metabólito α-hidroximetoprolol.

3.3.2 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma

3.3.2.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de nebivolol racêmico (cloridrato de nebivolol 98%, TRC, Ontário, Canadá) foi preparada na concentração de 100 µg da base livre/mL de metanol. A partir desta solução foram realizadas diluições para a obtenção das soluções de uso, nas concentrações 2; 4; 8; 20; 40; 80 e 200 ng de cada isômero do nebivolol/mL de metanol.

A solução do padrão interno (PI) tramadol foi preparada na concentração de 50 µg/mL de metanol.

Os solventes empregados nos procedimentos de extração e como fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) como grau cromatografia.

A água utilizada durante o experimento para o preparo dos reagentes foi obtida em sistema de purificação Milli Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.3.2.2 Sistema de detecção MS/MS

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface por eletronebulização (ESI). As análises foram executadas no modo ionização positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120 e 200ºC, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 400 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2{,}58 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 40 V para o nebivolol e para o PI. A energia de colisão foi de 30 eV para o nebivolol e para o PI.

A separação dos isômeros do nebivolol foi realizada na coluna Chirobiotic V (Sigma-Aldrich), com partículas de 5 µm (250 x 4,6 mm) empregando a fase móvel metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min a 24°C.

As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão de nebivolol (20 µg/mL de metanol) e tramadol (50 µg/mL de metanol) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 10 µL/min. As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 406>151 para o nebivolol e 264>58 para o PI tramadol. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.3.2.3 Procedimento de extração

Alíquotas de 2 mL de plasma branco (Hemocentro HCFMRP-USP) enriquecidas de 25 µL da solução de PI (tramadol) foram alcalinizadas com 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M e adicionadas de 50 mg de cloreto de sódio e 4 mL do solvente extrator éter di-isopropílico:diclorometano (70:30, v/v). Os tubos foram agitados somente até formar o *vortex* e depois permaneceram no agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min) durante 40 min. Após o procedimento de centrifugação (10 min a 2500 rpm, 15^0C), 3,6 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos cônicos e concentrados sob fluxo de ar em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados em 130 µL de fase móvel, dos quais 100 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

As curvas de calibração foram construídas com a análise de alíquotas de 2 mL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de cada uma das soluções de uso de nebivolol. As concentrações plasmáticas correspondem a 25; 50; 100; 250; 500; 1000 e 2500 pg de cada isômero de nebivolol/mL. Para a construção das curvas de calibração, as concentrações foram relacionadas no eixo $\underline{x}$, e as razões de áreas dos picos no eixo $\underline{y}$. Foram determinadas as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação.

3.3.2.4 Determinação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das áreas dos picos do nebivolol e PI injetados diretamente na fase móvel, com as áreas dos picos de alíquotas de plasma branco, oriundas de seis diferentes voluntários, submetidas ao procedimento de extração descrito no item 4.3.3 e enriquecidas com soluções padrão de nebivolol e PI.

.

3.3.2.5. Determinação da ordem de eluição dos isômeros do nebivolol

A ordem de eluição foi determinada pela análise individual do isômero puro *d*-nebivolol (SRRR, TRC, Ontário, Canadá) realizada na coluna Chirobiotic® V (Sigma-Aldrich), com partículas de 5 µm (250 x 4,6 mm) empregando a fase móvel metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min a 24°C.

3.3.2.6 Teste de racemização

Os isômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS) foram coletados do sistema HPLC acoplado ao detector por ultravioleta operando em 282nm. Os isômeros foram separados na coluna Chirobiotic® V (Sigma-Aldrich), com partículas de 5 µm (250 x 4,6 mm) e empregando a fase móvel metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min a 24°C. Alíquotas de plasma branco foram enriquecidas com os isômeros individuais coletados e com o isômero puro *d*-nebivolol (SRRR, TRC, North York, Canadá). As alíquotas de plasma enriquecidas foram submetidas ao procedimento de extração descrito anteriormente e os resíduos injetados no sistema HPLC.

3.3.2.7 Validação

O método desenvolvido foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003) para métodos bioanalíticos.

3.3.2.7.1 Recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração, amostras de plasma branco (n=6) enriquecidas com soluções padrão de nebivolol (40; 1000 e 2000 pg de cada isômero/mL de plasma) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 4.3.2.3. A recuperação foi analisada através da comparação direta das áreas dos picos do nebivolol e PI oriundos de

extratos de plasma branco enriquecidos com soluções padrão com as áreas dos picos do nebivolol e PI oriundos das alíquotas de plasma branco enriquecidas com soluções padrão e submetidos ao procedimento de extração.

3.3.2.7.2 Limite de quantificação e linearidade

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração plasmática de nebivolol quantificada com precisão de 20% e exatidão de 80-120%. Assim, foram analisadas 10 replicatas na concentração de 25 pg de cada isômero/mL de plasma.

A linearidade do método analítico foi avaliada através da análise de alíquotas de 2 mL de plasma branco enriquecidas com nebivolol nas concentrações de 25; 50; 100; 250; 500; 1000 e 2500 pg cada isômero/mL de plasma. O método foi considerado linear até a maior concentração plasmática que apresentou desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal e com coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

3.3.2.7.3 Precisão e exatidão

A repetibilidade e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas. Os estudos foram realizados nas concentrações de 40; 1000 e 2000 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma. Estas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-corrida foram analisadas 10 alíquotas destas soluções através de uma única curva de calibração. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 alíquotas de cada uma das soluções de nebivolol durante 5 diferentes corridas.

A avaliação da precisão intra e intercorridas foi realizada através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido de alta

precisão, o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%. O desvio entre a concentração experimental e a concentração teórica não deve exceder 15% para que o método possa ser considerado de alta exatidão.

3.3.2.7.4 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta duração. Para a avaliação da estabilidade do nebivolol foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com concentrações baixa e alta de nebivolol (40 e 2000 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma humano).

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20ºC por pelo menos 24 h, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém preparadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor por um período de 12 h, sendo, então injetadas no sistema cromatográfico. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém preparadas.

Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas na bancada por 4 h. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém preparadas.

Os resultados dos estudos de estabilidade foram expressos em porcentagem de desvio.

3.3.3 Análise farmacocinética

A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o programa WinNonlin versão 4,0 (Pharsight Corp, Moutain View, Calif, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas dos isômeros do nebivolol obtidas experimentalmente. Os dados de concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral do nebivolol foram analisados empregando cinética de primeira ordem e modelo bicompartimental com *lag time* (modelo 12).

3.3.4. Análise farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD)

A análise PK/PD, empregando o programa WinNonlin, foi realizada utilizando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol obtidas experimentalmente como parâmetro farmacocinético e as medidas da variação da freqüência cardíaca entre os períodos final e 1 min antes do início da prova de esforço isométrico durante 2 min utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima, realizado em diferentes tempos (0-48 h) após a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.

A análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função da variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico, foi descrita pelo modelo efeito Emax inibitório (E=Emax*(1-(C/(C+EC50)))) (Figura 4), o qual assume que o aumento da concentração plasmática do *d*-nebivolol reduz a variação da frequência cardíaca máxima induzida pelo exercício isométrico.

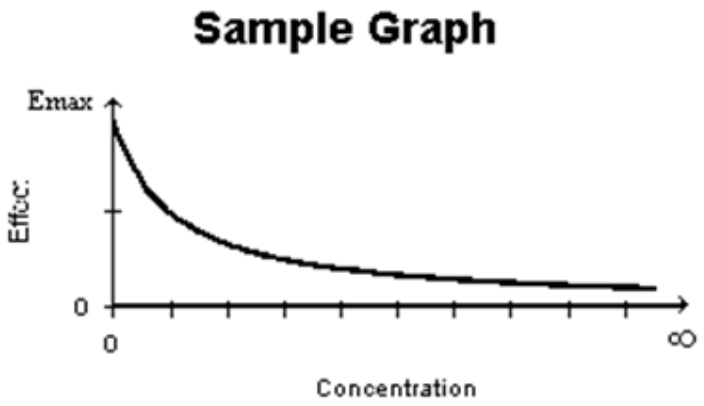


Figura 4: Modelo efeito Emax inibitório (E=Emax*(1-(C/(C+EC50)))), utilizando o programa WinNonlin versão 4,0 na análise farmacodinâmica (modelo 103).

Os parâmetros avaliados incluem o Emax como a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico e o EC50 como a concentração plasmática do isômero *d*-nebivolol que resulta em 50% do Emax.

3.3.5 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Instat® (GraphPad Software, CA, EUA) para obtenção da mediana, média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O teste de regressão ortogonal foi empregado para avaliar a relação entre o Cl/f de cada isômero do nebivolol e a razão metabólica metoprolol/α-hidroximetoprolol no plasma. O teste de regressão ortogonal foi realizado com o auxílio do programa Grafit versão 7,0,3 (Erithacus Software, London, UK, 2012). Para a avaliação das razões isoméricas de nebivolol diferentes da unidade foi empregado o teste de Wilcoxon bicaudal para dados pareados. O teste Kruskall-Wallis para dados não pareados foi utilizado para comparar os dados entre os Grupos controle e DRC; controle e hemodiálise e DRC e hemodiálise. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos isômeros do nebivolol em plasma

As Figuras 5 e 6 mostram, respectivamente para o nebivolol e para o PI (tramadol), os íons protonados e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 406>151 e 264>58.

A Figura 7 apresenta os cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma humano enriquecido com nebivolol racêmico (2500 pg de cada isômero/mL) e plasma de paciente em hemodiálise 1 h após a administração de 10 mg de nebivolol racêmico.

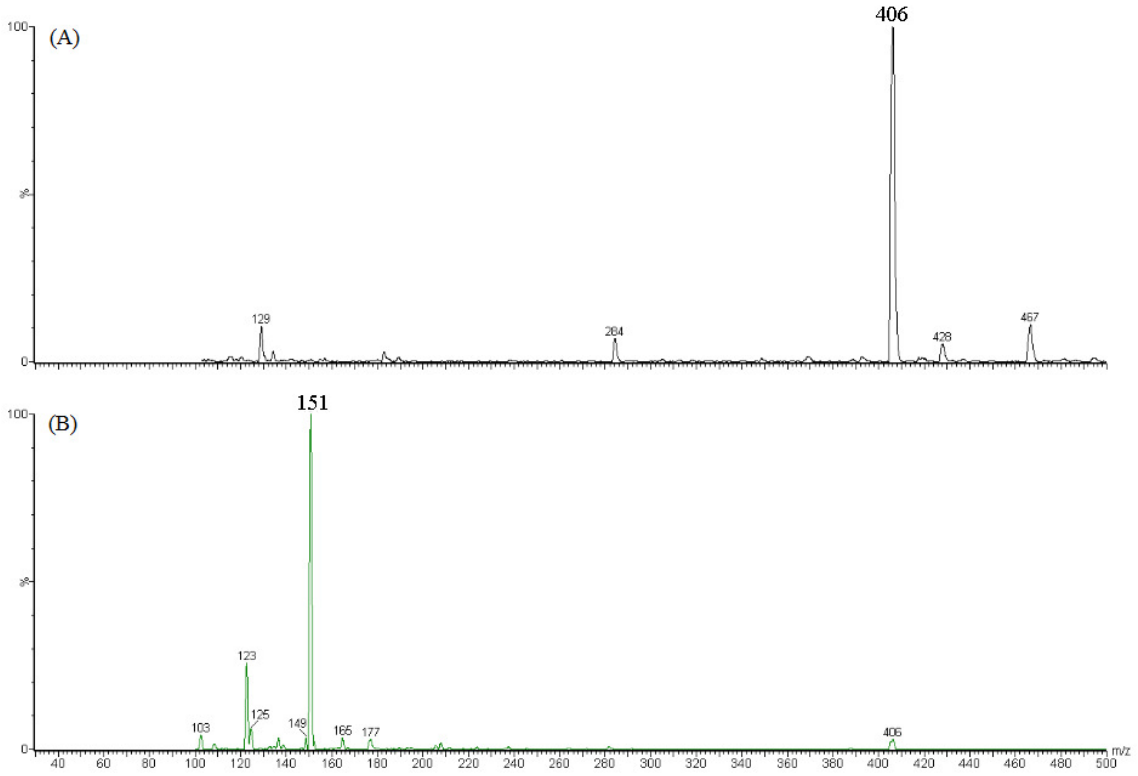


Figura 5 - Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) do nebivolol.

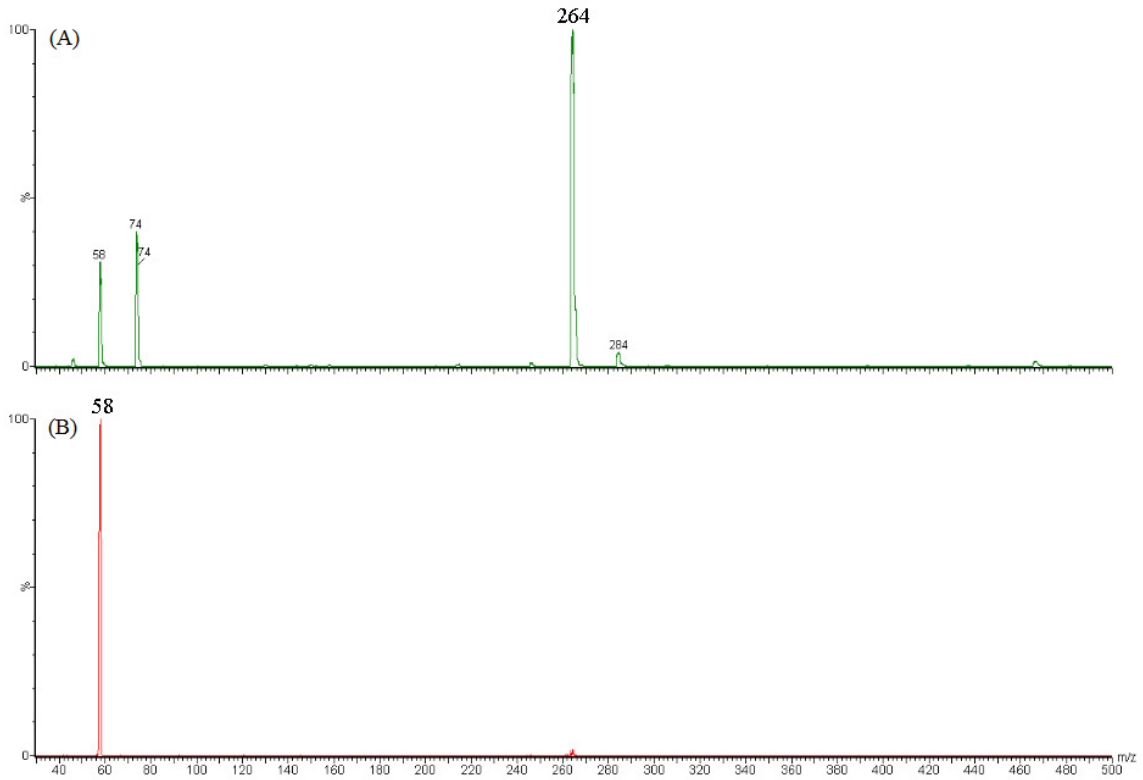


Figura 6 - Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) do PI tramadol.

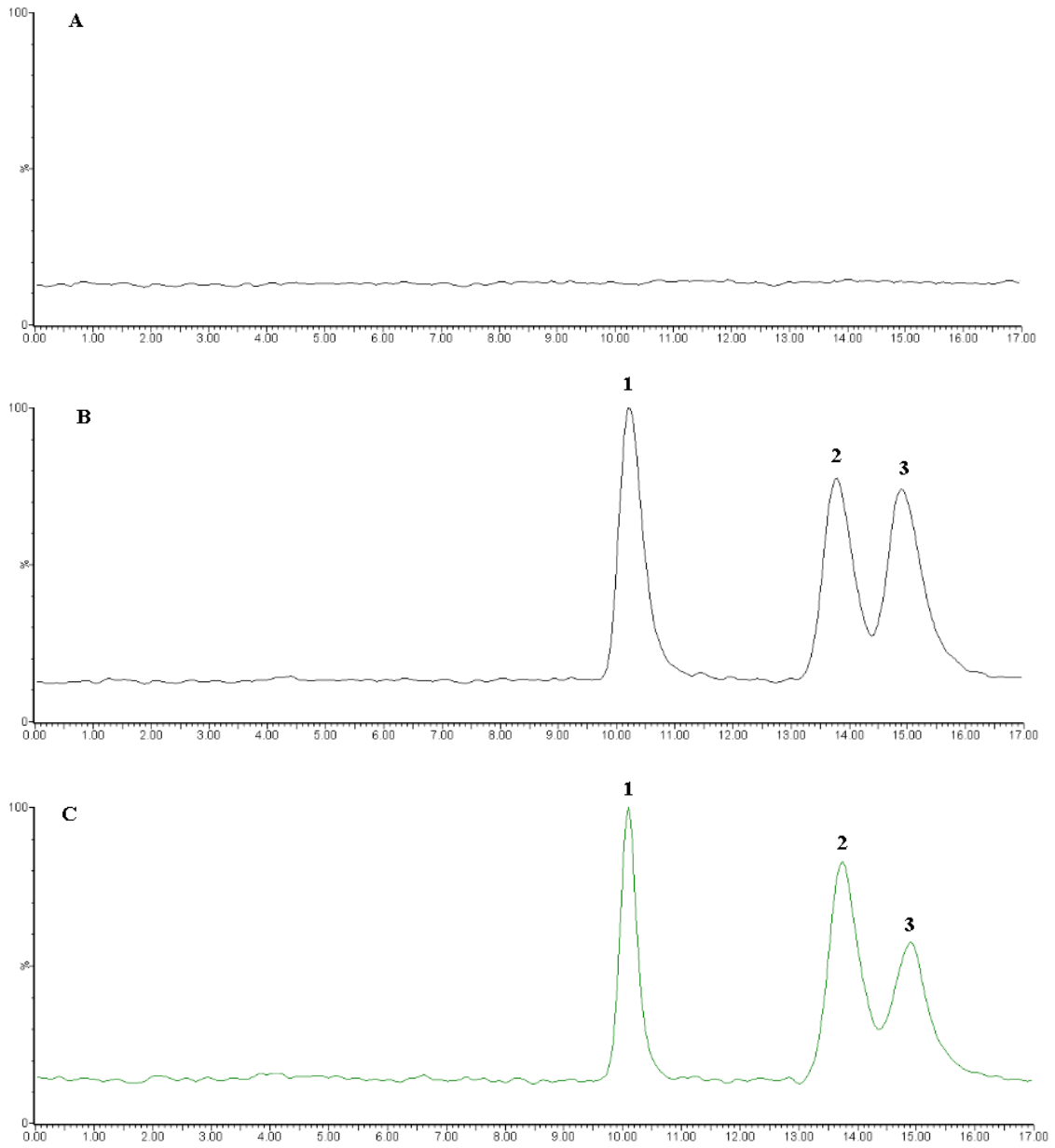


Figura 7 - Cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma. (A) Plasma humano branco; (B) Plasma humano enriquecido com nebivolol racêmico (2500 pg de cada isômero/mL) e PI (3125 pg/mL). (C) Plasma de paciente em hemodiálise 1 h após a administração de 10 mg de nebivolol racêmico. 1- PI (tramadol), 2- *l*-nebivolol e 3- *d*-nebivolol.

A Figura 8 mostra a ordem de eluição dos isômeros do nebivolol, indicando que os isômeros foram eluídos na sequência *l*-nebivolol e *d*-nebivolol.

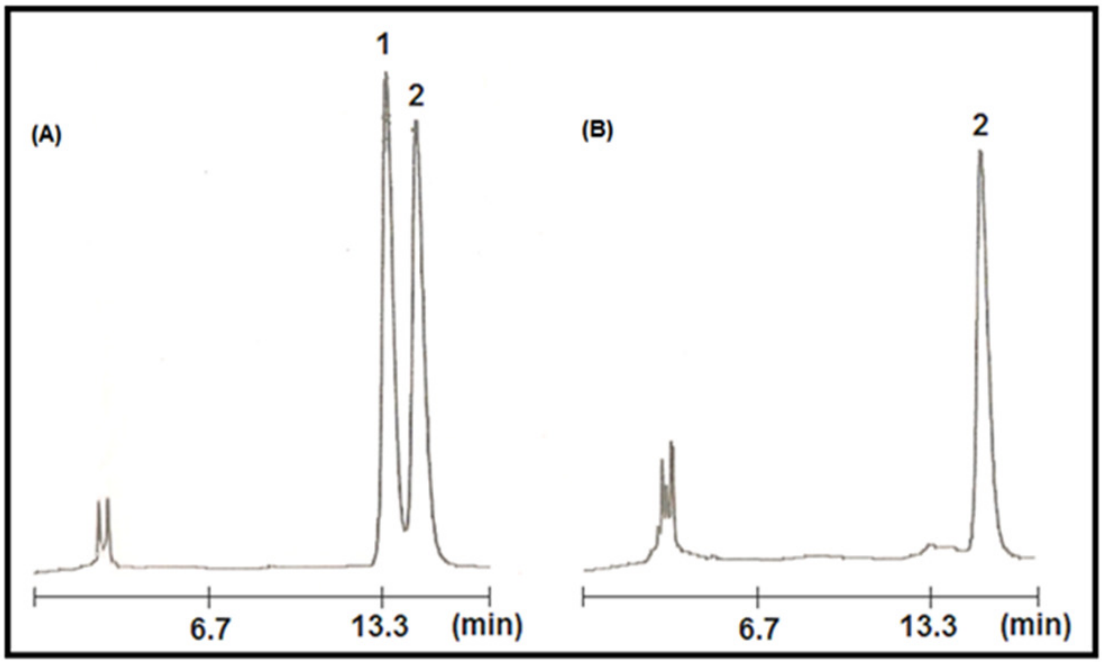


Figura 8 – Cromatograma referente à ordem de eluição dos isômeros do nebivolol. (A) Cromatograma do nebivolol racêmico, 1- isômero RSSS (*l*-nebivolol), 2- isômero SRRR (*d*-nebivolol). (B) Cromatograma do isômero puro SRRR (*d*-nebivolol).

