UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Milena Locci de Oliveira

Esquema de amostragem esparsa para avaliar a farmacocinética da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos diagnosticados com leucemia mieloide aguda

Ribeirão Preto
2019

Milena Locci de Oliveira

Esquema de amostragem esparsa para avaliar a farmacocinética da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos diagnosticados com leucemia mieloide aguda

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2019

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.

De Oliveira, Milena Locci

Esquema de amostragem esparsa para avaliar a farmacocinética da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos diagnosticados com leucemia mieloide aguda. Ribeirão Preto, 2019.

139p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia.

1. Daunorrubicina. 2. Farmacocinética. 3. Metabolismo. 4. Amostragem esparsa. 5. Leucemia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Milena Locci de Oliveira
Esquema de amostragem esparsa para avaliar a farmacocinética da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos diagnosticados com leucemia mieloide aguda.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho à minha família,
por todo o amor, compreensão e
apoio incondicionais até hoje.

E à minha avó Isabel (in memoriam),
por todo seu amor e dedicação.
Meu sólido alicerce que partiu
sem poder participar desta
etapa de minha vida.

Meus sinceros agradecimentos

À minha orientadora, **Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote**, pela confiança ao ter me recebido em seu grupo de pesquisa e me proporcionado a oportunidade da vivência clínica. Pelo seu comprometimento e dedicação ao ensinar ciência e pelo apoio profissional, essenciais para o meu desenvolvimento científico e pessoal.

À **Profa. Dra. Belinda Pinto Simoes**, por ter me recebido em sua equipe no HCFMRP-USP. Pelas orientações, reuniões, pelo apoio e confiança também essenciais.

Aos **Residentes** e **Enfermeiros** da Divisão de Onco-hematologia do HCFMRP-USP, por todo o auxílio no recrutamento dos pacientes e nas coletas das amostras. Por me permitirem testemunhar e participar de todo o cuidado humanizado aos pacientes. Pelas discussões dos casos clínicos e dúvidas esclarecidas. Foi um período em que aprendi muito (cientifica e pessoalmente), conheci pessoas maravilhosas, fiz grandes amigos e vivi momentos inesquecíveis.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli**, por ter me recebido em sua equipe no HCC-FMRP, pelas orientações, reuniões e incentivo no desenvolvimento deste estudo.

À **Dra. Bianca M. O. Mori Sankarankutty**, pelo empenho e disposição em me auxiliar no recrutamento de pacientes pediátricos deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho**, pelos ensinamentos e por disponibilizar seu laboratório para a realização de diversos experimentos.

Aos Professores Doutores **Guilherme Suarez Kurtz** e **Oscar Della Pasqua**, pelas orientações e colaborações científicas com nosso grupo de pesquisa.

Às especialistas de laboratório, **Dra. Adriana Rocha** e **Dra. Maria Paula Marques Pereira**, pela paciência, empenho e suporte constantes nos ensinamentos das técnicas analíticas e da farmacocinética.

Ao **Sr. Natalino Bocardo**, que nos ensina a conciliar trabalho e alegria, fazendo do nosso ambiente de trabalho um lugar agradável.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacocinética Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Ana Carolina Conchon Costa, Dra. Carolina Pinto Vieira, Dr. Daniel Valente Neves, Dr. Diego Alberto Ciscato Cusinato, Me. Fábio Alves Aguila, Dra. Fernanda de Lima Moreira, Dra. Francine Attié de Castro, Ma. Gabriela Campos de Oliveira Filgueira, Dr. Glauco Henrique Balthazar Nardotto, Grazielle Rodrigues, Dr. João Paulo Bianchi Ximenez, Me. Jhohann Richard de Lima Benzi, Dra. Juciene Aparecida Caris, Dra. Natalícia de Jesus Antunes e Dra. Roberta Natália Cestari**, pela amizade, discussões científicas e constante troca de conhecimentos durante manhãs, tardes e noites.

Aos **docentes** e **funcionários** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Em especial aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **Rosemary Ioshimine Gerolineto** e **Rosana Florêncio**, por todo o auxílio prestado e por sempre torcerem pelo sucesso de todos os alunos.

Aos **pacientes** investigados neste estudo e **seus familiares**, que mesmo durante seus maiores momentos de medo, dor e angústia se dispuseram a participar desta pesquisa clínica. Pelas inestimáveis lições de fé, coragem, perseverança e superação que pude testemunhar e lapidar durante nosso convívio, e contribuíram para meu desenvolvimento humano, científico e pessoal. Sem suas colaborações este trabalho jamais teria sido possível! Recebam novamente minha gratidão e meus votos de uma vida longa, saudável e feliz!

À minha **família**, pela educação a mim dispensada, pela minha formação e pelos maiores exemplos de honestidade, dignidade e perseverança. Além da confiança, incentivo e apoio incondicional em todas as decisões por mim tomadas.

Às minhas queridas amigas, em especial a **Ana Carolina Quereza Rocha Feres**, **Larissa de Oliveira Castro** e **Juliana Rezende Lima Denipotte**, fontes diárias de alegria e descontração. Pela amizade, cumplicidade, incentivo e apoio emocional tão fundamentais ao longo desta caminhada.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pela concessão da bolsa de doutorado (processo número 140107/2016-9).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos aqueles não citados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho.

Sou certamente uma pessoa de muita sorte por ter tido a oportunidade de conviver, aprender e evoluir com cada um de vocês!

Serei sempre muito grata!

"O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem".

João Guimarães Rosa

RESUMO

De Oliveira, M.L. **Esquema de amostragem esparsa para avaliar a farmacocinética da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos diagnosticados com leucemia mieloide aguda**. 2019. 139f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O objetivo principal do estudo foi estabelecer um esquema de amostragem esparsa para propiciar a avaliação da farmacocinética da daunorrubicina (DAUN) e seu metabólito daunorrubicinol (DAUNOL) em grande número de pacientes adultos e pediátricos. Foram investigados pacientes adultos (> 12 anos; n=12) diagnosticados com leucemia mieloide aguda (LMA) com indicação para uso da DAUN (60 mg/m^2/dia) por infusão intravenosa de 1 h durante 3 dias consecutivos. As coletas seriadas de sangue e urina foram realizadas ao longo das 3 infusões, ocorrendo até 144 h após o início da primeira infusão. Os métodos de análise sequencial da DAUN e DAUNOL em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina empregando LC-MS/MS foram validados nos intervalos de 0,1 a 1000 ng/mL de plasma, 0,05 a 40 ng/mL de ultrafiltrado e de 0,5 a 3000 ng/mL de urina. A farmacocinética da DAUN e DAUNOL, avaliada por modelo bicompartimental e monocompartimental, mostrou meias-vidas de eliminação de 8,7 (7,98-9,48) e 15,04 (13,92-16,26) h, respectivamente. A razão metabólica de $AUC_{0-\infty}$ DAUNOL/DAUN foi de 6,25, variando individualmente entre 4,16 a 8,79, um dado que exibe variação interindividual de aproximadamente 100%. O *clearance* total da DAUN foi de 289,54 (254,20-329,54) L/h, o clearance renal de 12,66 (10,79-14,87) L/h e o clearance hepático de 274,81 (236,30-319,60) L/h. O clearance de formação do metabólito DAUNOL foi de 22,78 (18,20-28,50) L/h. A ligação da DAUN às proteínas plasmáticas foi de 72,41 (67,02-78,24) % e do DAUNOL de 69,88 (66,72-73,20) %. Os pacientes genotipados com a variante rs25678 (C>G) da CBR1 (GG e CG; n=11) apresentaram tendência de maiores valores de AUC da DAUN quando comparados ao paciente genotipado como CC (n=1). O paciente genotipado com a variante rs1695 da GSTP1 (Ile105Val) (GG; n=1) também apresentou tendência de maior valor de AUC da DAUN quando comparado aos pacientes genotipados como AG ou AA (n=11). O modelo de farmacocinética populacional da DAUN e DAUNOL, desenvolvido com dados de pacientes pediátricos virtuais (n=12), estruturado com cinco compartimentos e validado com métodos gráficos e estatísticos, apresentou bom desempenho preditivo e mostrou-se adequado para fins de simulação de dados. A estratégia de amostragem esparsa (n=3) com tempos de coleta entre 36-85 h após o início da primeira infusão permitiu estimar os parâmetros farmacocinéticos individuais da DAUN e DAUNOL de forma tão robusta quanto a estratégia de amostragem com coletas seriadas, oferecendo uma ferramenta viável a ser agregada em futuros estudos multicêntricos empenhados na predição da dose não empírica de DAUN em pacientes adultos e pediátricos.