A Tabela 3 apresenta os tempos de retenção para os isômeros do nebivolol e para o tramadol (PI).

Tabela 1 - Tempos de retenção (min) do *l*-nebivolol, *d*-nebivolol e tramadol (PI).

Fármaco	Tempo de retenção (min)
tramadol (PI)	10,20
l-nebivolol	13,79
d-nebivolol	14,90

A Tabela 4 mostra os dados obtidos na avaliação do efeito matriz na análise dos isômeros do nebivolol e do PI em plasma. Os dados referentes à porcentagem em relação ao sinal original estão apresentados como a média dos valores obtidos para 6 diferentes lotes de plasma.

Tabela 2 – Efeito matriz para o nebivolol e PI em seis diferentes lotes de plasma humano. Os dados estão apresentados como média (n=6).

Concentração (pg/mL)	**Efeito Matriz (% em relação ao sinal original)**		
	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**	**PI**
50	94,09	98,58	94,28
1000	80,26	81,55	
2500	91,99	92,70	

sinal original (%)= área padrão/área do extrato de plasma branco enriquecido com o padrão x 100

As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados obtidos na validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.

Tabela 3 – Estudo de estabilidade do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.

Desvio (%)	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
Curta duração (4 h)		
40 pg/mL	2,96	-10,13
2000 pg/mL	5,76	-5,34
Ciclos congelamento/descongelamento		
40 pg/mL	-14,17	-6,40
2000 pg/mL	-14,81	-13,82
Pós-processamento (12h)		
40 pg/mL	4,28	0,98
2000 pg/mL	-13,25	-14,44

% de desvio em relação às amostras recém preparadas

Tabela 4 – Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.

	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
Recuperação absoluta (%)		
40 pg/mL	94,58	99,22
1000 pg/mL	97,26	96,68
2000 pg/mL	94,78	93,99
Linearidade (pg/mL)	25 – 2500	25 – 2500
Equação da reta	y=0,0002x+0,001278	y=0,0001x+0,001149
Coeficiente de correlação linear	r = 0,997	r = 0,998
Limite de Quantificação (pg/mL)	25	25
Precisão (CV %, n = 10)	14,50	14,92
Exatidão (Inexatidão %)	2,41	1,46
Precisão intercorridas (CV %)		
40 pg/mL (n=5)	8,73	12,06
1000 pg/mL (n=5)	7,94	8,81
2000 pg/mL (n=5)	7,63	4,62
Precisão intra-corrida (CV %)		
40 pg/mL (n=10)	10,91	5,06
1000 pg/mL (n=10)	12,16	8,74
2000 pg/mL (n=10)	4,03	5,71
Exatidão intercorridas (Inexatidão %)		
40 pg/mL (n=5)	5,83	0,26
1000 pg/mL (n=5)	-2,54	-1,54
2000 pg/mL (n=5)	-11,23	-8,17
Exatidão intra-corrida (Inexatidão %)		
40 pg/mL (n=10)	-2,20	-5,08
1000 pg/mL (n=10)	-3,46	0,08
2000 pg/mL (n=10)	-11,08	-3,80

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/ média) x 100]; % Inexatidão= $[(C_{obs}-C_{adicionada})/C_{adicionada}]$x 100

Os resultados apresentados na Figura 9 indicam ausência de racemização dos isômeros do nebivolol durante os procedimentos de preparo da amostra e análise cromatográfica.

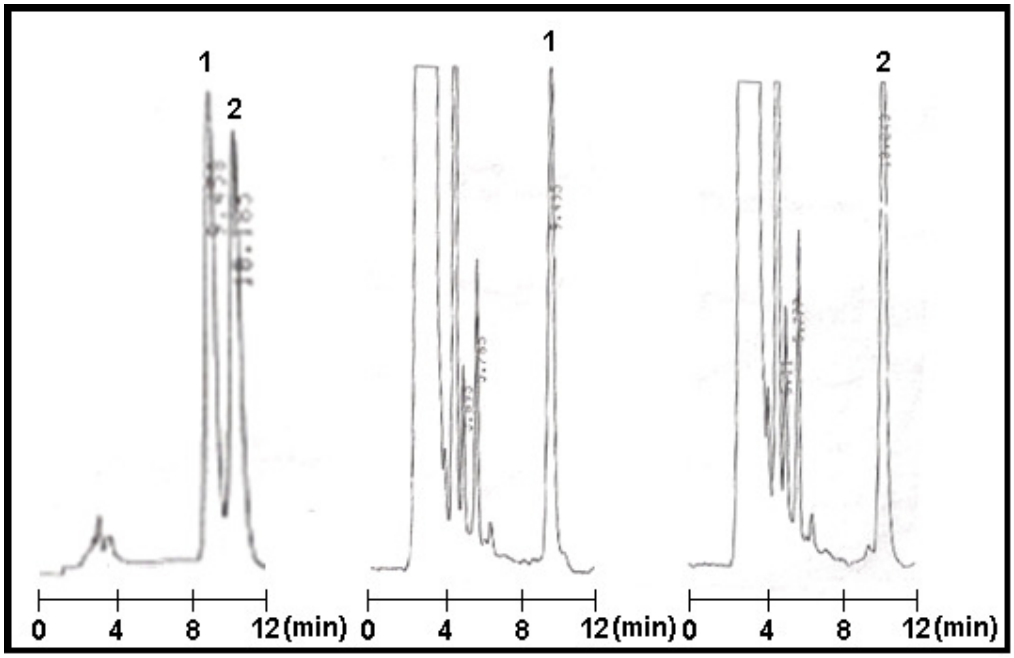


Figura 9 – Teste de racemização dos isômeros do nebivolol. (A) Cromatograma do nebivolol racêmico 1-*l*-nebivolol, 2-*d*-nebivolol; (B) Cromatograma do isômero *l*-nebivolol após o procedimento de extração em plasma; (C) Cromatograma do isômero *d*-nebivolol após o procedimento de extração.

4.2 Análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma

A Figura 10 mostra os cromatogramas referentes a análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma, empregando HPLC com detecção por fluorescência.

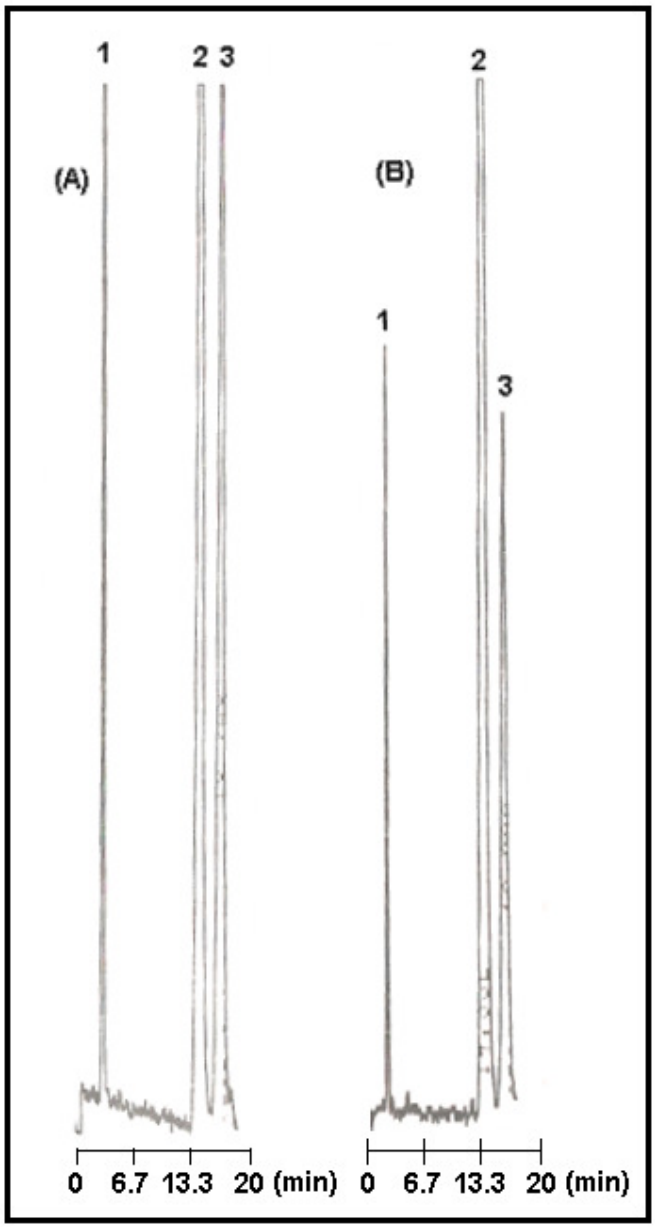


Figura 10 - Cromatogramas referentes à análise do metoprolol e α-hidroximetoprolol em plasma. (A) Plasma enriquecido com metoprolol, α-hidroximetoprolol e PI (tramadol); (B) Plasma obtido 3 h após a administração de dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol. 1-α-hidroximetoprolol, 2-tramadol e 3-metoprolol.

4.3 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol

Os resultados da investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol estão apresentados na Tabela 7. As concentrações de metoprolol e α-hidroximetoprolol foram avaliadas em amostras de plasma obtidas 3 h após a administração de dose única de 100mg do fármaco marcador tartarato de metoprolol. As razões de concentrações plasmáticas $\log_{10}$ metoprolol/α-hidroximetoprolol inferiores a 1,5 designam o fenótipo EM do metoprolol (SOHN et al., 1992).

Tabela 5 - Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol (n=35).

Grupo	metoprolol (ng/mL)	α-hidroximetoprolol (ng/mL)	MR	log_{10} MR	Fenótipo
Hemodiálise (n=11)					
1	109,41	54,62	2,00	0,30	EM
2	137,61	46,84	2,94	0,47	EM
3	84,97	73,40	1,15	0,06	EM
4	48,56	38,59	0,10	-1,00	EM
5	19,58	41,75	0,47	-0,33	EM
6	188,95	66,52	2,84	0,45	EM
7	389,62	62,54	6,23	0,79	EM
8	219,78	30,23	7,27	0,86	EM
9	207,00	86,60	2,39	0,38	EM
10	414,55	70,22	5,90	0,77	EM
11	392,94	19,27	20,39	1,31	EM
DRC (n=12)					
1	131,68	54,87	2,40	0,38	EM
2	122,46	61,97	1,98	0,30	EM
3	329,82	11,67	28,26	1,45	EM
4	244,25	88,85	2,75	0,44	EM
5	46,60	83,59	0,56	-0,25	EM
6	157,27	98,22	1,60	0,20	EM
7	136,63	52,54	2,60	0,42	EM
8	331,33	25,98	12,75	1,11	EM
9	95,54	58,50	1,63	0,21	EM
10	183,32	47,87	3,83	0,58	EM
11	222,50	71,70	3,10	0,49	EM
12	66,61	42,30	1,57	0,20	EM
Controle (n=12)					
1	91,66	70,97	1,29	0,11	EM
2	333,46	33,10	10,07	1,00	EM
3	235,71	84,59	2,79	0,45	EM
4	387,68	195,07	1,99	0,30	EM
5	123,52	70,88	1,74	0,24	EM
6	149,58	61,03	2,45	0,39	EM
7	188,28	30,25	6,22	0,79	EM
8	121,67	55,10	2,21	0,34	EM
9	17,31	85,02	0,20	-0,69	EM
10	235,96	36,87	6,40	0,81	EM
11	86,35	47,45	1,82	0,26	EM
12	534,26	nd	---	---	PM

nd: não detectado em concentrações < 10 ng/mL de plasma

4.4 Características dos pacientes investigados

Os dados demográficos dos pacientes estão apresentados na Tabela 6 como mediana, média e IC 95%.

A idade, o peso, a altura e os valores de IMC não diferem ($p \leq 0,05$) entre os grupos controle, DRC e Hemodiálise.

Todos os pacientes foram fenotipados como EM para o CYP2D6, exceto um paciente do Grupo controle que foi fenotipado como PM para o CYP2D6. O paciente fenotipado como PM foi analisado individualmente para a farmacocinética.

Os valores de *clearance* da creatinina variaram de 86,94-149,95 mL/min/1,73m^2 para os pacientes do Grupo controle, de 14,90-55,89 mL/min/1,73m^2 para os pacientes do Grupo DRC e de 5,00-15,00 mL/min/1,73m^2 para os pacientes do Grupo Hemodiálise.

Tabela 6: Características antropométricas dos pacientes investigados (n=35). Grupo controle (n=12), Grupo DRC (n=12) e Grupo Hemodiálise (n=11). Os dados estão expressos como mediana, média e IC 95%.

	Grupo controle (n=12)	Grupo DRC (n=12)	Grupo Hemodiálise (n=11)
Gênero	5 homens e 7 mulheres	6 homens e 6 mulheres	5 homens e 6 mulheres
Idade (anos)	45,00 44,67 (39,18 - 50,15)	53,50 51,00 (45,62 – 56,38)	40,00 42,18 (35,22 – 49,14)
Peso (kg)	70,15 73,25 (67,30 - 79,20)	68,17 71,65 (65,00 - 78,30)	68,70 62,99 (54,64 – 71,34)
Altura (m)	1,67 1,64 (1,60 - 1,69)	1,63 1,61 (1,56-1,66)	1,71 1,65 (1,59 – 1,72)
IMC (kg/m^2)	27,54 27,06 (25,59 - 28,53)	28,93 27,57 (26,08 - 29,05)	23,19 22,85 (21,16 – 24,54)
***Clearance* creatinina (mL/min/1,73m^2)**	93,82 101,66 (89,74-113,56)	33,85* 33,04 (25,51-40,56)	8,00* 8,82 (6,97 – 10,67)
log RM plasma	0,34 0,36 (0,06-0,66)	0,40 0,46 (0,17-0,74)	0,45 0,37 (-0,05-0,79)
Fenótipo CYP2D6	EM (n=11) PM (n=1)	EM (n=12)	EM (n=11)
Fármacos associados	5, 6, 9, 11, 18, 19, 22, 23, 24 e 25	1, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19 e 21	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20

* Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$

Fármacos associados: 1-acido fólico; 2-complexo B; 3-AAS; 4-omeprazol; 5-enalapril; 6-furosemida; 7-sinvastatina; 8-calcitriol; 9-captopril; 10-anlodipina; 11-hidroclorotiazida; 12-diazepam; 13-sevelamer; 14-alopurinol; 15-eritropoetina; 16-vitamina C; 17-sulfato ferroso; 18-losartana; 19-atorvastatina; 20-ciclobenzaprina; 21-alopurinol 22-indapamida; 23-levotiroxina; 24-espironolactona; 25-olmesartan

4.5 Farmacocinética dos isômeros do nebivolol

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol foi avaliada em 12 pacientes do Grupo controle, 12 pacientes do Grupo DRC e 11 pacientes do Grupo Hemodiálise tratados com dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico.

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol nos pacientes do Grupo controle (n=11) fenotipados como EM está apresentada na Figura 11 (média ±EPM) e na Tabela 7 (mediana, média e IC 95%). Os dados mostram acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol.

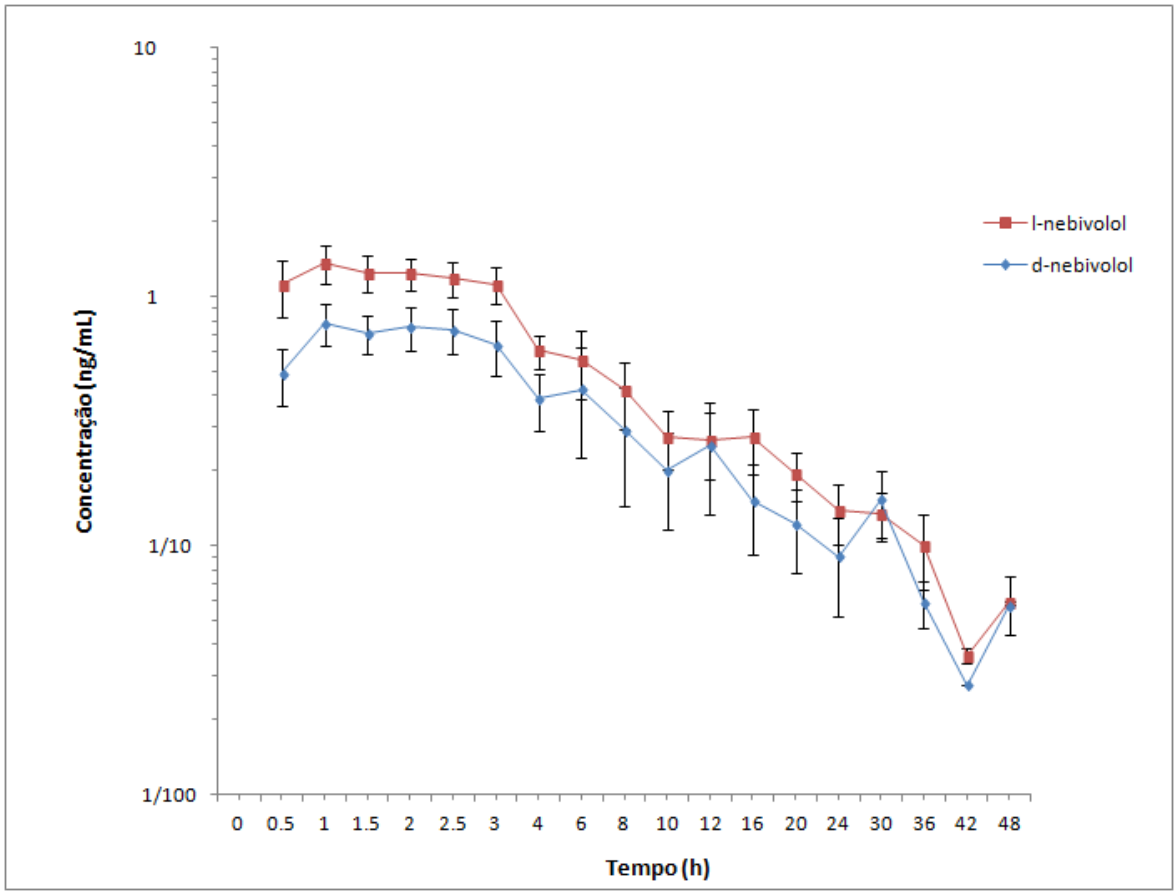


Figura 11: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo controle (n=11) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. Os dados estão expressos como média ±EPM.

Tabela 7 – Disposição cinética dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo controle (n=11) tratados com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
Cmax (ng/mL)	1,32 1,57 (0,99-2,15)	0,88* 0,95 (0,56-1,33)
tmax (h)	1,40 1,44 (0,88-2,00)	1,51 1,60 (0,92-2,28)
AUC0-∞ (ng.h/mL)	8,02 10,69 (4,97-16,40)	4,25* 7,33 (1,42-31,99)
t1/2 (h)	13,28 13,90 (10,04-17,75)	11,59 13,31 (9,31-17,30)
α (h^{-1})	0,71 0,77 (0,63-0,91)	0,73 0,72 (0,49-0,95)
β (h^{-1})	0,05 0,06 (0,04-0,07)	0,06 0,06 (0,05-0,07)
Vd/f (L)	5383,30 6784,82 (2524,50-11045)	6397,70* 10450,62 (3971,70-16930,00)
Cl/f (L/h)	623,58 690,84 (343,33-947,35)	1176,40* 1236,20 (772,66-1699,70)
AUC 0-∞ *l/d*	1,76 1,74 (1,51-1,97)	

*Teste de Wilcoxon bicaudal para dados pareados; $p < 0,05$.

As curvas de concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo, obtidas para o paciente do Grupo controle classificado como PM do CYP2D6, estão apresentadas na Figura 12 e na Tabela 8. Os dados mostram acúmulo plasmático de ambos os isômeros do nebivolol no paciente PM quando comparado aos pacientes EM incluídos no grupo controle.

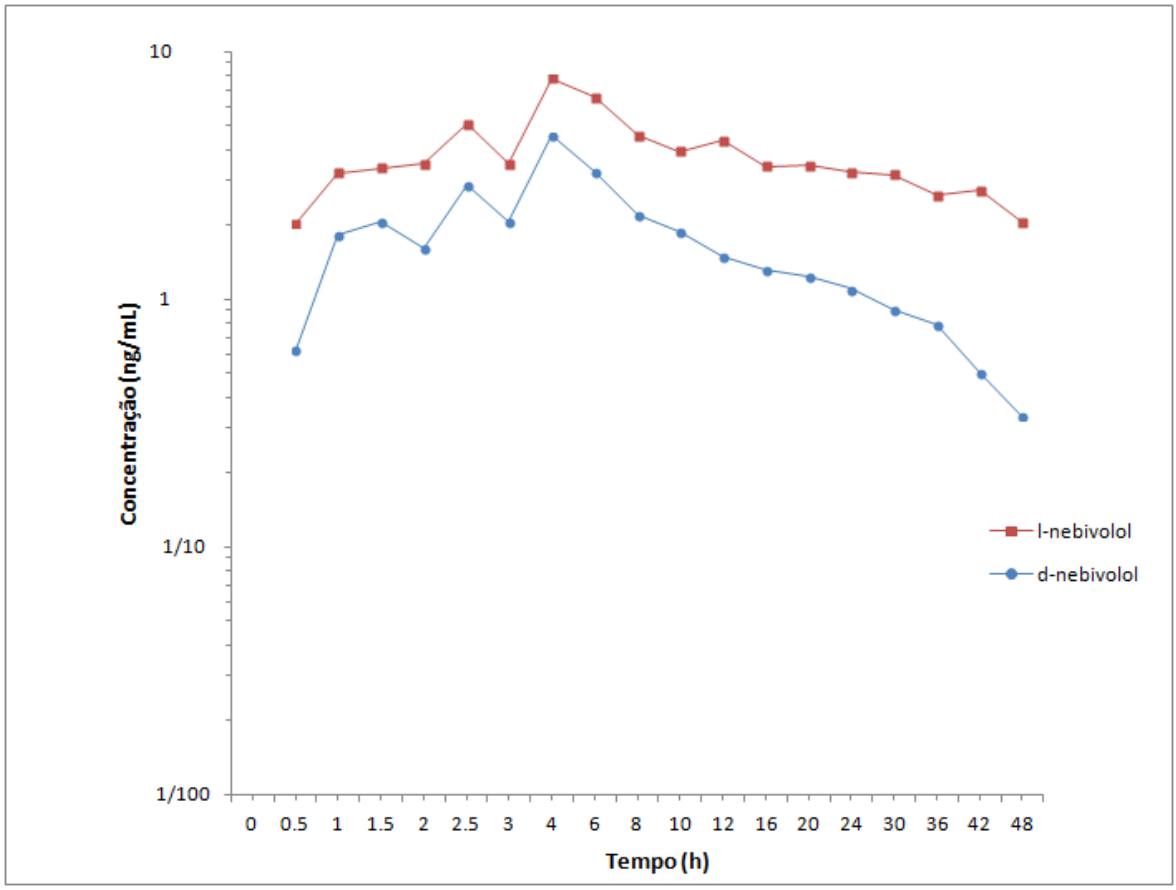


Figura 12: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em um paciente do Grupo controle tratado com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico e fenotipado como PM do CYP2D6.