Palavras-chave: Daunorrubicina. Farmacocinética. Metabolismo. Amostragem esparsa. Leucemia

ABSTRACT

De Oliveira, M.L. **Sparse sampling scheme to evaluate the pharmacokinetics of daunorubicin and its metabolite daunorubicinol in adult and pediatric patients diagnosed with acute myeloid leukemia**. 2019. 139f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The main objective of the study was to establish a sparse sampling scheme to assess the pharmacokinetics of daunorubicin (DAUN) and its metabolite daunorubicinol (DAUNOL) in a large number of adult and pediatric patients. There were investigated adult patients (> 18 years; n = 12) diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) with indication for use of DAUN (60 mg/m^2/day) by intravenous infusion of 1 h for 3 consecutive days. Serial blood and urine samples were collected throughout the 3 infusions, up to 144 h after the start of the first infusion. Sequential DAUN and DAUNOL analysis methods in plasma, plasma ultrafiltrate and urine by LC-MS/MS were validated at intervals of 0.1 to 1000 ng/mL plasma, 0.05 to 40 ng/mL ultrafiltrate and of 0.5 to 3000 ng/ml urine. The pharmacokinetics of DAUN and DAUNOL, evaluated by a bicompartmental and monocompartmental model, showed elimination half-lives of 8.7 (7.98-9.48) and 15.04 (13.92-16.26) h, respectively. The metabolic ratio of AUC0-∞ DAUNOL/DAUN was 6.25, ranging from 4.16 to 8.79, individually, presenting an interindividual variation of approximately 100%. Total DAUN clearance was 289.54 (254.20-329.54) L/h, renal clearance was 12.66 (10.79-14.87) L/h and hepatic clearance was 274.81 (236 , 30-319.60) L/hr. The metabolite DAUNOL formation clearance was 22.78 (18.20-28.50) L/h. The DAUN binding to plasma proteins was 72.41 (67.02-78.24)% and DAUNOL 69.88 (66.72-73.20)%. Patients genotyped with the rs25678 (C> G) variant of CBR1 (GG and CG; n = 11) showed a tendency for higher DAUC AUC values when compared to the genotyped patient as CC (n = 1). The genotyped patient with the rs1695 variant of GSTP1 (Ile105Val) (GG; n = 1) also showed a higher AUC value of DAUN when compared to genotyped patients such as AG or AA (n = 11). The population pharmacokinetic model of DAUN and DAUNOL, developed with data from virtual pediatric patients (n = 12), structured with five compartments and validated with graphical and statistical methods, presented good predictive performance and was adequate for data simulation purposes. The sampling strategy (n = 3) with collection times between 36-85 h after the start of the first infusion allowed the estimation of DAUN and DAUNOL individual pharmacokinetic parameters as robust as the sampling strategy with serial collections, a feasible tool to be aggregated in future multicenter studies aimed at predicting the non-empirical dose of DAUN in adult and pediatric patients.

Keywords: Daunorubicin. Pharmacokinetics. Metabolism. Sparse sampling. Leukemia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas da daunorrubicina e sua conversão ao metabolito daunorrubicinol..... **2**

Figura 2: Espectros de massas das moléculas protonadas da daunorrubicina (A) e seus íons produtos (B); daunorrubicinol (C) e seus íons produtos (D); e doxorrubicina (PI) (E) e seus íons produtos (F)..... **17**

Figura 3: Cromatogramas referentes às matrizes branco em plasma (A), ultrafiltrado de plasma (B) e urina (C) analisadas nas transições da DAUN, do DAUNOL e do padrão interno DOXO..... **19**

Figura 4: Cromatogramas referentes à análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em plasma. (A) Limite inferior de quantificação (0,1 ng/mL); (B) Plasma branco enriquecido com os analitos na concentração de 100 ng/mL; (C) Plasma de uma paciente com LMA coletado ao final da infusão de 60mg/m^2/24 h de daunorrubicina..... **20**

Figura 5: Cromatogramas referentes à análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em ultrafiltrado de plasma. (A) Limite inferior de quantificação (0,05 ng/mL); (B) Ultrafiltrado de plasma branco enriquecido com os analitos na concentração de 10 ng/mL; (C) Ultrafiltrado de plasma de uma paciente com LMA coletado 8h após o término da terceira infusão de 60mg/m^2/24 h de daunorrubicina..... **21**

Figura 6: Cromatogramas referentes à análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em urina. (A) Limite inferior de quantificação (0,5 ng/mL); (B) Urina enriquecida com os analitos na concentração de 100 ng/mL; (C) Urina de uma paciente com LMA coletada no período de 72 - 96h após o término da terceira infusão de 60mg/m^2/24 h de daunorrubicina..... **22**

Figura 7: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol em uma paciente diagnosticada com LMA tratada com 3 infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora..... **25**

Figura 8: Curvas de velocidade de excreção urinária da daunorrubicina e do daunorrubicinol *versus* tempo médio do período de coleta de uma paciente diagnosticada com LMA tratada com 3 infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora..... **25**

Figura 9: Esquema de coletas de sangue e urina. As setas laranjas representam as infusões de DAUN (60 mg/m^2). Os círculos vermelhos representam as coletas de sangue e os amarelos as coletas de urina..... **41**

Figura 10: Esquema do modelo bicompartimental do programa Phoenix® WinNonlin® empregado nos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina como concentração total..... **48**

Figura 11: Esquema do modelo monocompartimental do programa Phoenix® WinNonlin® empregado nos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos do daunorrubicinol como concentração total..... **48**

Figura 12: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol, observadas e preditas, pelos modelos do programa Phoenix® WinNonlin® até 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12). Dados individuais..... **49**

Figura 13: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol, observadas e preditas, pelos modelos do programa Phoenix® WinNonlin® até 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12). Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %..... **50**

Figura 14: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Dados individuais..... **51**

Figura 15: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %..... **52**

Figura 16: Razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN observadas em função do tempo seguindo a primeira, segunda e terceira infusões de daunorrubicina (60 mg/m^2 durante 1 h a cada 24 h). Dados apresentados como médias para os 12 pacientes adultos diagnosticados com LMA..... **52**

Figura 17: Curvas da velocidade de excreção urinária *versus* tempo médio do período de coleta da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Dados individuais..... **53**

Figura 18: Curvas da velocidade de excreção urinária *versus* tempo médio do período de coleta da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %..... **54**

Figura 19: Curvas de velocidade de excreção urinária de daunorrubicina e daunorrubicinol em função do tempo médio do período de coleta, observadas e preditas no intervalo de zero a 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12). Dados individuais..... **60**

Figura 20: Curvas de velocidade de excreção urinária de daunorrubicina e daunorrubicinol em função do tempo médio do período de coleta, observadas e preditas no intervalo de zero a 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12). Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %..... **61**

Figura 21: Associação entre a AUC da daunorrubicina e os polimorfismos da CBR1 e GSTP1..... **64**

Figura 22: Associação entre a AUC do daunorrubicinol e os polimorfismos da CBR1 e GSTP1..... **64**

Figura 23: Visão esquemática do modelo da farmacocinética populacional para a daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol. **V**: volume do compartimento; **K**: constante de velocidade..... **78**

Figura 24: Relação entre covariáveis (peso, altura, superfície corporal, percentual de gordura e fração livre da daunorrubicina) e parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina sob a forma inalterada (Cl, V, V_2, V_3, Q_2 e Q_3)..... **80**