Tabela 8 – Disposição cinética dos isômeros do nebivolol no paciente do Grupo controle fenotipado como PM do CYP2D6 (n=1) e tratado com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg.

	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
Cmax (ng/mL)	5,90	3,26
tmax (h)	4,42	3,76
AUC 0-∞ (ng.h/mL)	351,24	73,55
t1/2 (h)	54,75	18,96
α (h-1)	0,28	0,38
β (h-1)	0,01	0,03
Vd/f (L)	596,02	859,78
Cl/f (L/h)	67,54	122,07
AUC0-∞ *l/d*	4,77	

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol nos pacientes do Grupo DRC (n=12) está apresentada na Figura 13 (média ±EPM) e na Tabela 9 (mediana, média e IC 95%). Os dados mostram acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol.

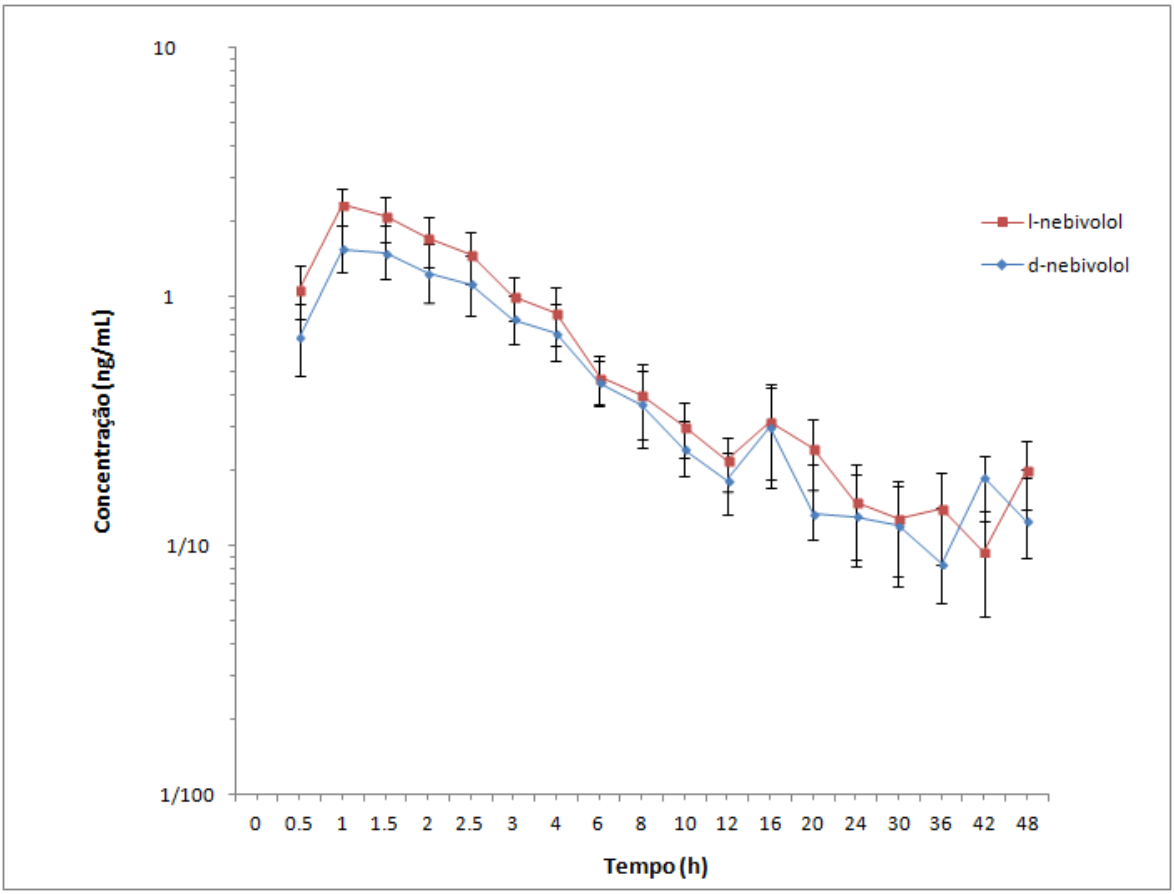


Figura 13: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo DRC (n=12) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. Os dados estão expressos como média ±EPM.

Tabela 9 – Disposição cinética dos isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol em pacientes do Grupo DRC (n=12) tratados com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
Cmax (ng/mL)	2,40 2,51 (1,60-3,42)	1,67* 1,73 (1,01-2,44)
tmax (h)	1,06 1,20 (0,80-1,60)	0,99 1,30 (0,81-1,79)
AUC0-∞ (ng.h/mL)	10,20 14,70 (5,31-24,08)	8,37* 11,14 (4,22-18,07)
t1/2 (h)	12,90 13,70 (10,63-16,77)	12,27 12,54 (10,27-14,80)
α (h^{-1})	0,96 1,17 (0,65-1,69)	0,65 0,88 (0,61-1,17)
β (h^{-1})	0,05 0,05 (0,04-0,07)	0,06 0,06 (0,04-0,07)
Vd/f (L)	3527,00 4808,33 (2675,40-6941,20)	5232,50* 5277,43 (3183,40-7371,40)
Cl/f (L/h)	491,51 494,71 (360,89-628,53)	604,58* 710,25 (444,50-976,01)
AUC 0-∞ *l/d*	1,36 1,42 (1,12-1,72)	

*Teste de Wilcoxon bicaudal para dados pareados; $p < 0,05$.

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol nos pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11) está apresentada na Figura 14 (média ±EPM) e na Tabela 10 (mediana, média e IC 95%). Os dados mostram acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol.

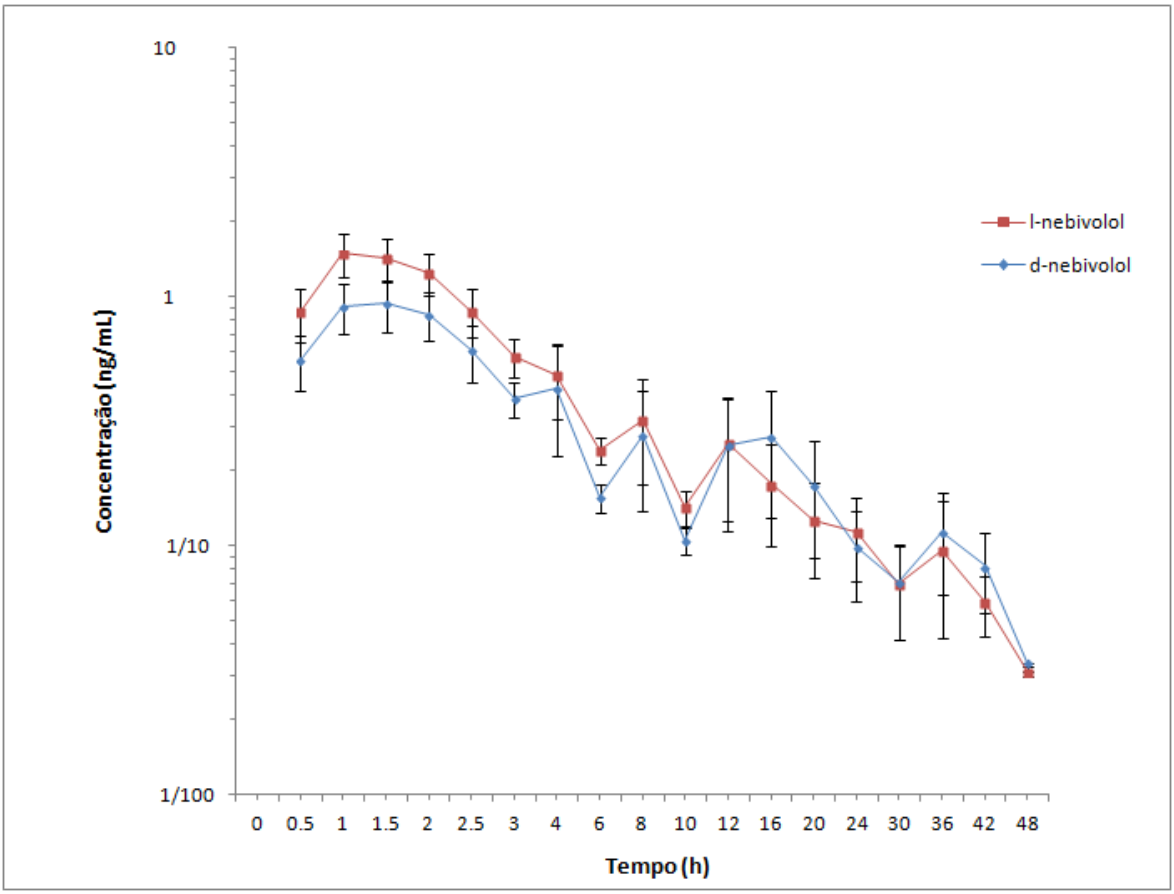


Figura 14: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo Hemodiálise tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=11). Os dados estão expressos como média ±EPM.

Tabela 10 – Disposição cinética dos isômeros do nebivolol em pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11) tratados com dose única oral do fármaco racêmico de 10 mg. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

	***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
Cmax (ng/mL)	1,35 1,69 (1,10-2,28)	0,78* 1,05 (0,59-1,51)
tmax (h)	1,14 1,09 (0,84-1,34)	1,11 1,10 (0,86-1,36)
AUC0-∞ (ng.h/mL)	6,74 10,28 (2,32-18,23)	4,50* 8,80 (0,75-16,84)
t1/2 (h)	14,00 13,43 (11,10-15,76)	15,58 16,41 (12,92-19,90)
α (h^{-1})	1,18 1,16 (0,84-1,47)	1,07 0,99 (0,71-1,28)
β (h^{-1})	0,05 0,05 (0,04-0,07)	0,04 0,05 (0,04-0,06)
Vd/f (L)	5704,70 7981,52 (3818,00-12145,00)	9477,10* 13360,44 (6761,80-19959,00)
Cl/f (L/h)	742,26 759,00 (523,00-994,33)	1112,10* 964,55 (672,18-1256,90)
AUC 0-∞ *l/d*	1,24 1,29 (1,10-1,47)	

*Teste de Wilcoxon. bicaudal para dados pareados; $p < 0,05$.

As Tabelas 11 e 12 mostram a comparação da farmacocinética dos isômeros do nebivolol entre os Grupos controle (n=11) , DRC (n=12) e Hemodiálise (n=11).

Tabela 11 – Farmacocinética do isômero *l*-nebivolol nos pacientes do Grupo controle (n=11), Grupo DRC (n=12) e Grupo Hemodiálise (n=11) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

	Grupo controle	Grupo DRC	Grupo Hemodiálise
Cmax (ng/mL)	1,32 1,57 (0,99-2,15)	2,40 2,51 (1,60-3,42)	1,35 1,69 (1,10-2,28)
tmax (h)	1,40 1,44 (0,88-2,00)	1,06 1,20 (0,80-1,60)	1,14 1,09 (0,84-1,34)
AUC0-∞ (ng.h/mL)	8,02 10,69 (4,97-16,40)	10,20 14,70 (5,31-24,08)	6,74 10,28 (2,32-18,23)
t1/2 (h)	13,28 13,90 (10,04-17,75)	12,90 13,70 (10,63-16,77)	14,00 13,43 (11,10-15,76)
α (h^{-1})	0,71 0,77 (0,63-0,91)	0,96 1,17 (0,65-1,69)	1,18 1,16 (0,84-1,47)
β (h^{-1})	0,05 0,06 (0,04-0,07)	0,05 0,05 (0,04-0,07)	0,05 0,05 (0,04-0,07)
Vd/f (L)	5383,30 6784,82 (2524,50-11045,00)	3527,00 4808,33 (2675,40-6941,20)	5704,70 7981,52 (3818,00-12145,00)
Cl/f (L/h)	623,58 690,84 (343,33-947,35)	491,51 494,71 (360,89-628,53)	742,26 759,00 (523,00-994,33)
AUC 0-∞ *l/d*	1,76 1,74 (1,51-1,97)	1,36 1,42 (1,12-1,72)	1,24 1,29 (1,10-1,47)

*Teste Kruskal-Wallis p≤ 0,05 (nenhuma diferença significativa).

Tabela 12 – Farmacocinética do isômero *d*-nebivolol nos pacientes do Grupo controle (n=11), Grupo DRC (n=12) e Grupo Hemodiálise (n=11) tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

	Grupo controle	Grupo DRC	Grupo Hemodiálise
Cmax (ng/mL)	0,88 0,95 (0,56-1,33)	1,67 1,73 (1,01-2,44)	0,78 1,05 (0,59-1,51)
tmax (h)	1,51 1,60 (0,92-2,28)	0,99 1,30 (0,81-1,79)	1,11 1,10 (0,86-1,36)
AUC0-∞ (ng.h/mL)	4,25 7,33 (1,42-31,99)	8,37 11,14 (4,22-18,07)	4,50 8,80 (0,75-16,84)
t1/2 (h)	11,59 13,31 (9,31-17,30)	12,27 12,54 (10,27-14,80)	15,58 16,41 (12,92-19,90)
α (h^{-1})	0,73 0,72 (0,49-0,95)	0,65 0,88 (0,61-1,17)	1,07 0,99 (0,71-1,28)
β (h^{-1})	0,06 0,06 (0,05-0,07)	0,06 0,06 (0,04-0,07)	0,04 0,05 (0,04-0,06)
Vd/f (L)	6397,70 10450,62 (3971,70-16930,00)	5232,50 5277,43 (3183,40-7371,40)	9477,10 13360,44 (6761,80-19959,00)
Cl/f (L/h)	1176,40 1236,20 (772,66-1699,70)	604,58 710,25 (444,50-976,01)	1112,10 964,55 (672,18-1256,90)

*Teste Kruskal-Wallis p≤ 0,05 (nenhuma diferença significativa).

4.6 Correlação entre a atividade *in vivo* do CYP2D6 e a farmacocinética dos isômeros do nebivolol

As Figuras 15 e 16 mostram a correlação ($p<0,01$) entre o *clearance* aparente (Cl/f) dos isômeros do nebivolol e as razões metabólicas plasmáticas (RM_{plasma}) metoprolol/α-hidroximetoprolol (n=34 pacientes fenotipados como EM).

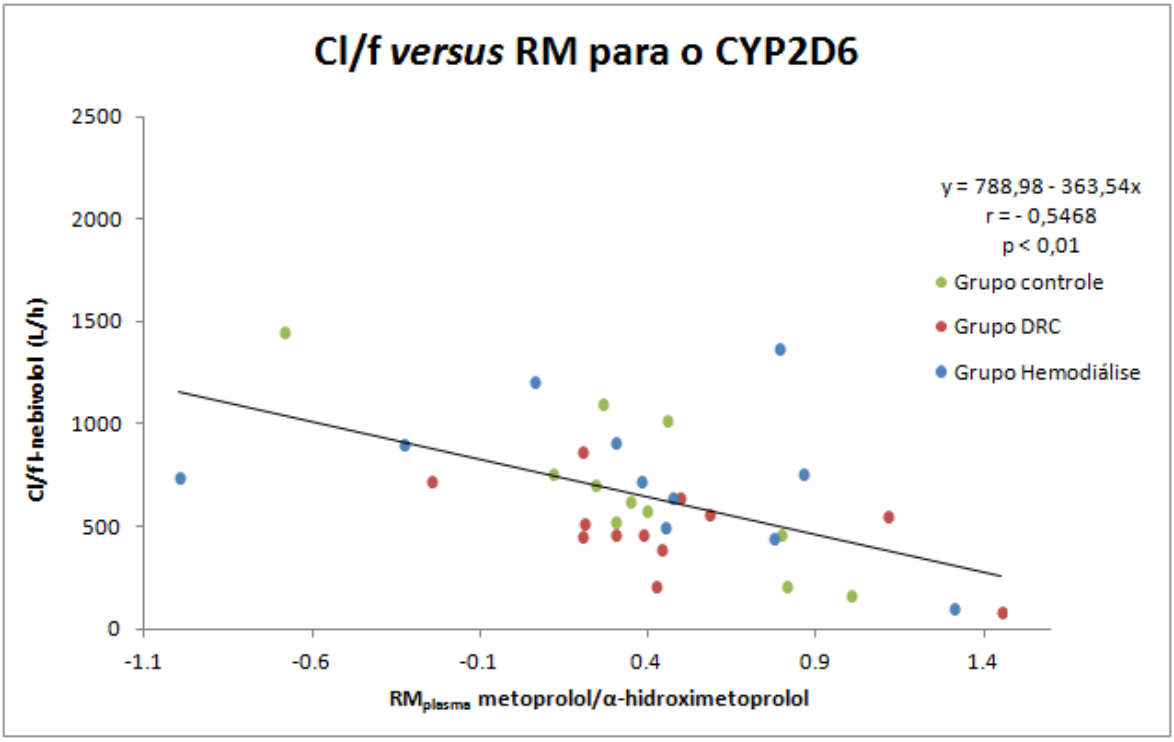


Figura 15: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *l*-nebivolol e a razão metabólica plasmática do metoprolol/α-hidroximetoprolol (n=34 pacientes fenotipados como EM).

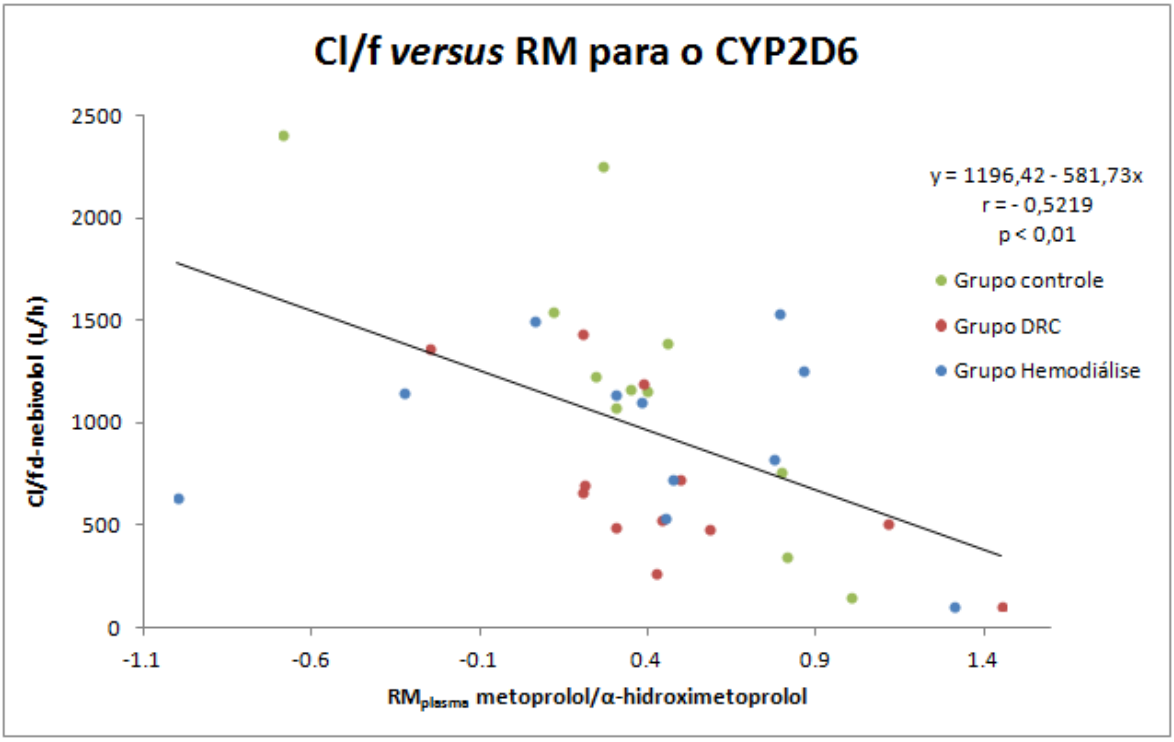


Figura 16: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *d*-nebivolol e a razão metabólica plasmática do metoprolol/α-hidroximetoprolol (n=34 pacientes fenotipados como EM).

4.7 Correlações entre parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol *versus* peso e *clearance* da creatinina

As Figuras 17 e 18 mostram ausência de correlação (p>0,05) entre o *clearance* aparente (Cl/f) dos isômeros do nebivolol e o peso dos pacientes dos três Grupos estudados (n=35).

As Figuras 19 e 20 mostram ausência de correlação (p>0,05) entre o *clearance* aparente (Cl/f) dos isômeros do nebivolol e o *clearance* da creatinina corrigido pela área superficial corporal dos pacientes incluídos no estudo (n=35).