Figura 25: Gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste (*Goodness-of-fit*) do modelo final da farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol: concentrações observadas *versus* concentrações populacionais preditas; concentrações observadas *versus* concentrações individuais preditas; resíduos ponderados condicionais CWRES [*Conditional Weighted Residuals*] *versus* concentrações populacionais preditas e CWRES *versus* tempo..... **83**

Figura 26: Verificação visual preditiva (VPC - *Visual Predictive Check*) do modelo final da farmacocinética populacional da daunorrubicina e do seu metabólito daunorrubicinol. As linhas tracejadas representam os percentis 5 e 95% e as linhas contínuas as medianas dos dados observados (n=12). As áreas hachuradas representam os intervalos de confiança 90% dos percentis 5°, 50° e 95° dos dados simulados (n=1000). **84**

Figura 27: Validação interna do modelo farmacocinético final com NPDE (*Normalyzed Predictive Distribution Error)* para a daunorrubicina e para o metabólito daunorrubicinol. **(A)** Gráfico quantil-quantil do NPDE *versus* distribuição normal padrão esperada; **(B)** Histograma do NPDE com a distribuição normal; **(C)** NPDE *versus* tempo; **(D)** NPDE *versus* concentrações preditas. A distribuição normal é representada pela linha sólida. As linhas pontilhadas representam a média ± 2 desvios padrão..... **85**

Figura 28: Etapas do estudo de coletas esparsas para a avaliação da farmacocinética da daunorrubicina em pacientes pediátricos..... **87**

Figura 29: Gráfico do aumento da probabilidade de quantificar concentrações plasmáticas de daunorrubicina e daunorrubicinol abaixo do LIQ nas amostras coletadas após 85 h após a primeira infusão de daunorrubicina.. **88**

Figura 30: Tempos de coletas esparsas (n=3) propostos para os cenários 1 e 2 no estudo da farmacocinética da daunorrubicina e daunorrubicinol em pacientes pediátricos..... **89**

Figura 31: Tempos de coletas esparsas (n=2) propostos para os cenários 3 e 4 no estudo da farmacocinética da daunorrubicina e daunorrubicinol em pacientes pediátricos..... **90**

Figura 32: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do cenário 1 (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **91**

Figura 33: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do cenário 1 (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **92**

Figura 34: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 2** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **93**

Figura 35: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 2** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **94**

Figura 36: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 3** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **95**

Figura 37: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 3** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **96**

Figura 38: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 4** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **97**

Figura 39: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 4** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais..... **98**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações dos controles de qualidade e do limite superior de quantificação da DAUN e DAUNOL..... **11**

Tabela 2: Limites de confiança do método de análise da DAUN em amostras de plasma, ultrafiltrado de plasma e urina..... **23**

Tabela 3: Limites de confiança do método analítico do metabólito DAUNOL em amostras de plasma, ultrafiltrado de plasma e urina..... **24**

Tabela 4: Disposição cinética da daunorrubicina e do daunorrubicinol após a infusão endovenosa durante 1 hora da terceira dose de 60mg/m^2 de daunorrubicina a uma paciente portadora de LMA..... **26**

Tabela 5: Descrição dos principais polimorfismos dos genes *CBR1 e GSTP1*..... **41**

Tabela 6: Características antropométricas e tratamento dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)..... **44**

Tabela 7: Evolução clínica ao longo da primeira indução de remissão dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)..... **45**

Tabela 8: Hemograma dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)..... **46**

Tabela 9: Parâmetros bioquímicos dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)..... **47**

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo bicompartimental da daunorrubicina para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Os dados estão apresentados como média geométrica e IC 95%..... **55**

Tabela 11: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo bicompartimental da daunorrubicina para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais..... **56**

Tabela 12: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo monocompartimental do daunorrubicinol para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Os dados estão apresentados como média geométrica, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de variação..... **57**

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo monocompartimental do daunorrubicinol para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais..... **58**

Tabela14: Fração livre de daunorrubicina e do daunorrubicinol para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12), avaliada em amostras de plasma referentes ao Cmax da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais, média e IC 95%..... **59**

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL obtidos com dados de urina e de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados apresentados como como média geométrica e IC 95%..... **62**

Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL obtidos com dados de urina e de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais..... **63**

Tabela 17: Genótipos da *CBR1 e GSTP* referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=12)..... **64**
Tabela 18: Farmacocinética populacional da daunorrubicina em pacientes diagnosticados com LMA..... **79**
Tabela 19: Farmacocinética populacional do metabólito daunorrubicinol em pacientes diagnosticados com LMA..... **79**
Tabela 20: Resultados do *bootstrap* do modelo da farmacocinética populacional da daunorrubicina..... **82**
Tabela 21: Resultados do *bootstrap* do modelo da farmacocinética populacional do daunorrubicinol..... **82**
Tabela 22: Otimização dos tempos de amostragem oriundos do PoPED para 12 pacientes pediátricos virtuais..... **86**
Tabela 23: Parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina obtidos com o número total de coletas (real) ou com as coletas esparsas (estimado) para os pacientes pediátricos virtuais (n=12)..... **86**
Tabela 24: Tempos de amostragem propostos pelo programa PoPED para os diferentes cenários avaliados para o estudo da farmacocinética da daunorrubicina e do daunorrubicinol em pacientes pediátricos..... **88**
Tabela 25: Concentrações (plasma, ultrafiltrado do plasma e urina) da daunorrubicina e do daunorrubicinol em um paciente pediátrico com LLA tratado com 15 mg de daunorrubicina (25 mg/m^2) durante 30 min (primeira infusão)..... **99**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC:	ATP-binding cassette
AKR:	Aldo-ceto redutase
Alfa-1-GPA:	Alfa-1-glicoproteína ácida
ALT:	Alanina aminotransferase
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC:	Área superficial corpórea
AST:	Aspartato aminotransferase
CBR:	Carbonil redutase
CEP:	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM:	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CQ:	Controle de qualidade
CQA:	Controle de qualidade de alta concentração
CQB:	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD:	Controle de qualidade de diluição
CQM:	Controle de qualidade de média concentração
CV:	Coeficiente de variação
DAUN:	Daunorrubicina
DAUNOL:	Daunorrubicinol
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EPR:	Erro padrão relativo
FCFRP:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN:	Fator de matriz normalizado por padrão interno
Gama GT:	Gama glutamil transferase
HCFMRP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCM:	Hemoglobina corpuscular média
HDL:	Lipoproteínas de alta densidade
HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC 95%:	Intervalo de confiança 95%
IMC:	Índice de massa corpórea
$[M + H]^+$:	Molécula protonada
LC-MS:	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS:	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
LDL:	Lipoproteínas de baixa densidade
LIQ:	Limite inferior de quantificação
LSQ:	Limite superior de quantificação
MRM:	*Multiple Reaction Monitoring*
MS/MS:	Espectroscopia de massas
OFV:	*Objective Function Value*
PI:	Padrão interno
PopPK:	*Population pharmacokinetic*
RDW:	*Red cell distribution width*
RNA:	Ácido ribonucleico
RT-PCR:	*Reverse transcription-polymerase chain reaction*
SNP:	*Single-nucleotide polymorphism*
TGO:	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP:	Transaminase glutâmico pirúvica
USP:	Universidade de São Paulo
v/v:	volume/volume
VCM:	Volume corpuscular médio
VPC:	*Visual predictive check*
VR:	Valores de referência

LISTA DE SÍMBOLOS

®:	Marca registrada
A:	Intercepto da reta corrigida da fase de distribuição com o eixo das ordenadas
Ae:	Quantidade excretada na urina
AUC:	Área sob a curva concentração plasmática versus tempo
$AUC_{0-\infty}$:	Área sob a curva concentração plasmática versus tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito
$AUMC_{0-\infty}$:	Área sob o primeiro momento da curva "concentração plasmática × tempo" versus tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito
B:	Intercepto da reta corrigida da fase de eliminação rápida com o eixo das ordenadas
Cl:	*Clearance* total
Cl_{hep}:	*Clearance* hepático
Cl_{int}:	Clearance intrínseco
Cl_M:	Clearance de formação do metabólito
Cl_{ren}:	Clearance renal
C_{max}:	Concentração plasmática máxima
C_u:	Concentração urinária
E:	Razão de extração hepática
F_{el}:	Fração excretada na urina sob a forma inalterada
F_{elM}:	Fração excretada na urina na forma metabolizada
f_u:	Fração livre no plasma
K_{10}:	Constante de velocidade de eliminação do fármaco do compartimento central
K_{12}:	Constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o compartimento periférico
K_{13}:	Constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o compartimento profundo
K_{21}:	Constante de velocidade de distribuição do compartimento periférico para o compartimento central
M:	Quantidade excretada na urina como metabólito
MRT:	Tempo de residência médio
Q:	Fluxo sanguíneo hepático
$t_{½el:}$	Meia-vida de eliminação
$t_{½\alpha}$:	Meia vida de α
$t_{½\beta}$:	Meia vida de β
t_{max}:	Tempo de observação da concentração plasmática máxima
V_1:	Volume de distribuição do compartimento central
V_2:	Volume de distribuição do compartimento periférico
V_{ss}:	Volume de distribuição estimado no estado de equilíbrio
V_u:	Volume de urina
α:	Constante de velocidade de distribuição
β:	Constante de velocidade de eliminação rápida
γ:	Constante de velocidade de eliminação terminal em modelo tricompartimental

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
LISTA DE FIGURAS ..... **iii**
LISTA DE TABELAS ..... **vii**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **ix**
LISTA DE SÍMBOLOS ..... **x**
INTRODUÇÃO GERAL **1**
REFERÊNCIAS **4**
Capítulo I **7**
1. INTRODUÇÃO **8**
2. OBJETIVOS **10**
3. MATERIAIS E MÉTODOS **10**
3.1. Solventes e reagentes **10**
3.2. Solventes e reagentes **10**
3.3. Preparo de amostra **11**
3.4. Condições do Sistema LC-MS/MS **12**
3.5. Validação do método **13**
4. CASUÍSTICA E PROTOCOLO CLÍNICO **15**
5. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA **16**
6. RESULTADOS **17**
7. DISCUSSÃO **27**
8. CONCLUSÕES **31**
9. REFERÊNCIAS **32**
Capítulo II **35**
1. INTRODUÇÃO **36**
2. OBJETIVOS **39**
2.1. Objetivo geral **39**
2.2. Objetivos específicos **39**
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS **39**
3.1. Aspectos éticos **39**
3.2. Casuística **40**
3.3. Protocolo clínico **40**
3.4 Determinação dos genótipos dos genes CBR1 e GSTP1 ..... **41**
4. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA **42**
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA **43**
6. RESULTADOS **43**
7. DISCUSSÃO **65**
8. CONCLUSÕES **68**
9. REFERÊNCIAS **69**
Capítulo III **72**
1. INTRODUÇÃO **73**
2. OBJETIVOS **75**
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS **75**
3.1. Aspectos éticos **75**
3.2. Casuística **76**
3.3. Protocolo clínico **76**
3.4. Métodos de análise de fármacos e metabólitos em plasma **76**
3.5. Farmacocinética populacional da DAUN e DAUNOL **76**

3.6. Análise de covariáveis..... **77**
3.7. Estratégia de amostragem esparsa..... **77**
4. RESULTADOS..... 78
4.1. Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional..... **78**
4.2. Análise de covariáveis..... **80**
4.3. Validação do modelo de farmacocinética populacional..... **81**
4.4. Estratégia de amostragem esparsa..... **85**
5. DISCUSSÃO..... 100
6. CONCLUSÕES..... 104
7. REFERÊNCIAS 105
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP..... 107
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP..... 108
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... 109
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do(a) responsável pelo(a) menor..... 113
APÊNDICE C – Termo de Assentimento..... 117

INTRODUÇÃO GERAL

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela expansão clonal das células precursoras mieloides (mieloblastos), que ocasionalmente perdem a capacidade de se diferenciar ao estágio terminal de células funcionais e de responder a estímulos fisiológicos reguladores da proliferação celular e apoptose. Estas células, imaturas e pouco diferenciadas, podem se acumular no sangue periférico e/ou na medula óssea, resultando em insuficiência hematopoiética, caracterizada pela redução da produção de granulócitos, eritrócitos e plaquetas e, consequentemente, causando infecções recorrentes, anemias e hemorragias (DÖHNER et al., 2015, 2017).

A LMA é o tipo mais comum de leucemia aguda em adultos, correspondendo a 90% dos casos (BENÍCIO; REGO, 2013; BLAIR, 2018). Em 2013, nos Estado Unidos, a incidência de LMA a cada 100.000 indivíduos foi de 5,37 casos em homens e de 3,77 em mulheres na população total (adultos e crianças) (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2018). Já em relação à população pediátrica, estima-se que a incidência de LMA esteja entre cinco e sete casos por milhão de pessoas por ano, com um pico de incidência de 11 casos por milhão aos dois anos de idade (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2018, RUBNITZ et al., 2010).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que seriam diagnosticados 5.940 novos casos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres no ano 2018. Estes valores correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100.000 homens e 4,80 para cada 100.000 mulheres (INCA, 2018). Esses dados correspondem às leucemias como um todo e não divididas em relação às suas subclassificações nem quanto às faixas etárias. O único dado específico para LMA no Brasil é proveniente de um estudo realizado no Rio Grande do Sul em 2007, que indicou uma incidência de 1,11 por 100.000 habitantes/ano com base em registros hospitalares (CAPRA et al., 2007). Neste estudo também não constam detalhes sobre as faixas etárias atingidas.

As antraciclinas, fármacos amplamente prescritos no tratamento da LMA, induzem cardiotoxicidade relacionada à dose, determinada pela exposição cardíaca a antraciclina inalterada e seus metabólitos formados dentro dos cardiomiócitos ou difundidos da corrente sanguínea. A cardiotoxicidade observada no uso das antraciclinas pode ser considerada um efeito tóxico multifatorial, dependente de polimorfismo genético nas enzimas que metabolizam as antraciclinas, uso concomitante de outros fármacos, comorbidades e estilos de vida. No entanto, o risco do desenvolvimento da cardiotoxicidade não deve desencorajar o uso das antraciclinas em tratamentos oncológicos, pois estratégias cardioprotetoras estão disponíveis e

devem ser usadas mais pragmaticamente na prática clínica de rotina (MENNA et al., 2012; SALVATORELLI et al., 2018).

As antraciclinas constam na lista dos medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde. Cinquenta anos após sua descoberta, os mecanismos antitumorais e cardiotóxicos ainda despertam considerável interesse na ciência básica e na pesquisa clínica (MCGOWAN et al., 2017).

A daunorrubicina (DAUN) é uma antraciclina altamente eficaz no tratamento da LMA e seu uso tem contribuído significativamente para aumentar a taxa de cura de pacientes com câncer (KRISCHKE et al., 2016). A redução da carbonila, a principal via do metabolismo da DAUN ao daunorrubicinol (DAUNOL), é dependente principalmente da polimórfica carbonil redutase 1 (CBR1) (PISKA et al., 2017) **(Figura 1)**.

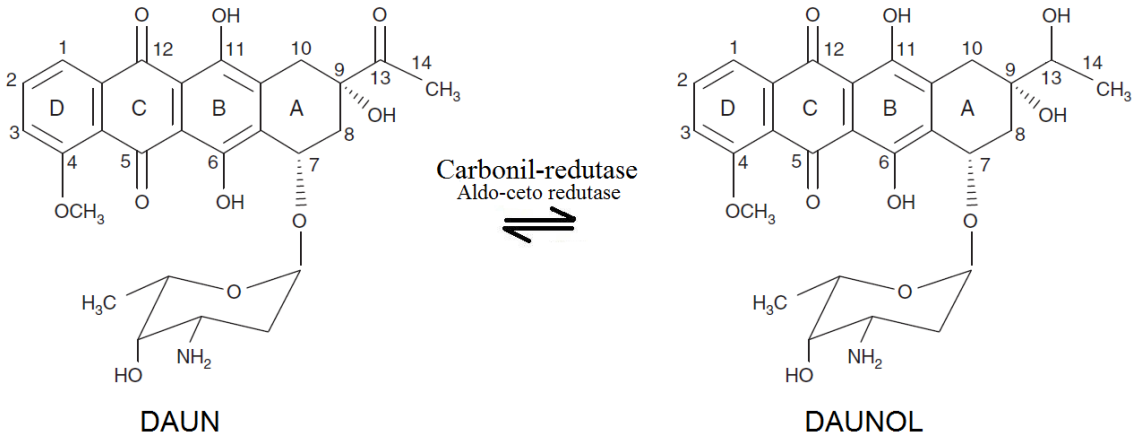

Figura 1: Daunorrubicina e seu metabolismo a daunorrubicinol. Adaptado de (MENNA et al., 2012).