As Figuras 21 e 22 mostram ausência de correlação (p>0,05) entre o Vd/f dos isômeros do nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

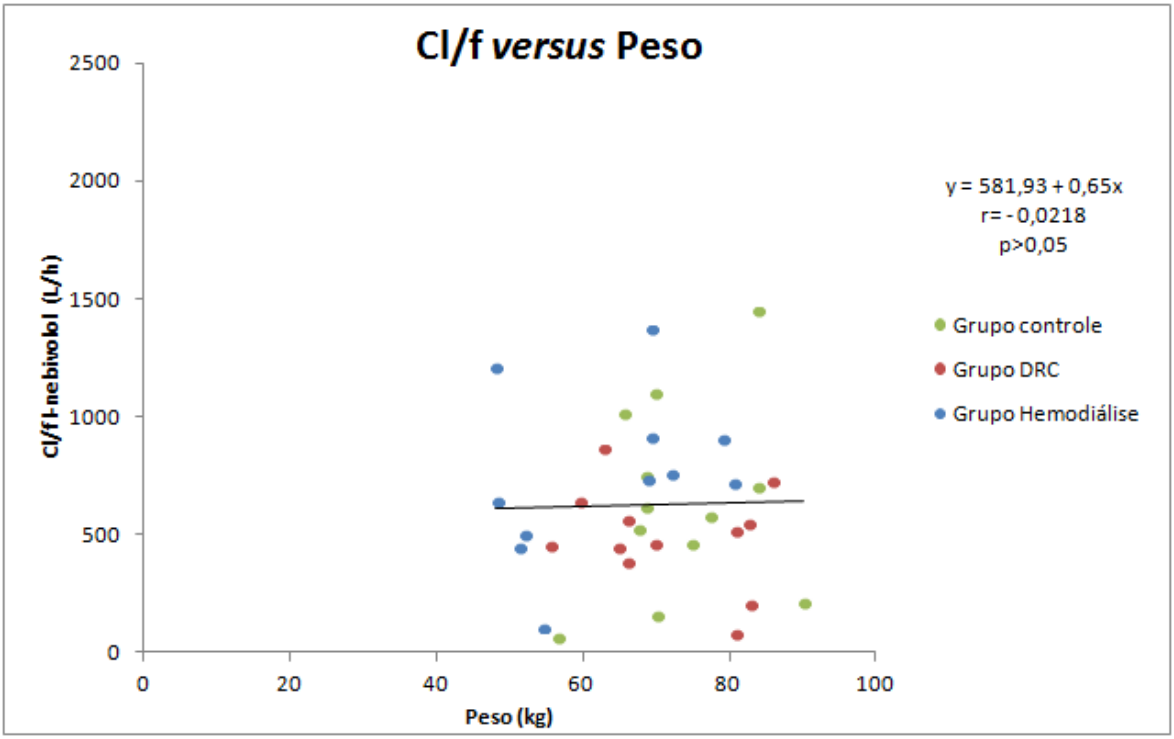


Figura 17: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *l*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

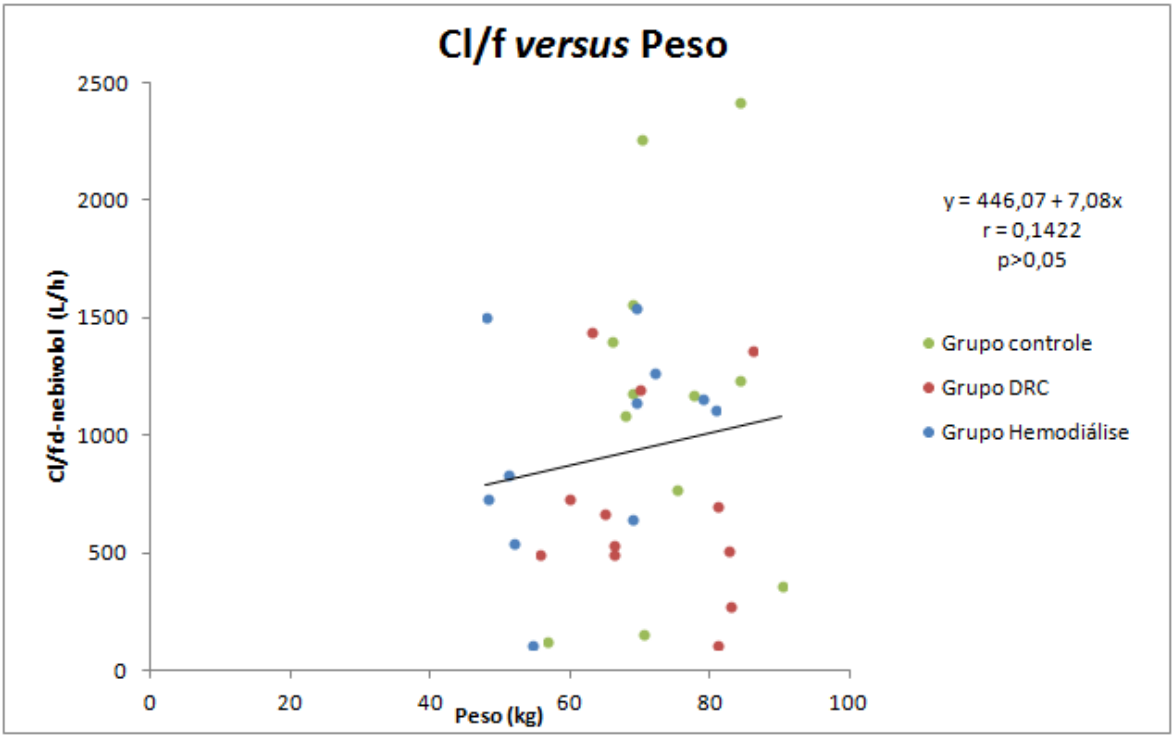


Figura 18: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *d*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

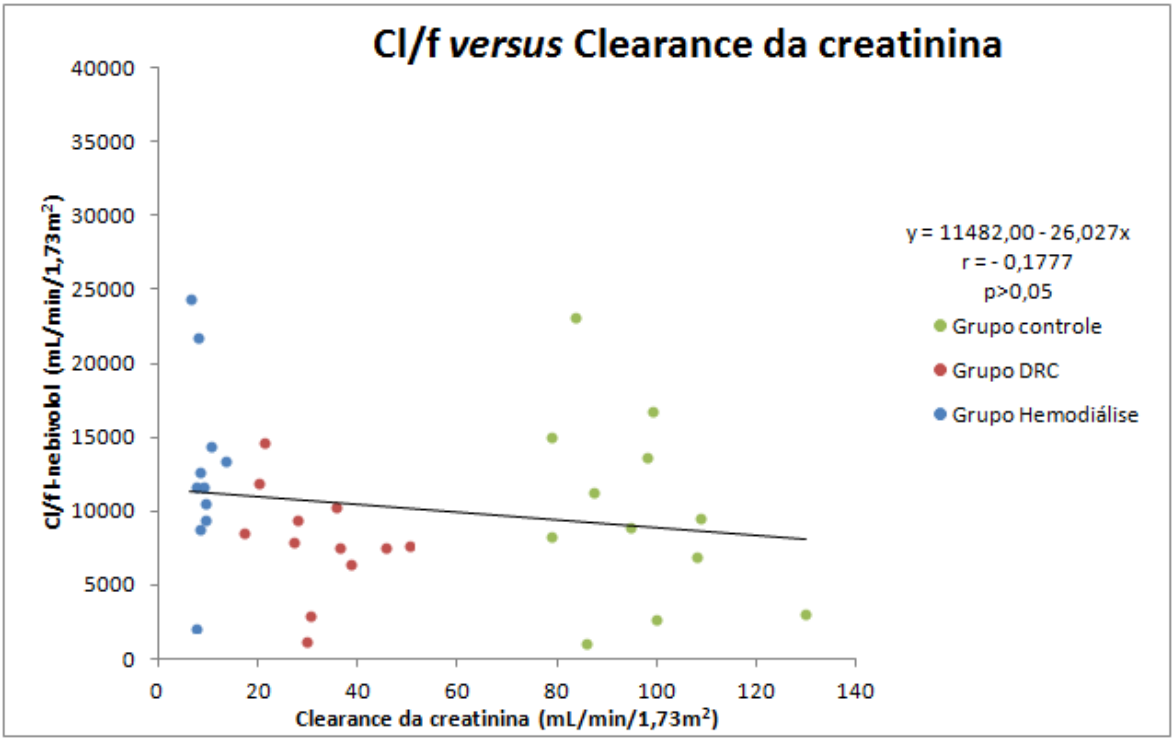


Figura 19: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *l*-nebivolol e o *clearance* da creatinina de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

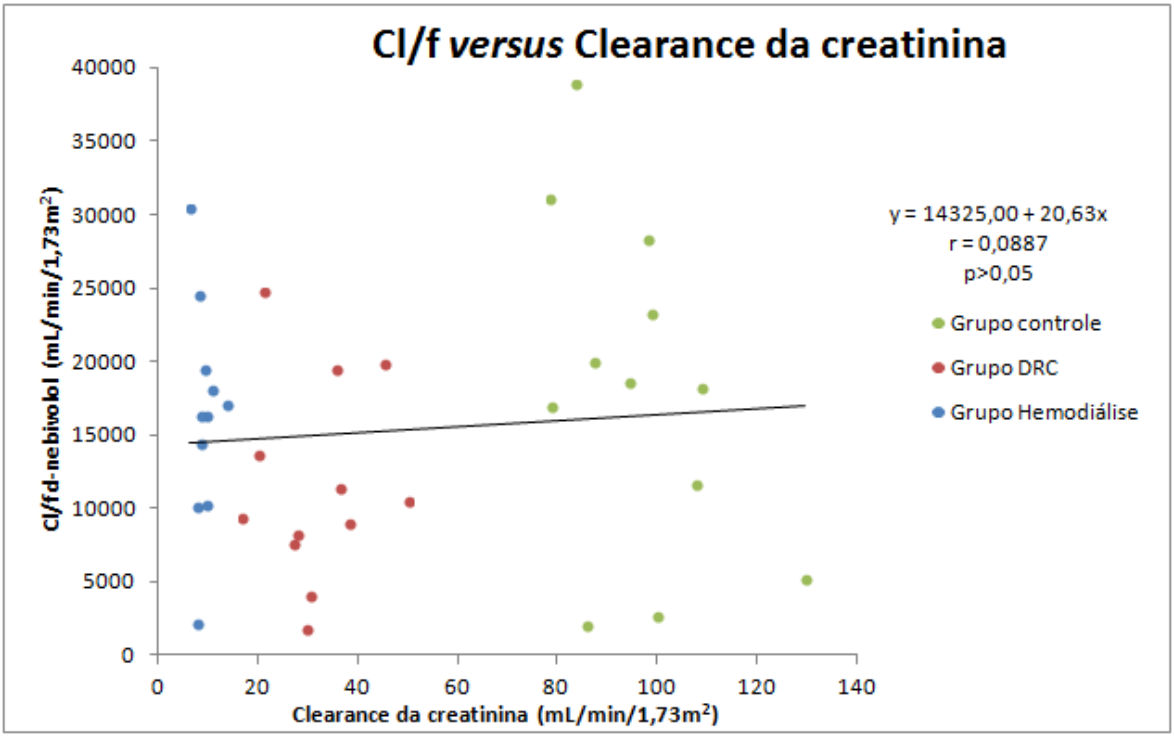


Figura 20: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o *clearance* aparente do isômero *d*-nebivolol e o *clearance* da creatinina de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

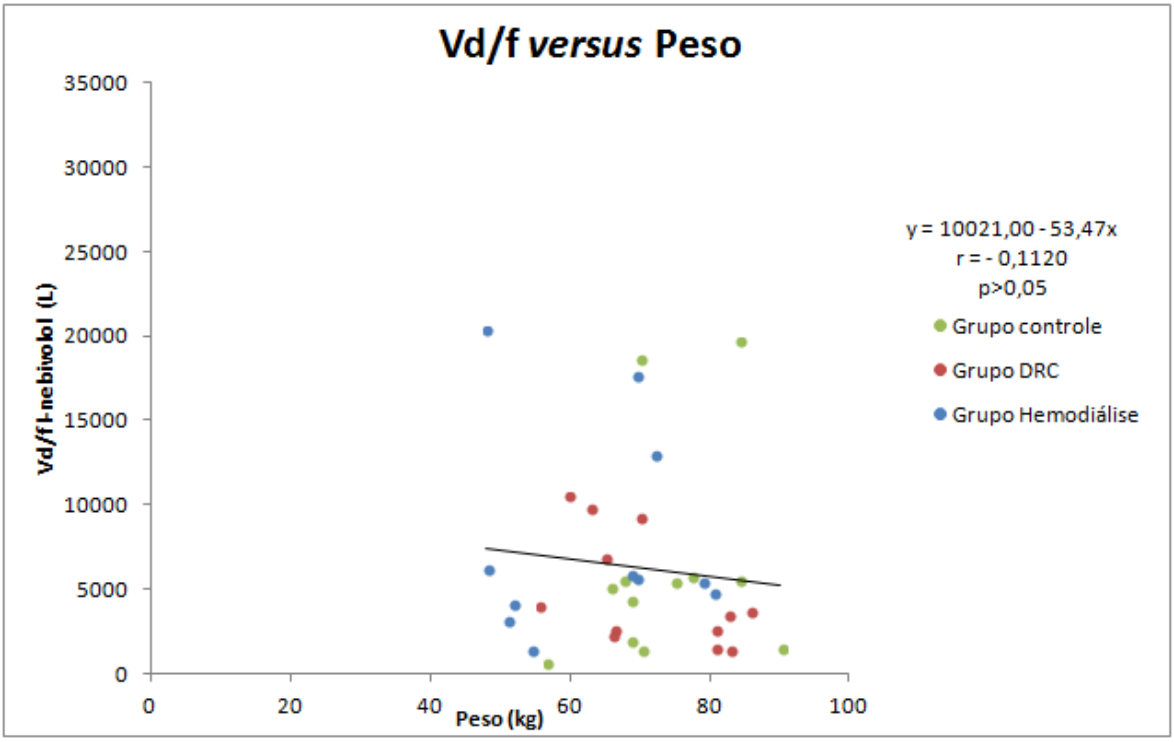


Figura 21: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o volume de distribuição aparente do isômero *l*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

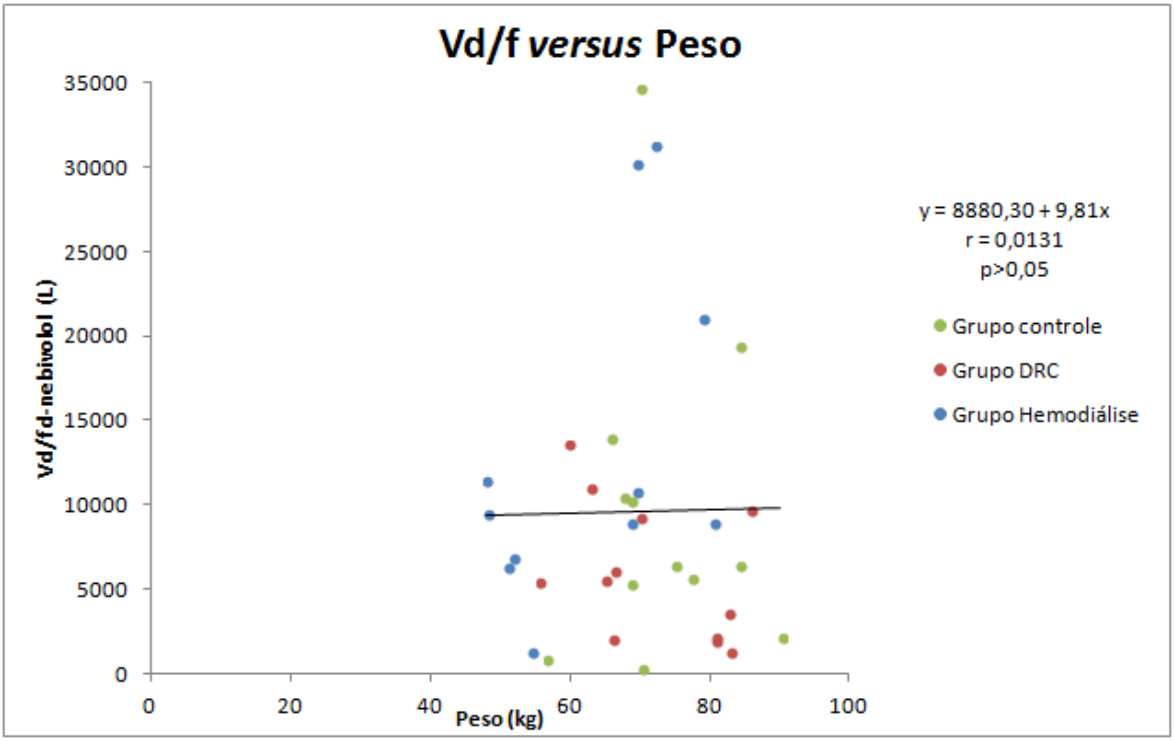


Figura 22: Gráfico e equação de regressão ortogonal e seu respectivo coeficiente de correlação r entre o volume de distribuição aparente do isômero *d*-nebivolol e o peso de todos os pacientes incluídos no estudo (n=35).

4.8 PK-PD do isômero *d*-nebivolol em função da variação da frequência cardíaca no teste de esforço isométrico com o *handgrip*.

As Figuras 23 e 24 e a Tabela 13 mostram para todos os pacientes incluídos no estudo e classificados como EM (n=34), os parâmetros obtidos na avaliação PK-PD. Na análise PK-PD não foi incluído o paciente classificado como PM em razão da obtenção de maior coeficiente de variação para os parâmetros analisados. A Figura 23 mostra a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico com o *handgrip* em função do tempo. Os dados mostram a alta variabilidade do parâmetro farmacodinâmico. A Figura 24 mostra a análise PK-PD (modelo Emax inibitório) relacionando a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico com o *handgrip* em função das concentrações plasmáticas do *d*-nebivolol. A Tabela 13 mostra os parâmetros Emax (efeito máximo) e EC50 (concentração plasmática de *d*-nebivolol que resulta em 50% do Emax) obtidos na análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função da variação na frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico com o *handgrip*. Os baixos valores de CV obtidos para ambos os parâmetros, Emax e EC50, permitem inferir a adequação dos dados obtidos ao modelo Emax inibitório.

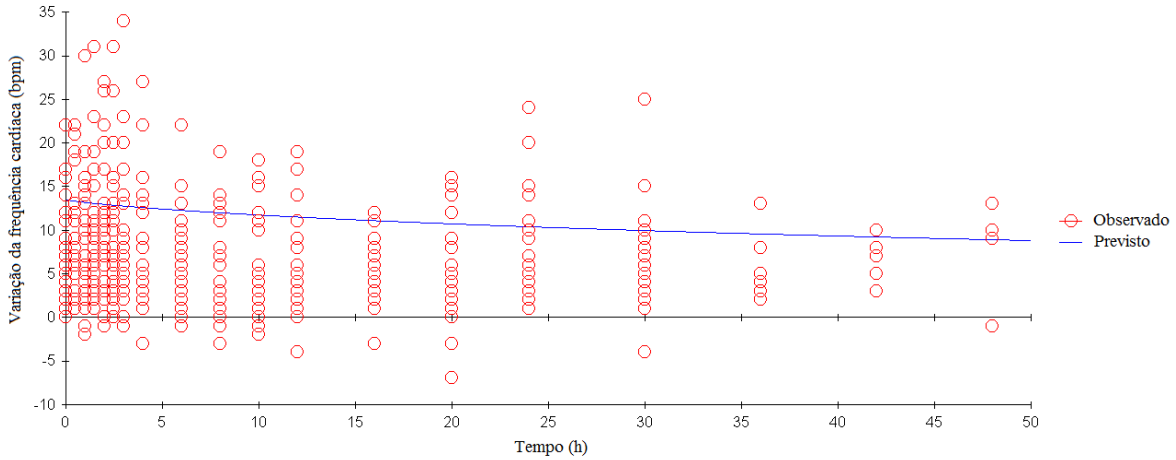


Figura 23: Curvas de variação da frequência cardíaca *versus* tempo para os pacientes investigados classificados como EM (n=34).

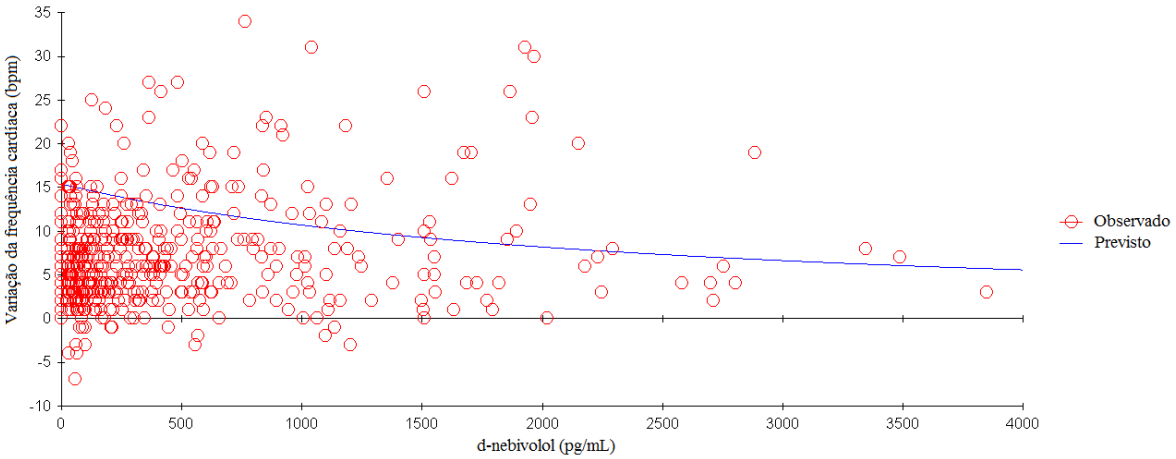


Figura 24: PK-PD (modelo Emax inibitório) do isômero *d*-nebivolol em função da variação da frequência cardíaca no teste de esforço isométrico com o *handgrip* incluindo todos os pacientes investigados classificados como EM (n=34).

Tabela 13: Parâmetros obtidos na análise PK-PD (modelo Emax inibitório) relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função da variação na frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico com o *handgrip* incluindo todos os pacientes investigados classificados como EM (n=34).

Parâmetro	Estimado	Desvio padrão	CV (%)
Emax (bpm)	15,42	0,68	4,38
EC50 (pg/mL)	2264,33	507,59	22,42

5.DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investiga a influência da DRC e da hemodiálise na disposição cinética e na relação PK-PD dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos. A investigação dos isômeros do nebivolol no plasma de pacientes tratados com dose única oral de 10mg do fármaco racêmico exigiu o desenvolvimento e a validação de um método empregando LC-MS/MS com sensibilidade para quantificar os isômeros do nebivolol até 48h após administração do fármaco.