Os esquemas de dosagem da DAUN foram desenvolvidos empiricamente na década de 60. Assim, apesar do seu uso clínico frequente, a farmacocinética da DAUN nunca foi estudada sistematicamente em pacientes adultos e crianças. Os escassos estudos de farmacocinética compartimental da DAUN disponíveis na literatura, incluem pequeno número de pacientes, principalmente adultos, com abordagem limitada dos parâmetros farmacocinéticos (PAUL et al., 1980; GESSNER et al., 1987; ROBERT et al., 1992; GALETTIS et al., 1994). Os estudos de farmacocinética populacional da DAUN não mostram quaisquer covariáveis (peso, superfície corporal, percentual de gordura, fração livre) de influência no *clearance* ou no volume de distribuição (CALLIES et al., 2004; HEMPEL et al., 2010; BOGASON et al., 2011;

KROGH-MADSEN et al., 2012; VARATHARAJAN et al., 2016) e clamam por estudos mais completos e com inclusão de maior número de pacientes com a proposta de definir o intervalo de concentrações plasmáticas da DAUN relacionado com eficácia e mínimo risco de cardiotoxicidade.

O objetivo principal deste estudo foi estabelecer um esquema de amostragem esparsa, até então não disponível na literatura, para propiciar a avaliação da farmacocinética da DAUN e seu metabólito DAUNOL em grande número de pacientes adultos e crianças. Para isso, foram investigados doze pacientes adultos diagnosticados com LMA em tratamento com DAUN e doze pacientes pediátricos virtuais.

O **Capítulo I** apresenta o desenvolvimento e a validação do método de análise sequencial da DAUN e seu metabólito DAUNOL em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina empregando LC-MS/MS.

O **Capítulo II** descreve a farmacocinética compartimental da DAUN e seu metabólito DAUNOL no plasma, como concentração total e concentração livre, e na urina de pacientes adultos diagnosticados com LMA. Considerando que a DAUN e o metabólito DAUNOL diferem em termos de eficácia e toxicidade, a avaliação das razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN em função do tempo contribui na identificação dos fatores relacionados à resposta ao tratamento ou à cardiotoxicidade.

O **Capítulo III** relata a farmacocinética populacional da DAUN e seu metabólito DAUNOL no plasma, ultrafiltrado do plasma e urina de pacientes adultos diagnosticados com LMA, assim como o esquema de amostragem esparsa estabelecido com base na farmacocinética de pacientes pediátricos virtuais.

REFERÊNCIAS

BENÍCIO, M. T. L.; REGO, E. M. Leucemia mieloide aguda no adulto. In. ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. (Ed). **Tratado de Hematologia.** São Paulo: Atheneu, 2013, cap. 39, p. 343-350.

BLAIR, H. A. Daunorubicin/Cytarabine Liposome: A Review in Acute Myeloid Leukaemia. **Drugs**, v. 78, n. 18, p. 1903-1910, 2018.

BOGASON, A. et al. Inverse relationship between leukaemic cell burden and plasma concentrations of daunorubicin in patients with acute myeloid leukaemia. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 514-521, 2011.

CALLIES, S. et al. Population pharmacokinetic model for daunorubicin and daunorubicinol coadministered with zosuquidar.3HCl (LY335979). **Cancer chemotherapy and pharmacology,** v. 54, p. 39-48, 2004.

CAPRA, M. et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, p. 2381-2386, 2007.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, v.129, p.424-47, 2017.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1136-1152, 2015.

GALETTIS, P.; BOUTAGY, J.; MA, D. D. Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. **British journal of cancer**, v. 70, p. 324-329, 1994.

GESSNER, T. et al. Plasma levels of daunorubicin metabolites and the outcome of ANLL therapy. **Medical oncology and tumor pharmacotherapy**, v. 4, p. 23-31, 1987.

HEMPEL, G. et al. Pharmacokinetics of daunorubicin and daunorubicinol in infants with leukemia treated in the interfant 99 protocol. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 54, p. 355-360, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF =BR>. Acesso em: dez. 2018.

KRISCHKE, M. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" trial. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v.78, p. 1175-84, 2016.

KROGH-MADSEN, M. et al. Population pharmacokinetics of cytarabine, etoposide, and daunorubicin in the treatment for acute myeloid leukemia. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 69, p. 1155-63, 2012.

MCGOWAN, J. V. et al. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 31, p. 63-75, 2017.

MENNA, P. et al. Anthracycline cardiotoxicity. **Expert opinion on drug safety**, v. 11, p. 21-36, 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. SEER Cancer Statistics Review 1975-2003. **Annual Incidence Rates** (Acute Myeloid Leukemia). Disponível em: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/ browse_csr.php?sectionSEL=13&pageSEL=sect_13_table.08.html. Acesso em: 11 dez. 2018.

PAUL, C. et al. Determination of daunorubicin and its main metabolites in plasma, urine and leukaemic cells in patients with acute myeloblastic leukaemia. **Cancer Letters**, v. 9, p. 263-269, 1980.

PISKA, K. et al. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. **Investigational New Drugs**, v. 35, p. 375-385, 2017.

ROBERT, J.; RIGAL-HUGUET, F.; HURTELOUP, P. Comparative pharmacokinetic study of idarubicin and daunorubicin in leukemia patients. **Hematological Oncology**, v. 10, p. 111-116, 1992.

RUBNITZ, J. E.; GIBSON, B.; SMITH, F. O. Acute myeloid leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 24, p. 35-63, 2010.

SALVATORELLI, E. et al. Low-Dose Anthracycline and Risk of Heart Failure in a Pharmacokinetic Model of Human Myocardium Exposure: Analog Specificity and Role of

Secondary Alcohol Metabolites. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 364, p. 323-331, 2018.

VARATHARAJAN, S. et al. Population pharmacokinetics of Daunorubicin in adult patients with acute myeloid leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, p. 1051-1058, 2016.

Capítulo I

Desenvolvimento e validação do método de análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina empregando LC-MS/MS: aplicação em estudo clínico

1. INTRODUÇÃO

O tratamento da LMA engloba a infusão contínua de citarabina (100 ou 200 mg/m^2/dia) nos dias 1 a 7 e de daunorrubicina (45-60 mg/m^2/dia) nos dias 1 a 3, seguida da etapa de consolidação com quimioterapia adicional ou transplante de células-tronco hematopoiéticas (DOMBRET; GARDIN, 2016; SHAFER; GRANT, 2016).

No contexto do tratamento contra o câncer a origem das antraciclinas remete a meados de 1960, quando o grupo de pesquisadores italianos “Farmitalia Carlo Erba Laboratories" isolou um novo antibiótico de culturas de *Streptomyces peucetius*, uma bactéria filamentosa presente em amostras de solo. A análise desse novo composto, de coloração avermelhada, mostrou que ele era formado por um núcleo antracíclico planar e hidrofóbico e um açúcar, a daunosamina, ligados por ligação glicosídica. Consequentemente, o denominaram de daunomicina (DIMARCO et al., 1964; EVISON et al., 2016).

Naquele mesmo ano, o grupo francês "Rhone Poulenc Laboratories" coincidentemente identificou o mesmo composto o qual foi denominado de rubidomicina. Os esforços em identificar novos agentes antineoplásicos de ambos os grupos foram reconhecidos internacionalmente e permitiu-se o nome híbrido de daunorrubicina (DAUN) como denominação oficial (DUBOST et al., 1964; EVISON et al., 2016).