Inicialmente, a farmacocinética dos isômeros do nebivolol foi descrita por Van Peer et al. (1991). Durante o estudo foram analisados plasma de voluntários EM e PM tratados com doses crescentes de nebivolol de 5mg a 30mg, doses diárias de 5mg e administração de dose intravenosa de 0,5mg. Na análise do nebivolol, os autores empregaram o radioimunoensaio estereoespecífico, um método que não discrimina os isômeros do nebivolol dos seus metabólitos hidroxilados, entretanto foi relatado uma grande diferença na biodisponibilidade entre voluntários EM (12%) e PM (96%) e maiores valores de AUC para o isômero *l*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados, com razões de AUC *l/d* de aproximadamente 2. O mesmo método foi empregado por Himmelmann et al. (1996) na investigação de pacientes hipertensos tratados com doses diárias de 5 mg de nebivolol racêmico durante 4 semanas e por Cheymol et al. (1997) na avaliação da enantiosseletividade na farmacocinética do nebivolol em pacientes obesos tratados dose única intravenosa do fármaco (0,073 mg/Kg de peso corporal ideal). Os valores de AUC reportados nestes dois últimos estudos foram maiores para o *l*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados do que para o *d*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados, respectivamente 212,0 *vs* 104,0 ng.h/mL (HIMMELMANN et al., 1996) e 147,4 *vs* 123,3 ng.h/mL (CHEYMOL et al., 1997).

A primeira separação dos isômeros do nebivolol em coluna de fase quiral foi reportada por Aboul-Enein; Ali (2001). Os autores usaram colunas constituídas de amilose carbamato (Chiralpak® AD e Chiralpak® AD-RH) e fases móveis compostas por metanol, etanol, 1-

propanol, 2-propanol e 1-butanol. As fases móveis metanol, etanol e 1-propanol na coluna Chiralpak® AD ou qualquer uma das fases móveis na coluna Chiralpak® AD-RH resultaram em eluição dos isômeros na sequência *d*-nebivolol e *l*-nebivolol. No entanto, a ordem de eluição dos isômeros do nebivolol na coluna Chiralpak® AD foi invertida, ou seja, os isômeros foram eluídos na sequência *l*-nebivolol e *d*-nebivolol com o emprego das fase móveis 2-propanol e 1-butanol.

Lindamood et al. (2011) descreveram a farmacocinética dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios em estudos de interação com hidroclorotiazida, furosemida, ramipril, digoxina, warfarina, losartana e fluoxetina. Os autores citam que os isômeros do nebivolol foram quantificados no plasma dos voluntários sadios empregando LC-MS/MS, embora não haja descrição, validação ou qualquer referência relativa ao método analítico empregado. Os autores apenas citam que a linearidade do método foi de 20-1500 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma, no entanto, os parâmetros farmacocinéticos foram descritos como mistura isomérica, estimados usando a soma da concentração plasmática do *d*-nebivolol e *l*-nebivolol. As concentrações plasmáticas dos isômeros individuais do nebivolol em função do tempo, obtidas após a administração de dose única de 10 mg do fármaco racêmico administrado sob monoterapia ou associado a fluoxetina, são mostradas apenas em uma figura, a qual permite estimar concentrações plasmáticas máximas de aproximadamente 700 pg/mL para o *d*-nebivolol e 1300 pg/mL para o *l*-nebivolol.

Os isômeros do nebivolol no presente estudo foram separados na coluna Chirobiotic® V (Sigma-Aldrich), com partículas de 5 µm (250 x 4,6 mm) empregando a fase móvel metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min a 24°C. Os isômeros foram eluídos do sistema LC-MS/MS com tempos de retenção de 13,79 e 14,90 min, sendo que o primeiro isômero eluido foi o *l*-nebivolol seguido de seu antípoda *d*-nebivolol (Figura 8). A ordem de eluição dos isômeros nesta sequência foi determinada pela análise individual do isômero puro *d*-nebivolol (SRRR).

A análise dos isômeros do nebivolol foi realizada no sistema LC-MS/MS monitorando as transições 406>151 para o nebivolol e 264>58 para o padrão interno (tramadol). Esses dados estão de acordo com os estudos relatados por Ramakrishna et al. (2005) e Selvan et al. (2007) empregando LC-MS/MS na análise do nebivolol em plasma como mistura isomérica. Entretanto, os estudos realizados por Ramakrishna et al. (2005) e Selvan et al. (2007) mostram a utilização de colunas não quirais, portanto não discriminam os isômeros do nebivolol.

O método desenvolvido foi avaliado quanto ao efeito matriz comparando as áreas dos picos obtidas na injeção de soluções padrão em fase móvel com as áreas dos picos obtidas na injeção de extratos de plasma branco (oriundos de seis diferentes voluntários) adicionados de soluções padrão de nebivolol e padrão interno. Os dados apresentados na Tabela 2 indicam que o efeito matriz não resulta em perda significativa do sinal para os isômeros do nebivolol ou para o padrão interno. Os dados mostram valores maiores que 80% quando foram comparadas as áreas dos picos resultantes da injeção direta das soluções padrão com os picos resultantes da injeção dos extratos de plasma branco enriquecidos com as soluções padrão.

O método de análise dos isômeros do nebivolol apresentou linearidade no intervalo de concentrações plasmáticas de 25-2500 pg de cada isômero/mL (coeficientes de correlação maiores que 0,99); Tabela 4. O limite de quantificação (LIQ) para ambos os isômeros do nebivolol foi de 25 pg/mL de plasma (Tabela 4), utilizando alíquotas de 2 mL de plasma no procedimento de extração. Este LIQ permitiu a análise dos isômeros do nebivolol até 48h após a administração de dose única de 2 comprimidos de 5 mg de nebivolol racêmico para todos os pacientes investigados. O estudo de Lindamood et al. (2011) empregando LC-MS/MS relata limite de quantificação de 20 pg/mL para a análise dos isômeros do nebivolol apesar de não mostrar a validação do método, enquanto os métodos que empregam radioimunoensaio, que não diferenciam o fármaco inalterado dos metabólitos hidroxilados, reportam limites de detecção de 1 ng de cada isômero/mL de plasma (HIMMELMANN et al., 1996) ou de 0,1 ng/mL de plasma

(CHEYMOL et al., 1997). Os métodos descritos para a análise do nebivolol em plasma como mistura isomérica que utilizam LC-MS/MS relatam limite de detecção de 10 pg de nebivolol/mL de plasma (RAMAKRISHNA et al., 2005) e limite de quantificação de 10 pg de nebivolol/mL de plasma (SELVAN et al., 2007).

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e inexatidão intra e inter-corridas (Tabela 4) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. O nebivolol demonstrou estabilidade em plasma humano durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4h em temperatura ambiente e após o processamento durante 12 h no auto-injetor a 5^0C, já que foram revelados desvios inferiores a 15% (Tabela 3).

A extração dos isômeros do nebivolol do plasma humano em meio alcalino empregando como solvente extrator éter di-isopropílico:diclorometano (70:30, v/v) mostra valores de recuperação (Tabela 4) acima de 90% para ambos isômeros do nebivolol. Ramakrishna et al. (2005) relatam recuperação de 73,4% do nebivolol plasmático utilizando como solvente extrator a mesma proporção de éter di-isopropílico: diclorometano. Selvan et al. (2007) ao utilizarem precipitação proteica com acetonitrila obtiveram recuperação dos isômeros do nebivolol próximas a 85%.

O nebivolol mostra metabolismo complexo com capacidade de hidroxilação dependente do polimorfismo genético tipo CYP2D6. As concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio de *d*-nebivolol e *l*-nebivolol são, respectivamente, 10 e 15 vezes maiores em PM quando comparadas com EM para o CYP2D6 (LEFEBVRE et al., 2006). O estudo de Cheymol et al. (1997) reporta que o metabolismo do *l*-nebivolol é mais influenciado pelo polimorfismo genético tipo CYP2D6 do que o metabolismo do *d*-nebivolol. Com base nestes relatos, no presente estudo a influência da DRC e da hemodiálise na farmacocinética e farmacodinâmica do nebivolol foi avaliada somente entre os pacientes fenotipados como EM do CYP2D6.

O metoprolol é um fármaco marcador da atividade do CYP2D6. Sohn et al. (1992) reportam que valores de log_{10} das concentrações plasmáticas metoprolol/α-hidroximetoprolol inferiores a 1,5 designam o fenótipo de EM e valores superiores a 1,5 designam o fenótipo de PM do CYP2D6. Com base nestes dados, no presente estudo foram incluídos 35 pacientes, dos quais 34 foram fenotipados como EM do CYP2D6 (Tabela 5). Os valores de log_{10} das concentrações plasmáticas metoprolol/α-hidroximetoprolol para os pacientes do Grupo controle (n=11) variaram entre -0,69 a 1,00, para os pacientes do Grupo DRC (n=12) entre -0,25 a 1,45 e para os pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11) entre -1,00 a 1,31. Dos 35 pacientes investigados, apenas um paciente do Grupo controle apresentou concentrações plasmáticas de α-hidroximetoprolol abaixo do limite de quantificação do método de 10 ng/mL de plasma e, portanto, foi caracterizado como PM do CYP2D6.

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol foi avaliada nos pacientes do Grupo controle (n=12), Grupo DRC (n=12) e Grupo Hemodiálise (n=11). As concentrações plasmáticas de ambos os isômeros do nebivolol foram quantificadas (limites de quantificação de 25 pg de cada isômero/mL de plasma) até 48h após a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (Figuras 11, 12, 13 e 14).

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol nos pacientes hipertensos do Grupo controle (n=11) é enantiosseletiva (Teste de Wilcoxon $p<0,05$) com acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol (Tabela 7). Os valores de concentração plasmática máxima (1,32 *vs* 0,88 ng/mL) e de $AUC^{0-\infty}$ (8,02 *vs* 4,25 ng.h/mL) são maiores ($p<0,05$) para o *l*-nebivolol quando comparados ao *d*-nebivolol (Tabela 7). As razões isoméricas de AUC *l*-nebivolol/*d*-nebivolol mostram valores medianos de 1,76. Os dados obtidos na presente investigação não podem ser comparados com os estudos de investigação de pacientes hipertensos em que o nebivolol plasmático foi analisado empregando radioimunoensaio, considerando que os isômeros do nebivolol foram quantificados como a soma do fármaco inalterado e dos metabólitos

hidroxilados (HIMMELMANN et al., 1996). Cheymol et al. (1997) também quantificaram os isômeros do nebivolol empregando o radioimunoensaio, mas a dose administrada aos pacientes hipertensos foi por via intravenosa, fato que compromete a enantiosseletividade quando comparada com a via de administração oral. No entanto, Himmelmann et al. (1996) na investigação de pacientes hipertensos relataram enantiosseletividade com acúmulo plasmático do *l*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados em relação ao *d*-nebivolol e seus metabólitos hidroxilados. Com base nos dados de concentrações plasmáticas *vs* tempo apresentados por Lindamood et al. (2011) na investigação de voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico, os valores de Cmax também foram maiores para o *l*-nebivolol do que para o *d*-nebivolol, com concentrações máximas aproximadas de 1,30 ng/mL para o *l*-nebivolol e 0,70 ng/mL para o *d*-nebivolol.

O volume aparente de distribuição de ambos os isômeros do nebivolol nos pacientes do Grupo controle é muito alto, com valores de 5383,30 *vs* 6397,70 L, respectivamente para os isômeros *l* e *d*-nebivolol (Tabela 7). Os valores obtidos estão de acordo com Lindamood et al. (2011) na investigação de voluntários sadios fenotipados como EM do CYP2D6, com valores de volume aparente de distribuição para o nebivolol como mistura isomérica de 11467 L. Os valores de *clearance* aparente também são altos e indicativos de extenso metabolismo hepático. Os valores de *clearance* aparente obtidos para os pacientes hipertensos do Grupo controle foram respectivamente de 623,58 *vs* 1176,40 L/h, para os isômeros *l* e *d*-nebivolol (Tabela 7), enquanto o valor como mistura isomérica relatado por Lindamood et al. (2011) na investigação de voluntários sadios fenotipados como EM do CYP2D6 foi de 757 L/h.

A farmacocinética dos isômeros do nebivolol no paciente do Grupo controle fenotipado como PM, difere dos dados apresentados para os pacientes do Grupo controle (n=11) fenotipados como EM. Os dados apresentados na Tabela 8 permitem inferir razão isomérica de AUC *l/d* de 4,77 com demonstração de acúmulo plasmático preponderante do isômero *l*-nebivolol. Os dados

ainda permitem inferir drástica redução nos valores de *clearance* oral aparente de ambos os isômeros do nebivolol, com valores de 67,54 *vs* 122,07 L/h, respectivamente para os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol, representando aproximadamente 10,8 e 10,4% dos valores de *clearance* oral obtidos para os pacientes do grupo controle fenotipados como EM.

O metabolismo do nebivolol é dependente do CYP2D6, uma enzima com atividade dependente de polimorfismo genético. Van Peer et al. (1991) relatam que a alta eliminação pré-sistêmica do nebivolol é responsável por sua baixa biodisponibilidade (12%) em pacientes EM, enquanto em pacientes PM os valores de biodisponibilidade atingem 96%, sugerindo que a redução nos valores de *clearance* oral de ambos os isômeros do nebivolol no paciente PM investigado é decorrente principalmente do aumento da biodisponibilidade.

Os pacientes incluídos no Grupo DRC apresentavam estágios 3 e 4 com valores de *clearance* da creatinina como mediana de 33,85 mL/min/1,73m^2 e com valores individuais (n=12) entre 14,90-55,89 mL/min/1,73m^2 (Tabela 9 e Tabela I do Apêndice B). Os pacientes do Grupo DRC foram caracterizados como não obesos e apresentavam valores de IMC com mediana de 28,93 Kg/m^2 (Tabela 6). Todos os pacientes do Grupo DRC foram caracterizados como EM para o CYP2D6 (Tabelas 5 e 6). Os parâmetros farmacocinéticos do *l*-nebivolol e *d*-nebivolol para os pacientes do Grupo DRC tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico, permitem inferir à semelhança do Grupo controle, maiores valores de Cmax (2,40 *vs* 1,67 ng/mL) e AUC (10,20 *vs* 8,37 ng.h/mL) para o isômero *l*-nebivolol (Teste de Wilcoxon $p<0,05$; Tabela 9). A comparação dos parâmetros farmacocinéticos de ambos os isômeros do nebivolol entre os pacientes do Grupo controle e os pacientes do Grupo DRC, não mostra diferenças com significância estatística (Tabelas 11 e 12). No entanto, Shaw et al. (2005) relatam aumento progressivo nos valores de AUC do nebivolol como mistura isomérica em função da redução da função renal em pacientes tratados com dose única oral de 5mg de nebivolol racêmico. Os autores relatam valores de AUC para a mistura isomérica do nebivolol,

respectivamente, de 6,59; 4,55; 11,28 e 23,36 ng.h/mL para voluntários sadios, pacientes com DRC leve, pacientes com DRC moderada e pacientes com DRC grave.

Os valores de *clearance* oral aparente (Cl/f) de 491,51L/h para o *l*-nebivolol e 604,58 L/h para o *d*-nebivolol (Tabela 9) obtidos para os pacientes do Grupo DRC (n=12) estão de acordo com aqueles relatados como mistura isomérica por Shaw et al. (2005) na investigação de pacientes com DRC moderada (738 L/h).

O estudo de Michaud et al. (2005) mostra que o soro de pacientes com DRC contém fatores urêmicos (paratormônio, citocinas) que reduzem o conteúdo de CYP dos hepatócitos de ratos normais. Estes mediadores diminuem a expressão proteica de várias isoformas CYP (CYP1A2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D1/2D2, CYP3A2 e CYP4A1/4A3), de maneira secundária aos níveis reduzidos de mRNA. Ressalta-se que os autores observaram uma forte correlação entre a gravidade da DRC e a redução do CYP hepático. Os autores também relatam forte correlação entre a concentração do paratormônio no soro e a redução na expressão do CYP.

Considerando que o nebivolol é um fármaco com eliminação dependente do metabolismo oxidativo e da capacidade de glicuronidação (HENDRICKX et al., 1996) e considerando que estudos experimentais e clínicos relatam que a DRC em função de alterações na expressão do mRNA em resposta aos fatores urêmicos presentes no soro está associada com sub-regulação de enzimas CYP, enzimas UGT e de proteínas transportadoras como a Pgp intestinal e a OATP hepática (SUN; FRASSETO; BENET, 2006; NAUD et al., 2008; DREISBACH, 2009; MOMPER; VENKATARAMANAN; NOLIN; 2010; NAUD et al. 2012), o resultado esperado seria o aumento dos valores de Cmax e AUC de ambos os isômeros do nebivolol, assim como a redução dos valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros (MOMPER; VENKATARAMANAN; NOLIN; 2010). No entanto, a ausência de diferenças com significância estatística nos parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol entre os Grupos Controle e DRC pode ser explicada provavelmente em função dos estágios 3 e 4 dos

pacientes investigados, os quais ainda não mostram acúmulo de fatores urêmicos compatíveis com a sub-regulação das enzimas evolvidas no metabolismo do nebivolol. Estudos anteriores mostram que as alterações na atividade enzimática são mais pronunciadas em pacientes com DRC estágio 5 (*clearance* da creatinina <15mL/min/1,73m^2), ou seja, quanto maior a concentração de fatores urêmicos, menor será a atividade enzimática e a atividade dos transportadores envolvidos no *clearance* não renal de fármacos (NAUD et al., 2012). Adicionalmente, ainda não há dados na literatura reportando quais ou qual transportador, se é que o nebivolol sofre a ação de transportadores ou qual tipo de enzima (UGT) participa das reações de conjugação com o ácido glicurônico no metabolismo do nebivolol no homem.

Além do estágio da DRC, outro fator que merece destaque para explicar a ausência de diferenças nos parâmetros farmacocinéticos de ambos os isômeros do nebivolol entre os Grupos controle e DRC, é o fato de que o grau de inibição do CYP2D em pacientes com DRC parece variável (DREISBACH; LERTORA, 2008). Embora o estudo de Rostami-Hodjegan et al. (1999) mostre redução da atividade do CYP2D6 em paralelo com a progressão do estágio da DRC, Nolin (2008) relata que o metabolismo do propranolol dependente do CYP2D6 não é alterado em pacientes com DRC em estágios iniciais, mas é reduzido de maneira aguda em pacientes no estágio 5.

A disposição cinética do nebivolol nos pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11) é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol (Tabela 10). Os valores de concentração plasmática máxima (1,35 *vs* 0,78 ng/mL) e de $AUC^{0-\infty}$ (6,74 *vs* 4,50 ng.h/mL) são maiores ($p<0,05$) para o *l*-nebivolol quando comparados ao *d*-nebivolol. As razões isoméricas de AUC *l*-nebivolol/*d*-nebivolol mostram valores médios de 1,29.

Os valores de *clearance* oral aparente (Cl/f) de 742,26L/h para o *l*-nebivolol e 1112,10 L/h para o *d*-nebivolol (Tabela 10) obtidos para os pacientes do Grupo Hemodiálise (n=11) não

mostram diferenças com significância estatística entre os Grupos controle (623,58 *vs* 1176,40 L/h) e DRC (491,51 *vs* 604,58 L/h).

Considerando que a redução no *clearance* não renal de fármacos é dependente da concentração sérica de fatores urêmicos, tais como o paratormônio, (MOMPER; VENKATARAMANAN; NOLIN; 2010) e considerando que os pacientes em hemodiálise eliminam pelo menos parcialmente os fatores urêmicos, é provável que a atividade de enzimas e transportadores seja restaurada em pacientes em hemodiálise. Momper et al. (2010) relatam que a hemodiálise restaura de maneira aguda os valores de *clearance* hepático da eritromicina, sugerindo que os fatores urêmicos dialisados podem diretamente e de maneira aguda reverter a inibição no metabolismo e na atividade de transportadores em pacientes com DRC estágio 5. Logo, os valores de Cl/f dos isômeros do nebivolol, assim como os demais parâmetros farmacocinéticos obtidos para os pacientes do Grupo Hemodiálise, não diferem entre os Grupos controle e DRC investigados.

Os dados obtidos no presente estudo para os pacientes fenotipados como EM incluídos nos Grupos controle, DRC e Hemodiálise, mostram correlação direta ($p<0,01$) (Figuras 15 e 16) entre as variáveis Cl/f dos isômeros *l*-nebivolol ou *d*-nebivolol e a atividade *in vivo* do CYP2D6 avaliada através da RM_{plasma} metoprolol/α-hidroximetoprolol. Portanto, os pacientes fenotipados como EM diferem em termos da atividade do CYP2D6 e como consequência exibem diferentes valores de Cl/f para ambos os isômeros do nebivolol. Logo, os dados obtidos na presente investigação mostram que a atividade do CYP2D6 é preponderante à presença da DRC estágios 3 e 4 nos valores de Cl/f de ambos os isômeros do nebivolol.

Os dados obtidos no presente estudo para todos os pacientes investigados (Grupos controle, DRC e Hemodiálise) ainda mostram ausência de correlação significativa ($p>0,05$) entre os valores de Cl/f de ambos os isômeros do nebivolol e o peso dos pacientes (Figuras 17 e 18), como também entre os valores de Cl/f de ambos os isômeros do nebivolol e o *clearance* da

creatinina (Figuras 19 e 20). Também não foi observada correlação significativa ($p>0,05$) entre os valores de volume aparente de distribuição de ambos os isômeros do nebivolol e o peso dos pacientes (Figuras 21 e 22).

Considerando que o nebivolol é um β bloqueador altamente cardiosseletivo, no presente estudo a sua farmacodinâmica foi avaliada empregando como parâmetro a variação da frequência cardíaca utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima. A variação da frequência cardíaca foi determinada entre o valor observado após 2min de exercício isométrico e o valor observado 1 min antes da realização do exercício isométrico (VAN NUETEN; DE CRÉE, 1998; KUBO et al.; 2001). O exercício isométrico com o *handgrip* modifica o controle barorreflexo da pressão arterial, com isso há aumento da pressão arterial acompanhado por aumento da frequência cardíaca e da resistência vascular periférica na musculatura esquelética em repouso (KAMIYA et al., 2001). A variação da frequência cardíaca em função do tempo está apresenta na Figura 23 para todos os pacientes investigados fenotipados como EM (n=34). A variação da frequência cardíaca foi obtida após a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico e avaliada até 48 h após a administração do fármaco. Os dados apresentados na Figura 23 permitem observar grande variabilidade no parâmetro farmacodinâmico, fato que impossibilitou a análise dos Grupos individuais controle, DRC e Hemodiálise.