A partir do momento que o notável potencial citotóxico da DAUN foi demonstrado, hipotetizou-se que algumas alterações em sua estrutura poderiam resultar na produção de análogos semelhantes. Dessa forma, colônias de *Streptomyces peucetius* foram expostas a agentes mutagênicos e uma linhagem sobrevivente, *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, foi isolada, cultivada e dela extraída a doxorrubicina (DOXO) dotada de atividade citotóxica até mesmo superior a DAUN (EVISON et al., 2016).

A única diferença entre a DAUN e a DOXO é a presença de uma hidroxila no carbono C-14 da DOXO **(Figura 1)**. Entretanto, essa diferença sutil possui consequências importantes no espectro de atividade das duas substâncias. Enquanto a DOXO é um componente essencial no tratamento de tumores sólidos e não sólidos, a DAUN é utilizada principalmente no tratamento de leucemias linfoides e mieloides (EDWARDSON et al., 2015; MINOTTI et al., 2004).

A daunorrubicina (DAUN) é metabolizada ao daunorrubicinol (DAUNOL) principalmente pelas carbonil-redutases (isoformas *CBR1* e *CBR3*) e, em menor extensão, pelas aldo-ceto redutases. O metabólito DAUNOL está associado à cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas, mas apresenta menor capacidade de inibir o crescimento de células tumorais

quando comparado ao fármaco inalterado. Assim, a variabilidade interindividual no metabolismo da DAUN pode resultar em complicações potenciais tanto na toxicidade quanto na eficácia do fármaco. Aproximadamente 60% da dose da DAUN é recuperada na bile principalmente como metabólito DAUNOL, enquanto concentrações limitadas da DAUN também podem ser encontradas na urina (aproximadamente 10%) (VARATHARAJAN et al., 2012).

Os estudos de ligação da DAUN às proteínas plasmáticas são escassos e realizados apenas em amostras de plasma ou soro enriquecidas (EKSBORG et al., 1982; CHASSANY et al., 1996; WHITAKER et al., 2008). Os métodos abrangem procedimentos de diálise de equilíbrio (Eksborg et al., 1982) ou ultrafiltração (CHASSANY et al., 1996; WHITAKER et al., 2008) e relatam valores de ligação da DAUN às proteínas plasmáticas variando entre 77-94% (WHITAKER et al., 2008). Não há relatos de avaliação da ligação do metabólito DAUNOL às proteínas plasmáticas.

Os primeiros métodos de análise sequencial da DAUN e DAUNOL em plasma datam do final da década de 1970 e início de 1980 e reportam o emprego de HPLC com detecção por fluorescência devido às propriedades estruturais das antraciclinas (EKSBORG; EHRSSON, 1978; BROWN et al., 1981). Apenas Lachâtre et al. (2000) reportam a análise sequencial da DAUN e seu metabólito DAUNOL em amostras de 500 µL de soro humano empregando LC-MS. Outros autores empregaram LC-MS/MS na análise somente da DAUN em amostras de 100 µL de plasma de rato (YANG, 2007) ou amostras de 5 mL de urina (SOTTANI et al., 2008).

O presente estudo reporta pela primeira vez o desenvolvimento, a validação e a aplicação clínica de um método analítico empregando LC-MS/MS para a análise sequencial da DAUN e seu metabólito DAUNOL em amostras de plasma, ultrafiltrado de plasma e urina. Ainda, o presente estudo reporta a aplicação dos métodos na investigação da farmacocinética da DAUN e seu metabólito DAUNOL em uma paciente com leucemia mieloide aguda tratada com três infusões consecutivas de DAUN (60 mg/m^2/24h). O estudo possibilitou o cálculo da fração livre (F_u) da DAUN e DANOL, dos *clearances* total, renal e não renal da DAUN, assim como o cálculo do *clearance* de formação do metabólito DAUNOL.

2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar o método de análise sequencial da DAUN e seu metabólito DAUNOL em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina empregando LC-MS/MS e sua aplicação em estudo de farmacocinética clínica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes e reagentes

O Metanol, a acetonitrila (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), o etanol (Panreac, Barcelona, Espanha), o isopropanol (Fischer-Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA) e o acetato de etila (Mallinckrodt, Paris, KY, EUA) empregados no preparo das amostras, das soluções ou como fase móvel do sistema cromatográfico foram grau cromatografia. O ácido fórmico (J. T. Baker, pureza: 85 %) apresentou grau PA. A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2. Soluções padrão

As soluções estoque de DAUN (hidrocloridrato de daunorrubicina 98,5%, *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*, Strasbourg, França) e de seu metabólito DAUNOL (daunorrubicinol 95%, Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canadá) foram preparadas individualmente na concentração de 200 μg/mL de metanol. A partir destas soluções foi preparada uma única solução estoque contendo ambos os analitos na concentração de 10 μg/mL, a qual foi diluída para a obtenção das soluções de trabalho nas concentrações de 0,05; 0,5; 1, 2, 8, 16, 40, 80, 200, 500, 1000; 2000 e 3000 ng de DAUN e DAUNOL/mL de metanol. A solução de doxorrubicina (DOXO) (cloridrato de doxorrubicina 98%, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA), utilizada como padrão interno (PI), foi preparada na concentração de 800 ng/mL de metanol e, posteriormente, diluída para 40 ng/mL de metanol.

As amostras de Controle de Qualidade (CQ) foram preparadas a partir das soluções estoque em plasma branco, ultrafiltrado de plasma branco e urina (obtidos de voluntários sadios e não tratados com medicamentos; Hemocentro do hospital local). As concentrações correspondentes ao limite inferior de quantificação (LIQ), CQs baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA), de diluição (CQD), e ao limite superior de quantificação estão descritas na **Tabela 1**.

Antes do início das análises, as amostras de CQD de plasma e urina foram diluídas, respectivamente, em plasma branco ou urina branco na proporção 1:10 (v/v).

Tabela 1: Concentrações dos controles de qualidade e do limite superior de quantificação da DAUN e DAUNOL.

	Daunorrubicina e Daunorrubicinol (ng/mL)		
Matriz	**Plasma**	**Ultrafiltrado**	**Urina**
CQLIQ	0,1	0,05	0,5
CQB	0,3	0,1	1
CQM	520	20	1500
CQA	800	32	2500
LSQ	1000	40	3000
CQD*	2000	-	5000

CQLIQ, CQB, CQM, CQA correspondem respectivamente aos controles de qualidade do limite inferior de quantificação, baixa, média e alta concentração. LSQ: limite superior de quantificação. CQD*: controle de qualidade de diluição; as amostras foram previamente diluídas em plasma ou urina brancos na proporção de 1:10. As amostras foram preparadas conforme descrito no **item 3.3**.

Dado que as antraciclinas são fotossensíveis e adsorvem em superfícies de vidro (LACHÂTRE et al., 2000), todos os experimentos foram realizados sob luz amarela como única fonte de iluminação e empregando tubos plásticos. As soluções padrão preparadas em metanol foram armazenadas em tubos BD Falcon® de polipropileno (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), e as soluções de CQ foram armazenadas em tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL). Todas as soluções foram protegidas por papel alumínio e estocadas - 20 °C (soluções em metanol) ou a - 80 °C (soluções em matriz - CQS).

3.3. Preparo de amostra

Em microtubos tipo *Eppendorf* (500 µL), alíquotas de 50 µL de plasma ou urina foram enriquecidas com 25 µL da solução de DOXO (PI) e 25 µL de metanol, agitadas por 5 segundos (agitador de soluções Phoenix Luferco, AP56, Araraquara, SP, Brasil) e adicionadas de 200 µL de solução de ácido fórmico 0,2% em acetonitrila. Após nova agitação por 20 segundos, os tubos foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 21500 g (Hitachi Micro Centrifuge, CT15E, Japan). Foram coletados 100 µL do sobrenadante de cada amostra e transferidos para os frascos de injeção (Micro-Inserts, La-Pha-Pack GmbH, Alemanha) contendo 100 µL de ácido fórmico 0,2% em água. Após homogeneização, 60 µL foram cromatografados.