O modelo Emax inibitório foi empregado para descrever a análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função da variação da frequência cardíaca (Figura 24). Na análise PK-PD foram incluídos todos os pacientes EM investigados (n=34). Ressalta-se, no entanto, que os metabólitos hidroxilados dependentes da atividade do CYP2D6 são considerados equipotentes ao *d*-nebivolol em termos do bloqueio do receptor β_1 e que a soma do nebivolol inalterado e dos metabólitos hidroxilados é similar entre pacientes fenotipados para o CYP2D6 como EM ou PM (LEFEBVRE et al., 2006).

O modelo Emax inibitório mostrou-se o mais adequado em função da obtenção dos menores valores de coeficientes de variação para os parâmetros Emax e EC50. Os pacientes investigados (n=34) mostram valores de Emax de 15,42 bpm (desvio padrão 0,68 bpm) e de EC50 de 2,26 ng/mL (desvio padrão 0,51 ng/mL), seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (Tabela 13). Duprez et al. (1991) relatam variações da frequência cardíaca de 8, 10 e 7 bpm, respectivamente, após 3, 8 e 23 h após a administração de 5 mg de nebivolol a voluntários sadios. No entanto, o presente estudo difere do estudo reportado por Duprez et al. (1991) tanto em termos da dose do nebivolol (10 mg *vs* 5 mg), quanto em termos das diferenças observadas nas condições do teste isométrico (30% *vs* 50% da contratilidade máxima e 2 *vs* 3 min de exercício isométrico) e dos pacientes investigados (Grupos controle + DRC + Hemodiálise *vs* voluntários sadios).

Concluindo, o presente estudo mostra que a farmacocinética do nebivolol é estereosseletiva com acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol responsável pelo efeito vasodilatador, que a DRC estágios 3 e 4 e a Hemodiálise não alteram a farmacocinética de ambos os isômeros do nebivolol, que o volume aparente de distribuição de ambos os isômeros do nebivolol não mostra correlação com o peso dos pacientes, assim como os valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros não mostram correlação com o peso ou com os valores de *clearance* da creatinina dos pacientes investigados. No entanto, os valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros do nebivolol mostram correlação significativa com a atividade do CYP2D6 avaliada através da RM_{plasma} metoprolol/α-hidroximetoprolol. O parâmetro farmacodinâmico variação da frequência cardíaca, utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima, mostrou grande variabilidade entre os pacientes investigados, mas quando empregado para descrever a análise PK-PD em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol (modelo Emax inibitório) mostrou valores de Emax de 15,42 bpm e de EC50 de 2,26 ng/mL, seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.

6.CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1-O método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma, empregando a coluna de fase quiral Chirobiotic® V acoplada ao sistema LC-MS/MS, é sensível (limite de quantificação de 25pg/mL), preciso e exato (coeficiente de variação e erros relativos < 15%), permitindo a quantificação dos isômeros até 48h após a administração de dose única de 10mg do fármaco racêmico.

2-A farmacocinética do nebivolol, avaliada em pacientes hipertensos com função renal normal, pacientes com DRC estágios 3 e 4 e pacientes em Hemodiálise, é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol quando comparado ao isômero *d*-nebivolol.

3-O paciente fenotipado como PM do CYP2D6 mostra acúmulo plasmático preponderante para o isômero *l*-nebivolol e drástica redução dos valores de *clearance* oral aparente de ambos os isômeros do nebivolol.

4-A DRC estágios 3 e 4 e a Hemodiálise não alteram a farmacocinética de ambos os isômeros do nebivolol.

5-O *clearance* aparente de ambos os isômeros do nebivolol mostra correlação significativa com a razão metabólica metoprolol/α-hidroximetoprolol no plasma dos pacientes investigados.

6-O volume aparente de distribuição de ambos os isômeros do nebivolol não mostra correlação com o peso dos pacientes, assim como os valores de *clearance* aparente de ambos os isômeros não mostram correlação com o peso ou com os valores de *clearance* da creatinina dos pacientes investigados.

7- O parâmetro farmacodinâmico variação da frequência cardíaca, utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima, mostrou grande variabilidade entre os pacientes investigados.

8-O modelo Emax inibitório foi considerado adequado para relacionar a variação na frequência cardíaca em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol (Emax de 15,42 bpm e de EC50 de 2,26 ng/mL), seguindo a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico aos pacientes investigados.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO – RE n° 899 – Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

BAKRIS, G.L.; HART, P.; RITZ, E. Beta blockers in the management of chronic kidney disease. **Kidney Int.,** Chicago, v. 70, n.11, 1905-1913, 2006.

BASTOS, R.M.R., BASTOS, M.G., RIBEIRO, L.C., BASTOS, R.V., TEIXEIRA, M.T.B. Prevalence of chronic kidney disease, stages 3, 4 and 5 in adults. **Rev. Assoc. Med. Bras.,** Juiz de Fora, v.55, n.1, p.40-44, 2009.

BAUER, L.A. **Applied clinical pharmacokinetics**. United States of America, McGraw-Hill, 2001.

BRISTOW, M.R.; NELSON, P.; MINOBE, W.; JOHNSON, C**.** Characterization of β_1-adrenergic receptor selectivity of nebivolol and various other beta-blockers in human myocardium. **Am. J. Hypertens.,** P. 121, 2005.

BRIXIUS, K.; BUNDKIRCHEN, A.; BÖLCK, B.; MEHLHORN, U.; SCHWINGER, R.H. Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. **Br. J. Pharmacol.**, Cologne, v.133, n.8, p.1330-1338, 2001.

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

DOWLING, T.C., BRIGLIA, A.E., FINK, J.C., HANES, D.S., LIGHT, P.D., STACKIEWICZ, L., KARYEKAR, C.S., EDDINGTON, N.D., WEIR, M.R., HENRICH W.L. Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. C**lin. Pharmacol. Ther.,** Baltimore, v.73, n.5, p.427-434, 2003.

DREISBACH, A. W.; JAPA, S.; GEBREKAL, A. B.; MOWRY, S. E.; LERTORA, J.J.; KAMATH, B.L.; RETTIE, A.E. Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. **Clin. Pharmacol. Ther.,** St. Louis, v.73, n.5, p.475-477, 2003.

DREISBACH, A.W. The influence of chronic renal failure on drug metabolism and transport. **Clin. Pharmacol. Ther.,** Mississipi, v.86, n.5, p.553-556, 2009.

DREISBACH, A.W.; LERTORA, J.J. The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.,** Mississipi, v.4, n.8, p.1065-1074, 2008.

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

DUPREZ, D.; LEFEBVRE, R.; DE BACKER, T.; DE SUTTER, P.; TROUERBACH, J.;,CLEMENT, D.L. Influence of nebivolol on the cardiovascular hemodynamics during postural changes and isometric exercise. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, Gentv. 5, n.4, p.709-717, 1991.

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

FAQAH, A.; JAFAR, T.H. Control of blood pressure in chronic kidney disease: how long to go? **Nephron. Clin. Pract.,** Basel, v.119, n.4, p. c324-331, 2011.

FRANCZYK-SKÓRA, B.; GLUBA, A.; BANACH, M.; KOZŁOWSKI, D.; MAŁYSZKO, J.; RYSZ, J. Prevention of sudden cardiac death in patients with chronic kidney disease. **BMC Nephrol.,** Lodz, v.13, p.162, 2012.

FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. **Eur. J. Clin. Pharmacol.,** Köln, v. 63, n.4, p.321-333, 2007.

FUX, R.; MÖRIKE, K.; PRÖHMER, A.M.; DELABAR, U.; SCHWAB, M.; SCHAEFFELER, E.; LORENZ, G.; GLEITER, C.H.; EICHELBAUM, M.; KIVISTÖ, K.T. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. **Clin. Pharmacol. Ther**., Tübingen, v. 78, n.4, p. 378-387, 2005.

GAO, Y.; NAGAO, T,; BOND, R.A.; JANSSENS, W.J.; VANHOUTTE, P.M. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. **J. Cardiovasc. Pharmacol**., Houston, v.17, n.6, p. 964-969, 1991.

GARBIN, U.; PASINI, A.F.; STRANIERI, C.; MANFRO, S.; BOCCIOLETTI, V.; COMINACINI, L. Nebivolol reduces asymmetric dimethylarginine in endothelial cells by increasing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) expression and activity. **Pharmacol. Res.,** Verona, v.56, n.6, p.515-521, 2007.

GRASSI, G.; QUARTI-TREVANO, F.; SERAVALLE, G.; ARENARE, F.; VOLPE, M.; FURIANI, S.; DELL'ORO, R.; MANCIA, G. Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. **Hypertension**, Monza, v.57, n.4, p.846-851, 2011.

GUPTA, S., WRIGHT, H.M. Nebivolol: a highly selective beta1-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitric oxide. **Cardiovasc. Ther.**, Jersey, v.26, n.3, p.189-202, 2008.

HART, P.D.; BAKRIS, G.L. Should beta-blockers be used to control hypertension in people with chronic kidney disease? **Semin. Nephrol.**, Chicago, v. 27, n.5, p.555-564, 2007.

HENDRICKX, J.; BOCKX, M.; ZWIJSEN, C.; BORGMANS, C.; MANNENS, G.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. Location of the hydroxyl functions in hydroxylated metabolites of nebivolol in different animal species and human subjects as determined by on-line high-performance liquid chromatography-diode-array detection. **J. Chromatogr. A.,** Beerse**,** v.5, n.729 (1-2), p.341-354, 1996.

HERZOG, C.A. Cardiac arrest in dialysis patients: approaches to alter an abysmal outcome. **Kidney Int. Suppl.**, Minnesota, v.63, v. 84, S197-200, 2003.

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

IGNARRO, L.J. Different pharmacological properties of two enantiomers in a unique beta-blocker, nebivolol. **Cardiovasc. Ther.,** Los Angeles, v.26, n.2, p.115-134, 2008.

K/DOQI. Clinical practice guidelines on hypertension and antihypertensive agents in chronic kidney disease. **Am. J. Kidney Dis.**, Boston, v. 43, supl. 1, s1-s290, 2004.

KAMALI, F.; HOWES, A.; THOMAS, S.H.; FORD, G.A.; SNOECK, E. A pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction study between nebivolol and the H2- receptor and ranitidine. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, New Castle, v.43, n.2, p.201-204, 1997.

KAMIYA, A., MICHIKAMI, D., FU, Q., NIIMI, Y., IWASE, S., MANO, T., SUZUMURA, A. Static handgrip exercise modifies arterial baroreflex control of vascular sympathetic outflow in humans. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** Nagoya, v.281, n.4, p.1134-1139, 2001.

KUBO, T.; AZEVEDO, E. R.; NEWTON, G. E.; PARKER, J. D.; FLORAS, J. S. Lack of evidence for peripheral alpha(1)-adrenoceptor blockade during long-term treatment of heart failure with carvedilol. **J. Am. Coll. Cardiol.,** Toronto, v. 38, n.5, p. 1463-1469, 2001.

LAM, Y.W.; BANERJI, S.; HATFIELD, C.; TALBERT, R.L. Principles of drug administration in renal insufficiency. **Clin. Pharmacokinet.,** Texas, v.32, n.1, p.30-57, 1997.

LEFEBVRE, J.; POIRIER, L.; POIRIER, P.; TURGEON, J.; LACOURCIERE, Y. The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essencial hypertension. **Br. J. Clin. Pharmacol.,** Québec, v.63, n.5, p.575-582, 2006.

LINDAMOOD, C.; ORTIZ, S.; SHAW, A.; RACKLET, R.; GORSKI, C. Effects of commonly administered agents and genetics on nebivolol pharmacokinetics drug-drug interaction studies. **J. Clin. Pharmacol.,** Jersey, v.51, n.4, p.575-585, 2011.

LUGON, J.R. End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil. **Ethn. Dis.**, Rio de Janeiro, v.19 (Suppl 1): S1-7-9, 2009.

MAFFEI, A.; DI PARDO, A.; CARANGI, R.; CARULLO, P.; POULET, R.; GENTILE, M.T.; VECCHIONE, C.; LEMBO, G. Nebivolol induces nitric oxide release in the heart through inducible nitric oxide synthase activation. **Hypertension,** Pozzilli, v.50, n.4, p.652-656, 2007.

MAFFEI, A.; VECCHIONE, C.; ARETINI, A.; POULET, R.; BETTARINI, U.; GENTILE, M. T.; CIFELLI, G.; LEMBO, G. Characterization of nitric oxide release by nebivolol and its metabolites. **Am. J. Hypertens.**, Rome, v.19, n.6, p.579-586, 2006.

MATSUE, Y.; SUZUKI, M.; NAGAHORI, W.; OHNO, M.; MATSUMURA, A.; HASHIMOTO, Y. Beta-blocker prevents sudden cardiac death in patients with hemodialysis. **Int. J. Cardiol.,** Kamogawa-shi, 2011. In Press.

MCNEELY, W.; GOA, K.L. Nebivolol in the management of essential hypertension: a review. **Drugs,** Auckland**,** v. 57, n.4, p.633-51, 1999.

MICHAUD, J.; DUBÉ, P.; NAUD, J.; LEBLOND, F.A.; DESBIENS, K.; BONNARDEAUX, A.; PICHETTE, V. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. **Br. J. Pharmacol.**, Montreal, v. 144, n.8, p.1067-1077, 2005.

MOMPER, J.D.; VENKATARAMANAN, R.; NOLIN, T.D. Nonrenal drug clearance in CKD: Searching for the path less traveled. **Adv. Chronic Kidney Dis.,** Pittsburgh, v.17, n.5, p.384-91, 2010.

MONINGKA, N.C.; TSAROVA, T.; SASSER, J.M.; BAYLIS, C. Protective actions of nebivolol on chronic nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension and chronic kidney disease in the rat: a comparison with angiotensin II receptor blockade. **Nephrol. Dial. Transplant.,** Florida**,** v.27, n.3, p.913-20, 2012.

NAUD, J., MICHAUD, J., LEBLOND, F.A., LEFRANCOIS, S., BONNARDEAUX, A., PICHETTE, V. Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. **Drug Metab. Dispos.,** Montreal, v.36, n.1, p.124-128, 2008.

NAUD, J.; NOLIN, T.D.; LEBLOND, F.A.; PICHETTE, V. Current understanding of drug disposition in kidney disease. **J. Clin. Pharmacol.,** Montreal, v.52, (1 Suppl), p.10S-22S, 2012.

NEIRYNCK, N.; VANHOLDER, R.; SCHEPERS, E.; ELOOT, S.; PLETINCK, A.; GLORIEUX, G. An update on uremic toxins. **Int. Urol. Nephrol.**, Guent, v.45, n.1, p.139-150, 2013.

NOLIN, T.D. Altered nonrenal drug clearance in ESRD. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, Portland, v.17, n.6, p.555-559, 2008.

NOLIN, T.D., APPIAH, K., KENDRICK, S.A., LE, P., MCMONAGLE, E., HIMMELFARB, J. Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Portland, v.17, n.9, p.2363-2367, 2006.

OELZE, M.; DAIBER, A.; BRANDES, R.P.; HORTMANN, M.; WENZEL, P.; HINK, U.; SCHULZ, E.; MOLLNAU, H.; VON SANDERSLEBEN, A.; KLESCHYOV, A.L.; MÜLSCH, A.; LI, H.; FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. **Hypertension,** Mainz, v.48, n.4, p.677-684, 2006.

PAUWELS, P.J.; VAN GOMPEL, P.; LEYSEN, J.E. Human beta 1- and beta 2-adrenergic receptor binding and mediated accumulation of cAMP in transfected Chinese hamster ovary cells. Profile of nebivolol and known beta-adrenergic blockers. **Biochem. Pharmacol.**, Beerse, v.42, n.9, p.1683-1689, 1991.

PICHETTE, V.; LEBLOND, F.A. Drug metabolism in chronic renal failure. **Curr. Drug Metab.**, Montreal, v.4, n.2, p.91-103, 2003.

PRISANT, L. M. Nebivolol: pharmacologic profile of an ultraselective, vasodilatory beta1-blocker. **J. Clin. Pharmacol.,** Augusta, v. 48, n.2, p. 225-239, 2008.

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

REDON, J.; MARTINEZ, F.; CHEUNG, A.K. Special considerations for antihypertensive agents in dialysis patients. **Blood Purif.**, Valencia, v.29, n.2, p.93-98. 2010.

ROSTAMI-HODJEGAN, A.; KROEMER, H.K.; TUCKER, G. T. In vivo indices of enzyme activity: the effect of renal impairment on the assessment of CYP2D6 activity. **Pharmacogenetics**, Sheffield, v.9, n.3, p. 277-286, 1999.

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

SEN, N.; TAVIL, Y.; ERDAMAR, H.; YAZICI, H.U.; CAKIR, E.; AKGÜL, E.O.; BILGI, C.; ERBIL, M.K.; POYRAZ, F.; OKYAY, K.; TURFAN, M.; CEMRI, M. Nebivolol therapy improves endothelial function and increases exercise tolerance in patients with cardiac syndrome X. **Anadolu Kardiyol Derg.,** Ankara**,** v.9, n.5, p.371-379, 2009.

SESSO, R.C.; LOPES, A.A.; THOMÉ, F.S., LUGON, J.R.; WATANABE, Y.; SANTOS, D.R. Chronic dialysis in Brazil: report of the Brazilian dialysis census, 2011. **J. Bras. Nefrol.,** São Paulo, v.34, n.3, p.272-277, 2012.

SHAW, A. A.; LIU, S.; ZACHWIEJA, L. F.; EDDY, T.; DONNELLY, C. M.; HUANG, M. Y. Effects of varying degrees of renal impair-ment on the pharmacokinetic disposition of nebivolol. **American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics,** Philadelphia, v.77, 2005.

SILVA, F.G. da. Influência do Diabetes mellitus e da insuficiência renal crônica em tratamento dialítico na farmacocinética e farmacodinâmica do carvedilol em pacientes hipertensos. 2008. 145f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

SIMARD, E., NAUD, J., MICHAUD, J., LEBLOND, F.A., BONNARDEAUX, A., GUILLEMETTE, C., SIM, E., PICHETTE, V. Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Montreal, v.19, n.7, p.1352-1359, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol**., v.95 (1 supl.1), p. 1-51, 2010.

SOHN, D.R., KUSAKA, M., SHIN, S.G., JANG. I.J., CHIBA, K., ISHIZAKI, T. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. **Ther. Drug Monit.,** Chinju**,** v.14, n.3, p.184-189, 1992.

SUN, H.; FRASSETTO, L.; BENET, L.Z. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. **Pharmacol. Ther.,** San Francisco, v.109, n.1-2, p.1-11, 2006.

TOBLLI, J.E.; DIGENNARO, F.; GIANI, J.F.; DOMINICI, F.P. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. **Vasc. Health Risk Manag.,** Buenos Aires, v.8, p.151-160, 2012.

US Renal Data System, **USRDS 2012 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States**, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2012.

VANHOUTTE, P.M.; GAO, Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Pharmacol.,** Li Ka Shing, 2013. In press.

VAN NUETEN L, DE CRÉE J. Nebivolol: comparison of the effects of dl-nebivolol, d-nebivolol, l-nebivolol, atenolol, and placebo on exercise-induced increases in heart rate and systolic blood pressure. **Cardiovasc. Drugs Ther.,** Beerse, v.12, n.4, p.339-344, 1998.

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

VERBEECK, R.K.; MUSUAMBA, F.T**.** Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction**. Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Grahamstown, v.65, n.8, p.757-773, 2009.

WHITMAN, I.R.; FELDMAN, H.I.; DEO, R. CKD and sudden cardiac death: epidemiology, mechanisms, and therapeutic approaches. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Philadelphia, v.23, n.12, p.1929-1939, 2012.

YE, S.; OZGUR, B.; CAMPESE, V.M. Renal afferent impulses, the posterior hypothalamus, and hypertension in rats with chronic renal failure. **Kidney Int.**, Los Angeles, v.51, n.3, p.722-727, 1997.

ZILCH, O.; VOS, P.F.; OEY, P.L.; CRAMER, M.J.; LIGTENBERG, G.; KOOMANS, H.A.; BLANKESTIJN, P.J. Sympathetic hyperactivity in haemodialysis patients is reduced by short daily haemodialysis. **J. Hypertens.**, Utrecht, v.25, n.6, p.1285-1289, 2007.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Parâmetros bioquímicos

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

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (PM)
ALT (U/L)	27	35	30	28	48	nd	33	8	52	23	19	8
AST (U/L)	21	26	15	31	27	19,2	20	18	26	20	17	14
Gama GT (U/L)	50	nd	nd	38	28	40	47	44	47	nd	19	24
Bilirrubina **-direta(mg/dL)** **-indireta(mg/dL)** **-total (mg/dL)**	 0,13 0,34 0,47	 0,17 0,36 0,53	 0,12 0,18 0,30	 0,15 0,30 0,51	 0,17 0,36 0,53	 nd nd nd	 0,15 0,32 0,47	 0,24 0,48 0,72	 0,23 0,53 0.76	 nd nd nd	 0,08 0,11 0,18	 0,18 0,37 0,55
Proteínas totais (g/dL)	7,1	nd	7,1	7,6	6.3	6,5	nd	7,0	7,4	nd	nd	7,2
Uréia (mg/dL)	30	30	20	nd	47	26	25	20	25	37	36	25
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,8	0,79	0,8	1,14	0.91	0,74	0.8	0.9	0.74	1,3	0.85	0,82
Clearance da creatinina (mL/min/1,73m^2)	100,51	99,80	92,24	89,90	90,56	119,93	117,34	86,94	149,95	95,40	87,5	89,80
Colesterol (mg/dL)	175	180	185	nd	184	171	203	170	151	214	248	224
Triglicérides (mg/dL)	208	138,5	69	nd	114	151	276	102	204	72	366	116
HDL (mg/dL)	nd	32,5	34	36	31	31	29	52	25	46	32	46
LDL (mg/dL)	nd	134,5	138	130	131	110	119	98	84	123	143	155
Hemoglobina glicada (%)	6,2	5,7	4,9	nd	5.6	6,1	5,6	nd	5,7	nd	6.8	4,9
Glicemia (mg/dL)	93	89	79	89	86	93	88	95	112	86	114	87
Albumina (g/dL)	4	nd	4,7	4,7	3.9	4,3	4,1	4,4	4,4	4,4	4.1	4,2

nd não determinada. Valores de referência: ALT até 41U/L; AST até 38U/L; Gama GT 11-50 U/L; Bilirrubina-direta até 0,4 mg/dL, indireta até 0,8 mg/dL, total até 1,2 mg/dL; Proteínas totais 6-8,5g/dL; Uréia 10-50 mg/dL; Creatinina plasmática 0,7-1,5 mg/dL; Clearance da creatinina 75-125 mL/min/1,73m^2; Colesterol < 200mg/dL; Triglicérides 80-150 mg/dL; HDL > 35 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; Hemoglobina glicada 4,1-6,5%; Albumina 3,5-4,8 g/dL; Glicemia 70-100 mg/dL.

APÊNDICE B – Parâmetros bioquímicos

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

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALT (U/L)	11	14	9	22	14	30	22	57	22	11	16,7	9
AST (U/L)	12	9	19	21	13	nd	22	28	18	13	11,5	14
Gama GT (U/L)	9	28	35	9	30	47	23	nd	42	13	29	18
Bilirrubina **-direta(mg/dL)** **-indireta(mg/dL)** **-total (mg/dL)**	 0,1 0,21 0,31	 0,14 0,32 0,46	 0,25 0,52 0,77	 0,1 0,2 0,3	 nd nd nd	 0,11 0,24 0,34	 nd nd nd	 0,3 0,2 0,5	 0,13 0,36 0,49	 0,23 0,53 0,76	 0,06 0,19 0,25	 0,13 0,31 0,44
Proteínas totais (g/dL)	5,9	6	5,8	6,8	6,7	nd	6,4	7,4	7,7	nd	6,4	6,3
Uréia (mg/dL)	89	112	44	46	75	66	78	87	56	90	142	99
Creatinina plasmática (mg/dL)	1,7	4,26	2,9	1,73	2,76	1,3	3,02	3,61	1,57	2,4	3,16	3,9
Clearance da creatinina (mL/min/1,73m^2)	45,69	14,90	32,97	38,48	41,54	35,54	34,74	30,54	55,89	27,68	17,87	20,6
Colesterol (mg/dL)	210	220	190	189	178	190	210	280	221	168	207	192
Triglicérides (mg/dL)	167	147	163	147	nd	170	160	211	219	146	212	nd
HDL (mg/dL)	36	39	40	39	36	nd	nd	39	34	31	28	25
LDL (mg/dL)	132	140	140	145	139	nd	nd	114	143	108	137	141
Hemoglobina glicada (%)	4,4	4,9	5,3	5	5,6	5,4	5,8	nd	6,3	6	6,1	5,2
Glicemia (mg/dL)	93	93	82	83	89	81	77	104	113	87	102	89
Albumina (g/dL)	3,8	4,0	4,5	4,6	3,7	nd	3,8	4,6	4,1	4,1	4,3	3,7

nd não determinada. Valores de referência: ALT até 41U/L; AST até 38U/L; Gama GT 11-50 U/L; Bilirrubina-direta até 0,4 mg/dL, indireta até 0,8 mg/dL, total até 1,2 mg/dL; Proteínas totais 6-8,5g/dL; Uréia 10-50 mg/dL; Creatinina plasmática 0,7-1,5 mg/dL; Clearance da creatinina 75-125 mL/min/1,73m^2; Colesterol < 200mg/dL; Triglicérides 80-150 mg/dL; HDL > 35 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; Hemoglobina glicada 4,1-6,5%; Albumina 3,5-4,8 g/dL; Glicemia 70-100 mg/dL.

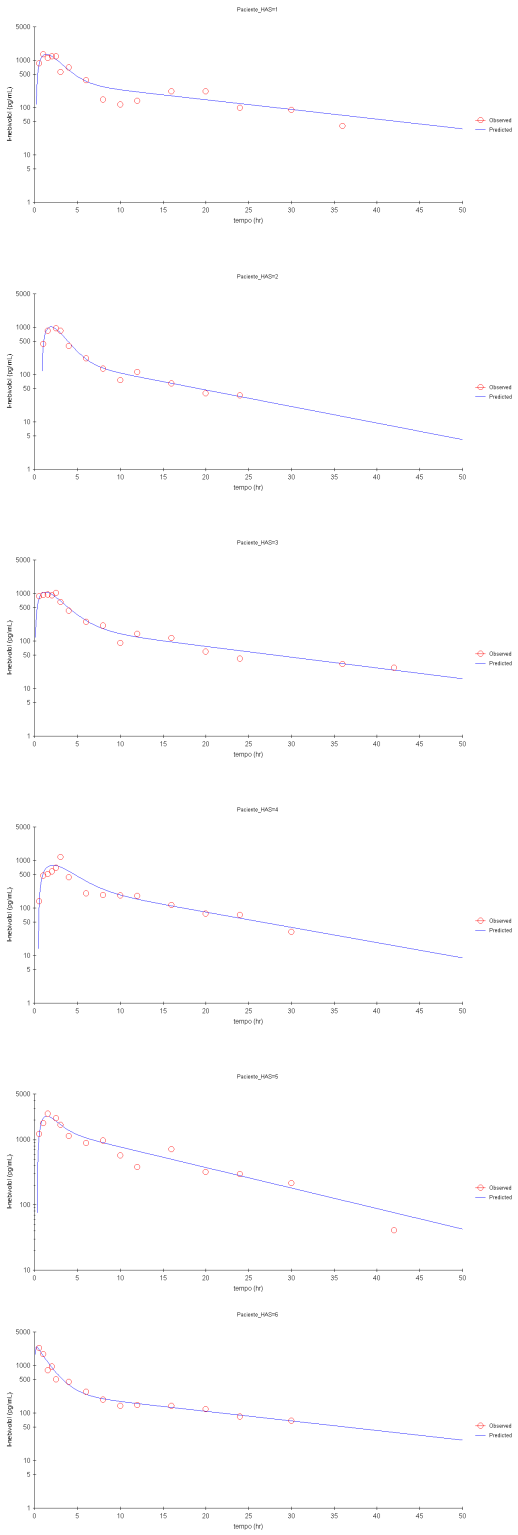
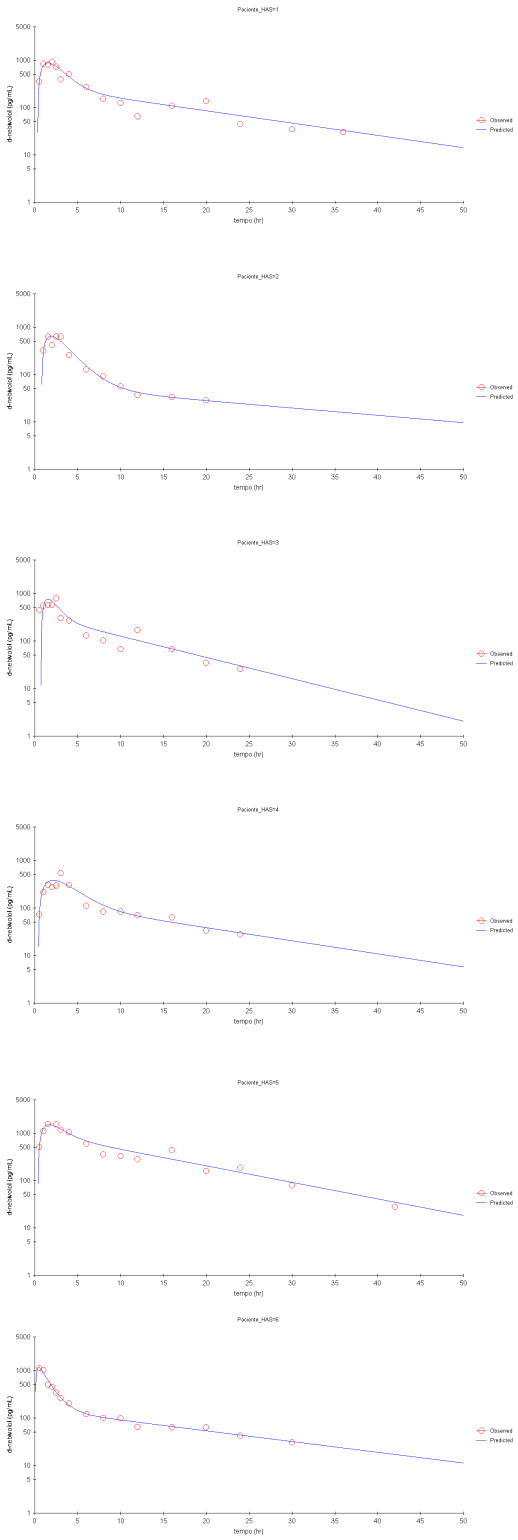
APÊNDICE C – Parâmetros bioquímicos

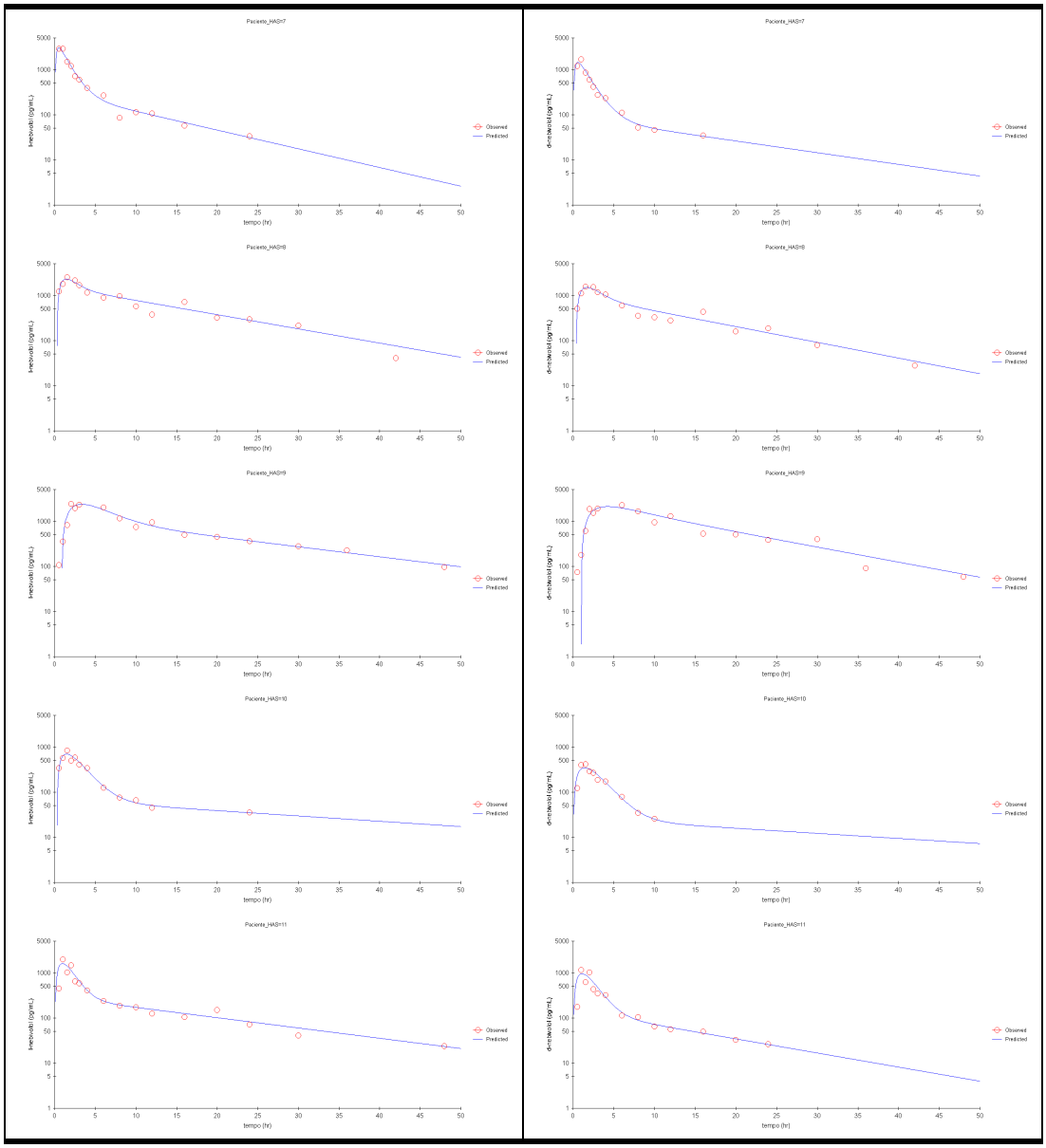
Tabela I: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos dos pacientes do Grupo Hemodiálise investigados.

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ALT (U/L)	4,0	4,0	12,0	12,0	10,0	10,0	9,0	20,0	14,0	11	11,0
AST (U/L)	12,0	13,0	22,0	10,0	25,0	28,0	18,0	24,6	21,0	26	25,0
Gama GT (U/L)	23,0	28,0	69,0	18,0	40,0	20,0	33,0	39,0	36,0	27	32,0
Bilirrubina **-direta(mg/dL)** **-indireta(mg/dL)** **-total (mg/dL)**	0,12 0,18 0,30	0,23 0,10 0,33	0,13 0,13 0,26	0,12 0,17 0,28	0,12 0,15 0,26	0,15 0,18 0,33	0,15 0,15 0,29	0,16 0,12 0,28	0,17 0,14 0,29	0,14 0,15 0,29	0,15 0,16 0,29
Proteínas totais (g/dL)	8,6	7,8	7,1	7,3	8,3	6,4	7,6	nd	7,0	6,5	7,0
Uréia (mg/dL)	128,0	147,0	166,0	60,0	109,0	89,0	116,5	90,6	111,7	93,0	105,4
Creatinina plasmática (mg/dL)	8,3	8,8	11,1	12,4	6,5	7,9	9,2	8,7	10,3	9,8	8,1
Clearance da creatinina (mL/min/1,73m^2)	11,00	7,00	5,00	8,00	15,00	8,00	8,00	10,00	11,00	7,00	7,00
Colesterol (mg/dL)	199,0	175,0	155,0	203,0	nd	180,0	184,0	173,0	230,0	nd	242,0
Triglicérides (mg/dL)	155	nd	101	165	140	143	138	151	145	142	143
HDL (mg/dL)	40	44	38	41	40	40	41	38	44	nd	40
LDL (mg/dL)	135,0	nd	97,0	140,0	133,0	160,0	122,0	110,0	185,0	nd	121,0
Hemoglobina glicada (%)	5,0	4,9	4,2	4,8	4,3	4,4	4,6	4,9	4,6	4,8	4,6
Glicemia (mg/dL)	80,0	81,0	65,0	80,0	82,0	90,0	80,0	90,0	92,0	86	85,0
Albumina (g/dL)	4,5	4,0	3,6	4,5	4,3	4,1	4,1	4,6	4,7	3,8	3,6

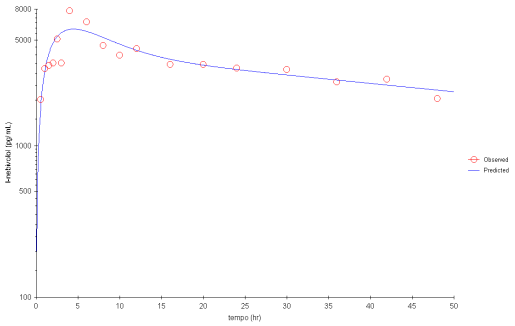
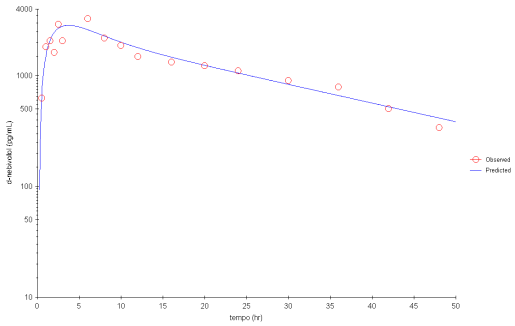
nd não determinada. Valores de referência: ALT até 41U/L; AST até 38U/L; Gama GT 11-50 U/L; Bilirrubina-direta até 0,4 mg/dL, indireta até 0,8 mg/dL, total até 1,2 mg/dL; Proteínas totais 6-8,5g/dL; Uréia 10-50 mg/dL; Creatinina plasmática 0,7-1,5 mg/dL; Clearance da creatinina 75-125 mL/min/1,73m^2; Colesterol < 200mg/dL; Triglicérides 80-150 mg/dL; HDL > 35 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; Hemoglobina glicada 4,1-6,5%; Albumina 3,5-4,8 g/dL; Glicemia 70-100 mg/dL.

APÊNDICE D – Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol para os pacientes incluídos no Grupo controle.

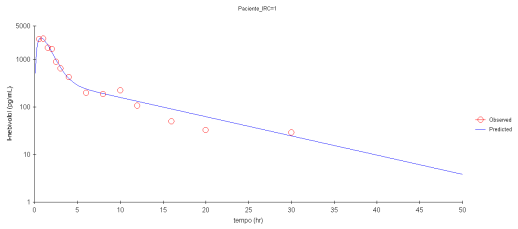
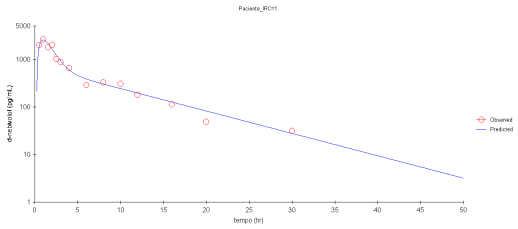
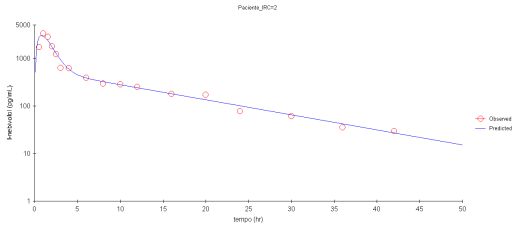
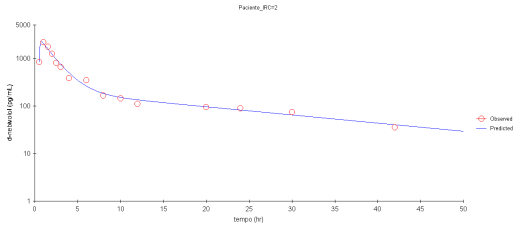
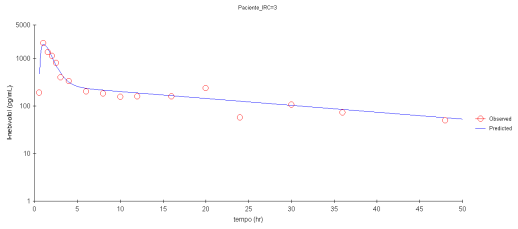
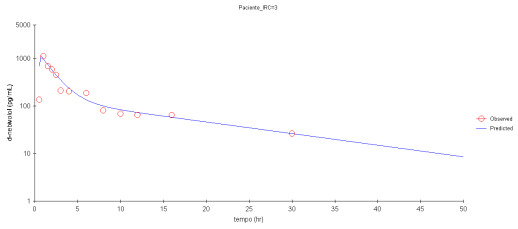
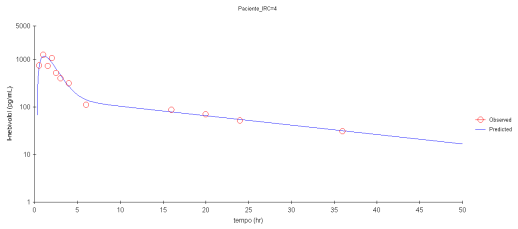
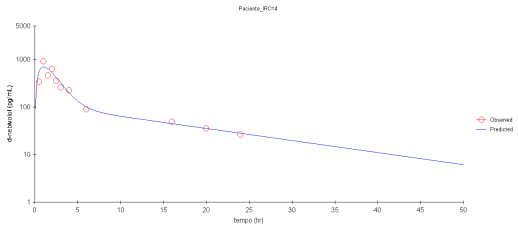
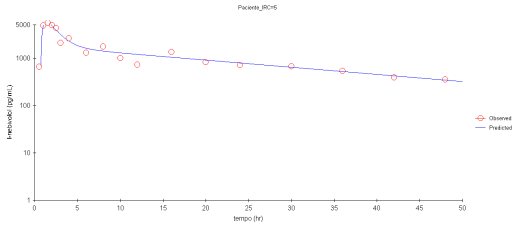
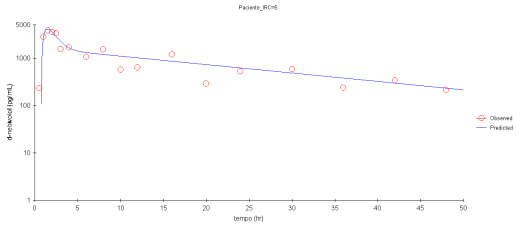
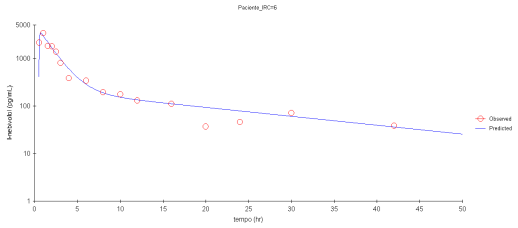
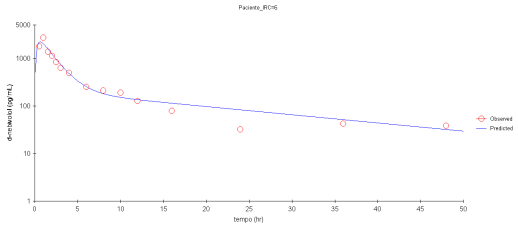
***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
	