Para avaliar a livre no plasma (F_u), um procedimento prévio foi necessário para obter o ultrafiltrado de plasma. Em tubos tipo *Eppendorf* (500 µL), alíquotas de 150 µL de plasma foram adicionadas a 150 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e agitadas por 5 segundos (agitador tipo *Vortex*). O volume total de 300 µL foi transferido para os dispositivos *Centrifree* (Millipore Corporation, Carrigtwohill, Irlanda) e centrifugados a 2000 g, à 37 °C, por 10 minutos em centrífuga com rotor de ângulo fixo (ângulo de 36°) (Model NT 825, Nova Técnica, Piracicaba, Brazil). Foram coletados 100 µL do filtrado de cada amostra e transferidos para os frascos de injeção contendo 100 µL de ácido fórmico 0,2% em água. Após homogeneização, 60 µL foram cromatografados.

A fração livre no plasma (F_u) foi determinada pela razão entre a concentração obtida no ultrafiltrado e a concentração total no plasma, conforme a **equação 1**.

$$F_u = \frac{(concentração\ livre\ no\ plasma)}{(concentração\ total\ no\ plasma)} \qquad (1)$$

3.4. Condições do Sistema LC-MS/MS

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência foi constituído por bomba quaternária ACQUITY UPLC® H-Class, injetor automático e forno de coluna TCM/CHM® (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

A separação cromatográfica dos analitos e do PI foi obtida em coluna de fase reversa LiChrospher® 60 RP-Select B (Merck, Darmstadt, Alemanha), com partículas de 5 µm (125 × 4,6 mm), protegida por pré-coluna LiChrospher® 60-RP-Select B, 5 µm, 4 × 4 mm (Merck, Darmstadt, Alemanha) e mantida a 23 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura 60:40 de ácido fórmico (0,2% v/v) em água (pH = 4) e ácido fórmico (0,2% v/v) em acetonitrila, ajustada para a vazão de 0,8 mL/min, em eluição isocrática. A fase de limpeza foi constituída por uma mistura de acetonitrila, metanol, água, isopropanol (50:20:15:15 v/v/v/v) e ácido fórmico 0,25% conforme recomendações do fabricante.

O detector consistiu de um espectrômetro de massas em Tandem Xevo TQ-S (Waters Corporation - Milford, MA, EUA), equipado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) operando em modo positivo. As condições do equipamento foram as seguintes: voltagem do capilar 3,5 kV, voltagem do cone 20 V, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de

dessolvatação 600 °C, fluxo do gás de dessolvatação 1000 L/h, fluxo do gás do cone 250 L/h, pressão do gás nebulizador (nitrogênio) 7,0 bar e fluxo do gás de colisão 0,18 mL/min.

Os três analitos foram detectados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) com tempo de aquisição de 0,35 s para cada transição. As transições de MRM monitoradas foram 528,4>321,1 *m/z* com energia de colisão de 30 eV para a DAUN, 530,3>383,2 *m/z* com energia de colisão de 25 eV para o DAUNOL e 544,3>397,1 *m/z* com energia de colisão de 12 eV para a DOXO (PI). A aquisição de dados e a quantificação dos analitos nas amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx® versão 4.1 (Waters, Milford, Massachusetts, US). As razões área do analito/ área do PI foram plotadas contra as respectivas concentrações nominais de DAUN e DAUNOL em plasma, ultrafiltrado e urina para a obtenção das respectivas equações de regressão linear.

3.5. Validação do método

Os métodos de análise da DAUN e DAUNOL em plasma, ultrafiltrado e urina foram validados de acordo com a Resolução RDC nº 27 para métodos bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012). O processo de validação incluiu todos os procedimentos necessários para demonstrar que os métodos desenvolvidos foram compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética clínica.

Para a avaliação do efeito residual, as amostras de matrizes branco processadas foram analisadas três vezes, sendo uma amostra injetada na coluna cromatográfica antes e duas amostras injetadas na coluna cromatográfica logo após a injeção das respectivas amostras processadas referentes ao LSQ (Limite Superior de Quantificação) **(Tabela 1)**. Os resultados foram comparados àqueles obtidos de amostras processadas dos LIQ correspondentes. A ausência de efeito residual é reportada quando a amostra de matriz branco injetada após a amostra LSQ não apresentar picos nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse ou apresentar picos interferentes com respostas inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras LIQs e inferiores a 5% da resposta do PI.

Os limites inferiores de quantificação (LIQs) foram obtidos pela análise de amostras das matrizes enriquecidas com DAUN e DAUNOL em concentrações decrescentes até a menor concentração que resultou em precisão e exatidão com desvios iguais ou inferiores a 20%.

As linearidades foram avaliadas em triplicata utilizando alíquotas de 50 µL de matrizes enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de trabalho contendo DAUN e DAUNOL, e 25 µL de solução do PI (DOXO) e, posteriormente, submetidas ao processo descrito

anteriormente em **3.3**. Foram avaliadas amostras de diferentes concentrações plasmáticas dos analitos, construídas no intervalo de 0,1 a 1000 ng de DAUN e DAUNOL por mL de plasma, de 0,05 a 40 ng de DAUN e DAUNOL por mL de ultrafiltrado e de 0,5 a 3000 ng de DAUN e DAUNOL por mL de urina. As razões de áreas dos picos analito/PI, plotadas em função das respectivas concentrações no plasma, ultrafiltrado ou urina, foram empregadas na obtenção das equações de regressão linear e dos coeficientes de correlação linear (r). O método é considerado linear quando apresentar valor de r maior ou igual a 0,98 e desvio igual ou inferior a 20% em relação ao valor nominal da concentração do LIQ e desvio igual ou inferior a 15% em relação ao valor nominal para as demais concentrações. As curvas de calibração são aceitas quando no mínimo 75% dos padrões de calibração atenderem às condições descritas.

A seletividade foi avaliada utilizando alíquotas de 50 µL das matrizes branco obtidas de seis voluntários diferentes, incluindo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, para o plasma e ultrafiltrado, e seis amostras normais para urina. Os cromatogramas obtidos foram comparados às amostras LIQ.

O efeito matriz foi avaliado usando oito alíquotas de 50 µL de e matrizes branco obtidas de diferentes voluntários. Os extratos foram adicionados de soluções padrão nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA de cada matriz e de solução do PI. Também foram analisadas as mesmas soluções padrão em água adicionadas de PI. O fator de matriz normalizado por PI (FMN) foi calculado para cada amostra **(equação 2)** e o efeito matriz foi determinado como o coeficiente de variação (CV) de todos os FMN obtidos.

$$\mathrm{FMN} = \frac{(\text{resposta do analito em matriz})/(\text{resposta do PI em matriz})}{(\text{resposta do analito em solução})/(\text{resposta do PI em solução})} \qquad (2)$$

O Coeficiente de Variação (CV) relativo a todas as amostras de uma mesma matriz deve ser inferior a 15%. O CV é expresso em porcentagem e calculado conforme a **equação 3**.

$$\mathrm{CV} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \qquad (3)$$

O teste de ligação não específica (*nonspecific binding* - NSB) à membrana do dispositivo de ultrafiltração foi realizado utilizando alíquotas de 300 µL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5 enriquecidas com solução padrão de DAUN e DAUNOL (correspondentes às concentrações do CQB e CQA) e submetidas ao procedimento de

ultrafiltração descrito no **item 3.3**. As respostas obtidas das amostras ultrafiltradas foram comparadas às respostas das amostras não filtradas, e os resultados foram apresentados como erro padrão relativo (EPR). Os resultados foram considerados adequados para valores de EPR dentro do intervalo de ± 15%.

A precisão e a exatidão foram avaliadas utilizando seis replicatas de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD analisadas em um único teste analítico (intra-corrida) e em três corridas analíticas diferentes (intercorridas). Os resultados estão expressos como CV e erro padrão relativo (EPR) **(equação 4)** incluindo todos os dados obtidos.

$$\text{EPR} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração nominal}}{\text{Concentração nominal}} \text{ x } 100 \qquad (4)$$

Os testes de estabilidades dos fármacos nas matrizes biológicas foram realizados utilizando seis replicatas de CQBs e CQAs. Para avaliar a estabilidade de congelamento/descongelamento, as replicatas de CQBs e CQAs foram congeladas a -80 ° C por 24 h, descongeladas à temperatura ambiente e novamente congeladas a -80 ° C por 24 h. Este ciclo foi repetido por 3 dias consecutivos e, ao final do terceiro ciclo, as amostras foram analisadas.