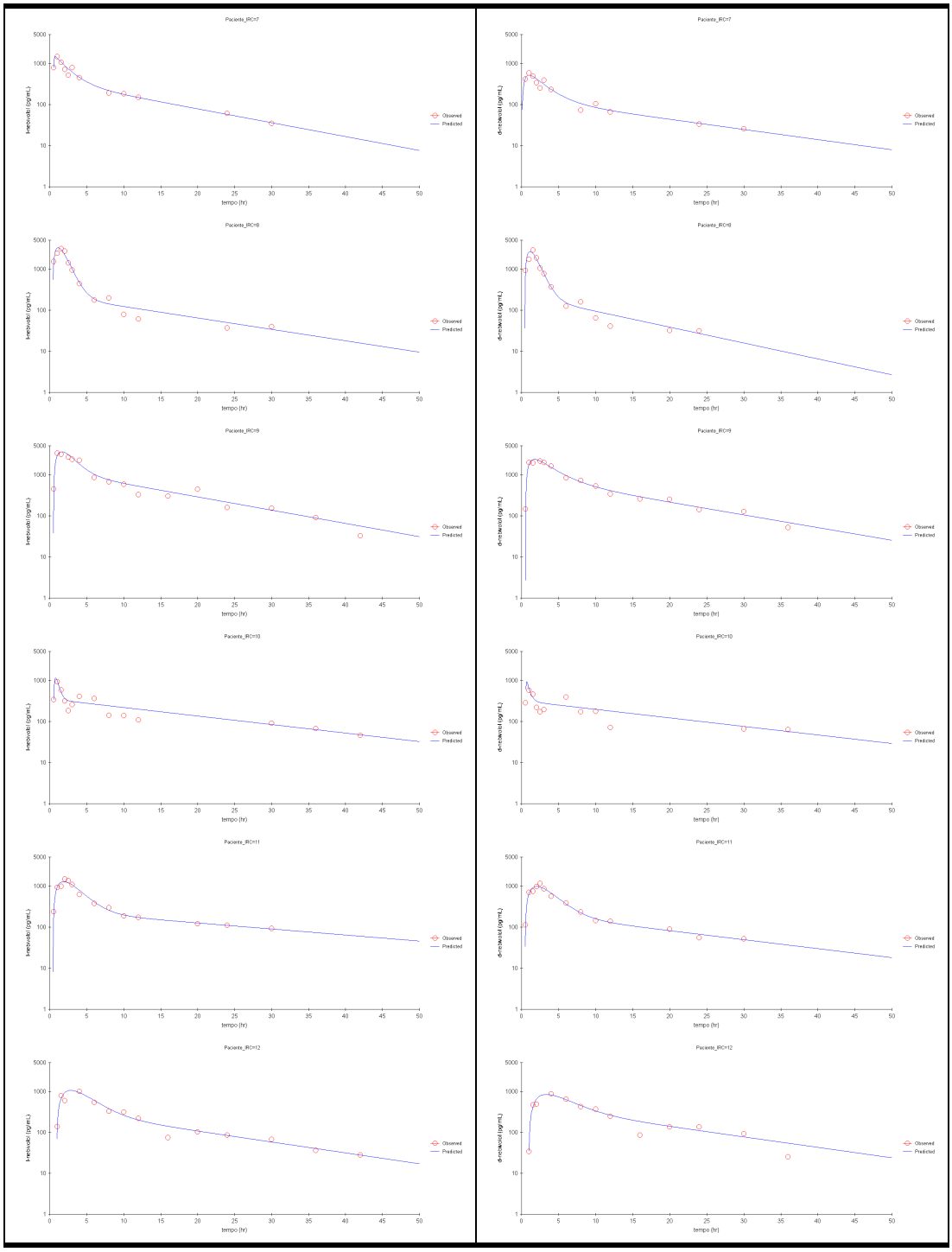

Paciente_HASI=7
Paciente_HASI=8
Paciente_HASI=9
Paciente_HASI=10
Paciente_HASI=11
tempo (hr)
Observed
Predicted

APÊNDICE E – Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol para a paciente PM do Grupo controle.

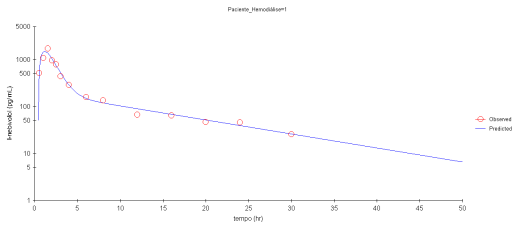
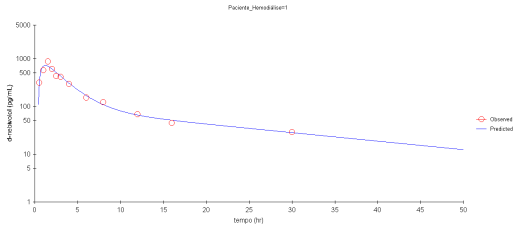
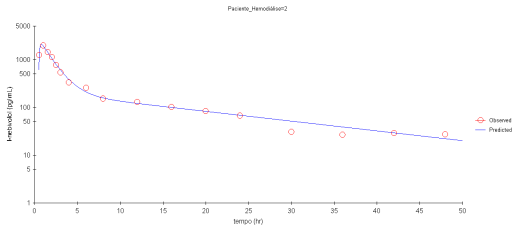
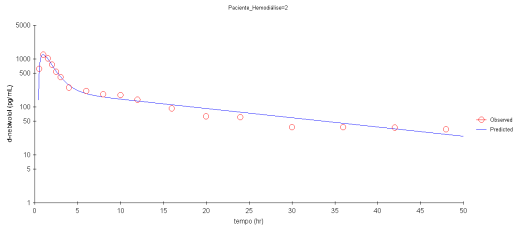
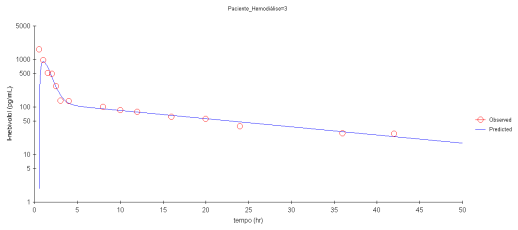
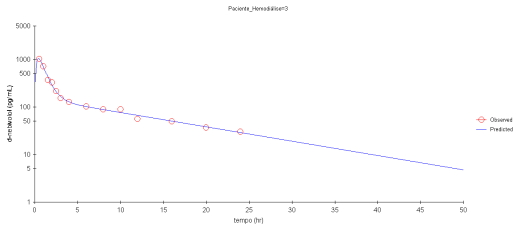
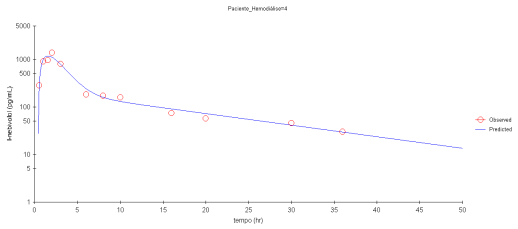
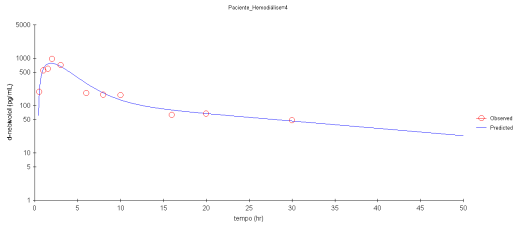
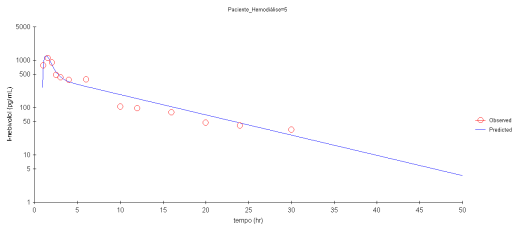
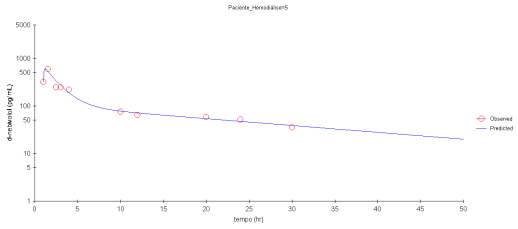
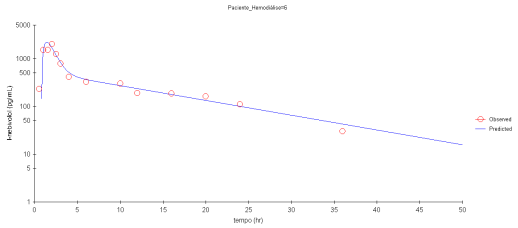
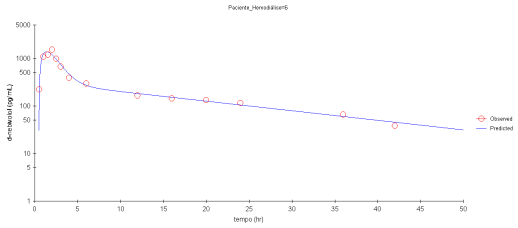
***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
	

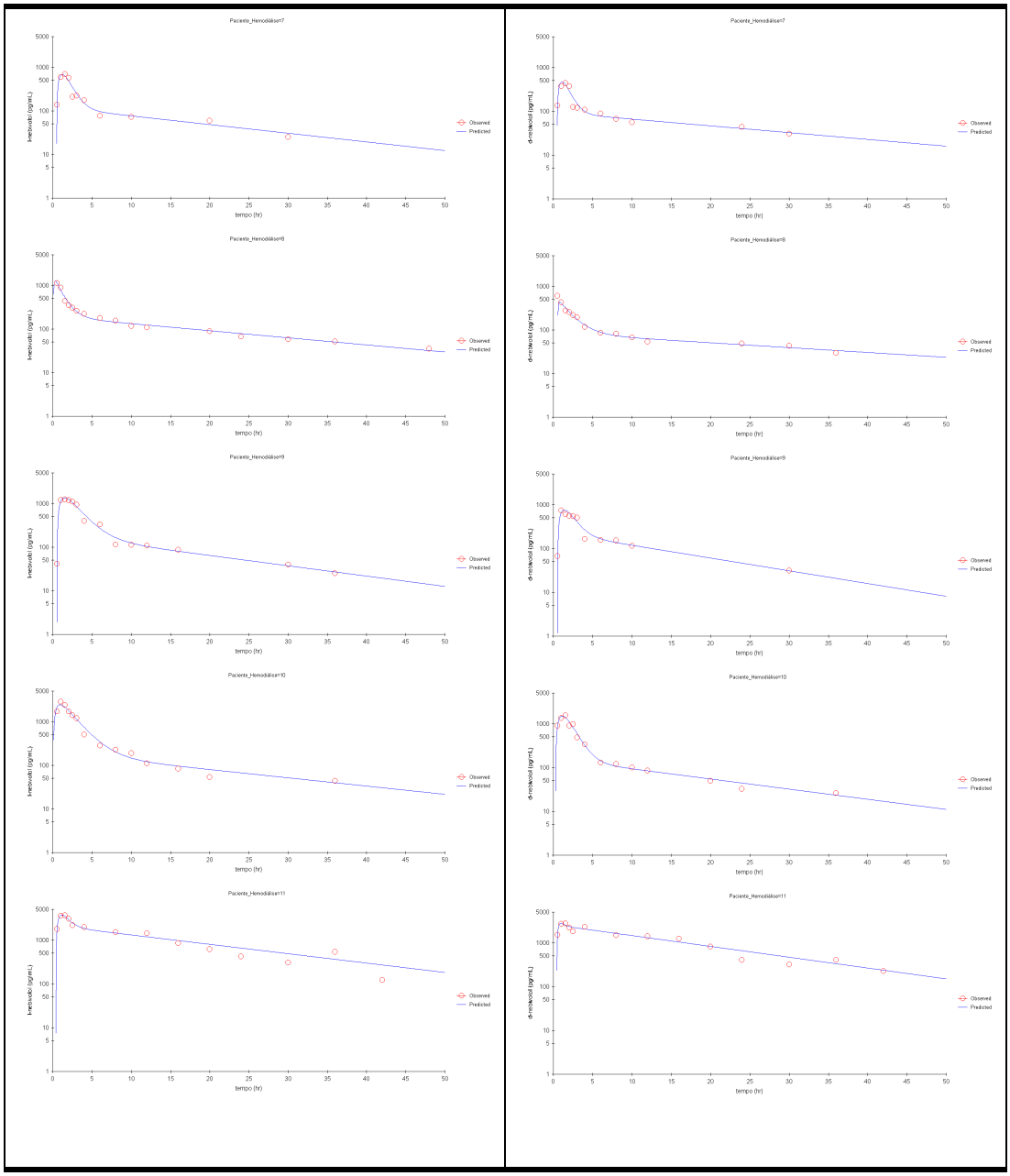
APÊNDICE F – Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol para os pacientes incluídos no Grupo DRC.

***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
	
	
	
	
	
	


Paciente_IRC=7
Paciente_IRC=8
Paciente_IRC=9
Paciente_IRC=10
Paciente_IRC=11
Paciente_IRC=12
tempo (hr)
Observed
Predicted

APÊNDICE G – Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol para os pacientes incluídos no Grupo Hemodiálise.

***l*-nebivolol**	***d*-nebivolol**
	
	
	
	
	
	


Paciente_Hemodiálise#7
l-metoxidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#7
d-metacidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#8
l-metoxidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#8
d-metacidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#9
l-metoxidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#9
d-metacidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#10
l-metoxidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#10
d-metacidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#11
l-metoxidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted
Paciente_Hemodiálise#11
d-metacidol (pg/mL)
tempo (hr)
Observed
Predicted

APÊNDICE H – Dados antropométricos e fármacos utilizados pelos Grupos Hemodiálise, DRC e controle.

Tabela I: Dados demográficos individuais dos pacientes do Grupo controle

Pacientes	Idade	Gênero	IMC (kg/m^2)	Fármacos associados
1	41	F	27,73	22
2	45	F	29,26	9, 11
3	45	F	27,39	18, 23
4	31	M	23,99	5
5	57	F	29,44	18, 11,
6	43	F	26,50	5, 19
7	50	M	27,25	11, 18, 23, 24
8	58	M	24,34	9, 11,18
9	45	M	29,10	9
10	41	M	29,45	5, 6
11	50	F	27,69	11, 25
12 (PM)	30	F	22,57	9, 11

IMC: Índice de massa corpórea; Fármacos associados: 1-acido fólico; 2-complexo B; 3-AAS; 4-omeprazol; 5-enalapril; 6-furosemida; 7-sinvastatina; 8-calcitriol; 9-captopril; 10-anlodipina; 11-hidroclorotiazida; 12-diazepam; 13-sevelamer; 14-alopurinol; 15-eritropoetina; 16-vitamina C; 17-sulfato ferroso; 18-losartana; 19-atorvastatina; 20-ciclobenzaprina; 21-alopurinol 22-indapamida; 23-levotiroxina; 24-espironolactona; 25-olmesartan.

Tabela II: Dados demográficos individuais dos pacientes do Grupo DRC

Pacientes	Idade	Gênero	IMC (kg/m^2)	Fármacos associados
1	46	F	29,13	5, 11, 17
2	58	M	24,45	6, 10, 14
3	55	M	29,75	5, 10, 11, 14,
4	55	F	24,97	5, 11,
5	44	M	29,58	5, 9
6	52	F	26,04	5, 6, 10,
7	49	M	28,72	10, 18
8	44	M	29,65	5, 19, 21
9	62	M	29,75	5, 11
10	55	F	25,54	1,10, 11, 15,18
11	60	F	29,24	5 ,11, 14,
12	32	F	24,00	5

IMC: Índice de massa corpórea; Fármacos associados: 1-acido fólico; 2-complexo B; 3-AAS; 4-omeprazol; 5-enalapril; 6-furosemida; 7-sinvastatina; 8-calcitriol; 9-captopril; 10-anlodipina; 11-hidroclorotiazida; 12-diazepam; 13-sevelamer; 14-alopurinol; 15-eritropoetina; 16-vitamina C; 17-sulfato ferroso; 18-losartana; 19-atorvastatina; 20-ciclobenzaprina; 21-alopurinol 22-indapamida; 23-levotiroxina; 24-espironolactona; 25-olmesartan.

Tabela III: Dados demográficos individuais dos pacientes do Grupo Hemodiálise

Pacientes	Idade	Gênero	IMC (kg/m^2)	Fármacos associados
1	45	M	23,19	1, 2, 6, 5, 13, 15, 19
2	32	F	19,05	2, 5, 15
3	38	F	20,78	1, 2, 3, 4, 7, 16
4	34	M	22,43	4, 10, 5, 3, 1, 2, 13, 15
5	33	F	26,40	6, 1, 2, 15, 13, 5
6	31	F	19,53	15, 1, 2, 13, 20, 5
7	61	M	23,73	15, 13, 10, 5, 1, 2, 4, 14
8	53	M	23,24	15, 4, 10
9	40	M	27,26	1, 2, 13, 18,
10	41	F	22,43	5, 6,
11	56	F	23,28	1, 2, 5, 6, 17, 8, 10, 15

IMC: Índice de massa corpórea; Fármacos associados: 1-acido fólico; 2-complexo B; 3-AAS; 4-omeprazol; 5-enalapril; 6-furosemida; 7-sinvastatina; 8-calcitriol; 9-captopril; 10-anlodipina; 11-hidroclorotiazida; 12-diazepam; 13-sevelamer; 14-alopurinol; 15-eritropoetina; 16-vitamina C; 17-sulfato ferroso; 18-losartana; 19-atorvastatina; 20-ciclobenzaprina; 21-alopurinol 22-indapamida; 23-levotiroxina; 24-espironolactona; 25-olmesartan.

9. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

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

www.hcrp.fmrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO

Ribeirão Preto, 03 de setembro de 2009

Ofício nº 2980/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA DA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E DA HEMODIÁLISE NA FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DOS ENANTIÔMEROS DO NEBIVOLOL EM PACIENTES HIPERTENSOS"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 294ª Reunião Ordinária realizada em 31/08/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 7336/2009.

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

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

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

Ilustríssimos Senhores
DANIEL VALENTE NEVES
PROFª DRª VERA LUCIA LANCHOTE (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP - Toxicologia

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14049-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário Monte Alegre – RIBEIRÃO PRETO – SP

PESQUISA CIENTÍFICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

REGISTRO E/OU DOCUMENTOS DE IDENTIFICAÇÃO.....

NOME DA PESQUISA: **Influência da insuficiência renal crônica e da hemodiálise na farmacodinâmica e na farmacocinética dos isômeros do nebivolol em pacientes hipertensos.**

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho (Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nefrologia HC-FMRP-USP) – CREMESP 68.329.
RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TCLE: Daniel Valente Neves (aluno de doutorado da FCFRP-USP)
TELEFONE PARA CONTATO: (16) 3602-2543 ou (16) 3602-4699

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1- "O nosso estudo procura entender se a doença dos rins modifica o efeito de um remédio usado para abaixar a pressão arterial. Alguns remédios têm o efeito alterado pela doença nos rins, podendo aumentar ou mesmo ter o seu efeito diminuído. Para a realização deste estudo, serão necessárias pessoas com e sem problema nos rins. Assim, todas as pessoas que irão participar desta pesquisa vão ter um exame de saúde feito em primeiro lugar para saber se existe algum problema dos rins. Os remédios que você toma para controlar a pressão serão trocados para um remédio chamado Nebivolol, que também é utilizado para o controle da pressão, no dia da pesquisa. Pode acontecer de você sentir câimbras, fraqueza e tonturas. Para ser incluído nesse estudo, você terá que vir até o Hospital (HC) em jejum de 12 horas, e irá receber um comprimido de 10 mg de um remédio usado para abaixar a pressão, chamado Nebivolol, que você tomará com um copo de água. Nós iremos coletar amostras de 5 mL de sangue (cerca de uma colher de sopa) da veia do seu braço várias vezes (cerca de 15 vezes). Um tubinho de plástico será colocado dentro da sua veia, assim nós iremos picar você uma única vez. Pode acontecer de aparecerem efeitos exagerados do remédio como cansaço, fraqueza ou falta de ar, além de poder cair o valor da sua pressão. Se isso ocorrer, nós iremos tratá-lo aqui mesmo no hospital e iremos interromper a pesquisa. Após o término das coletas de sangue, você receberá um comprimido chamado metoprolol (100 mg) que é para avaliar como seu organismo elimina o remédio usado, após 3 horas da administração do metoprolol será coletado 5 mL de sangue. Assim, se você quiser participar da pesquisa, você terá que vir pelo menos 2 vezes ao Hospital: uma para ser

examinado e uma para tomar os remédios. Nas vezes que você vier tomar os remédios, você terá que ficar internado no Hospital durante 2 dias. Além de coletar o seu sangue, nós também vamos medir durante o tempo em que você ficar no Hospital os seus batimentos cardíacos através de um aparelho chamado monitor cardíaco Dixtal DX2021, em que colocaremos alguns elétrodos na parte externa do peito, durante o período em que você estiver internado. Também iremos pedir para que você aperte uma mola a cada vez que for coletar sangue para ver o efeito do remédio sobre os batimentos do coração".

A sua colaboração será importante para entendermos como ajustar a dose desses medicamentos para o controle de pressão arterial. "Isto poderá ajudar na escolha do melhor tratamento e no ajuste da dose dos remédios para pessoas que tem problema nos rins."

2- Você não é obrigado a continuar participando do projeto e pode, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso impeça que você deixe de ser tratado como os demais pacientes do Hospital das Clínicas.

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

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

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

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

7- Você terá direito a ressarcimento financeiro caso hajam gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.

8- Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito a indenização.

Ribeirão Preto, ... de.....de.....

_____	_____
Assinatura do paciente ou de seu responsável	Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho. Cremesp 68.329

Telefones para contato: (16) 3602 2543 e (16) 3602 2950 (Unidade de Pesquisa Clínica)

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1-.....	.....
Assinatura	identificação
2-.....	.....
Assinatura	identificação