A estabilidade de bancada foi avaliada mantendo as amostras de CQB e CQA à temperatura ambiente durante 5 h antes do início do processamento. Para a avaliar a estabilidade pós-processamento, as amostras de CQB e CQA já processadas, foram armazenadas no injetor automático durante 24 h a 12 ° C. Os resultados são expressos como CV e EPR.

4. CASUÍSTICA E PROTOCOLO CLÍNICO

O estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, foi investigada uma paciente de 37 anos de idade diagnosticada com leucemia mieloide aguda. A paciente recebeu o regime de indução de remissão constituído por daunorrubicina em doses de 60 mg/m^2/dia durante 3 dias e de citarabina em doses de 200 mg/m^2/dia durante 7 dias, administradas por infusão endovenosa com duração de 1 h. As coletas das amostras seriadas de sangue (volumes de aproximadamente 4,5 mL) foram distribuídas ao longo das 3 infusões consecutivas da DAUN (1 infusão/dia) e foram realizadas ou através de

punção venosa ou diretamente do acesso central previamente puncionado. Foram utilizados tubos Vacutainer® (BD) contendo citrato de sódio tamponado como anticoagulante e os tempos de coleta foram os seguintes: no término da primeira infusão, 24 h após a primeira infusão, no término da segunda infusão, 24 h após o início da segunda infusão, no término da terceira infusão, 1, 2, 6, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h após o término da terceira infusão (GALETTIS et al., 1994; VARATHARAJAN et al., 2016).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1400 × *g* por 10 minutos a 4 °C e os plasmas obtidos foram armazenados a - 80°C até a análise. A urina total foi coletada no período de 0-144 h, em frascos individuais em intervalos de 24 h. O volume total de urina referente a cada intervalo de coleta foi medido e uma alíquota de 15 mL foi armazenada a -80 °C até a análise.

5. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

Os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e do seu metabólito daunorrubicinol foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo ou de excreção urinária *versus* tempo médio do período de coleta (*midpoint)*.

Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN em plasma foram calculados empregando o modelo 19 (tricompartimental), enquanto os do DAUNOL foram calculados empregando o modelo 2 (monocompartimental) do programa Phoenix-WinNonLin® versão 6.4 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA).

As concentrações livres da daunorrubicina e daunorrubicinol no plasma foram avaliadas no tempo de observação da concentração plasmática máxima (Cmax) na fase ß de eliminação, para garantir a sensibilidade em uma etapa em que o equilíbrio já tivesse sido estabelecido.

Já em urina, os parâmetros farmacocinéticos da DAUN e do DAUNOL foram calculados empregando o modelo não compartimental.

6. RESULTADOS

A **Figura 2** apresenta os espectros de massas das moléculas protonadas $[M + H]^+$ da DAUN, do DAUNOL e da DOXO (PI). Os íons produtos monitorados foram selecionados com base na maior intensidade do sinal.

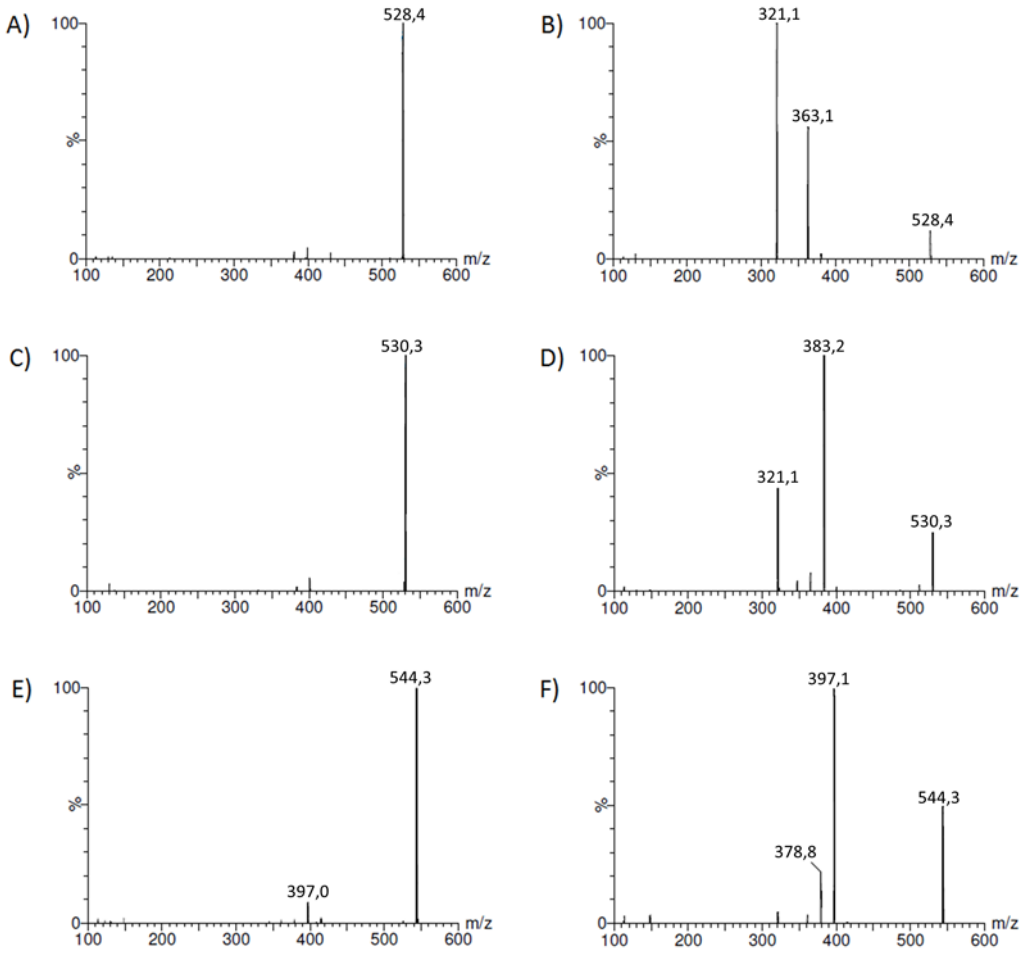

Figura 2: Espectros de massas das moléculas protonadas da daunorrubicina (A) e seus íons produtos (B); daunorrubicinol (C) e seus íons produtos (D); e doxorrubicina (PI) (E) e seus íons produtos (F).

A **Figura 3** mostra os cromatogramas referentes à análise dos íons monitorados da DAUN, DAUNOL e PI, respectivamente, em plasma, ultrafiltrado do plasma e urina brancos.

Os cromatogramas em amostras de plasma apresentados na **Figura 4** mostram que a DAUN, o DAUNOL e o padrão interno DOXO foram eluídos em menos de 5 min (Tempos de retenção: PI = 2,8 min, DAUNOL = 3,1 min e DAUN = 4,3 min). As **Figuras 5** e **6** apresentam os cromatogramas referentes à análise da DAUN e seu metabólito DAUNOL, respectivamente, em ultrafiltrado de plasma e em urina.

Os limites de confiança do método de análise da DAUN e DAUNOL em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina, bem como os limites de confiança do teste de ligação inespecífica à membrada do dispositivo para ultrafiltração estão apresentados nas **Tabelas 2** e **3** .

Os valores de porcentagem de desvio obtidos nos resultados de estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento (-80 até 25 °C), pós-processamento (12 °C durante 24 h) e à temperatura ambiente (25 °C durante 5 h) foram inferiores a 15%, indicando que os analitos permaneceram estáveis nas condições avaliadas.

O teste de ligação inespecífica à membrana apresentou resultados de EPR de -13,92 e -11,55% para o CQB e o CQA, respectivamente, da DAUN, e de -13,89 e -10,82% para o CQB e o CQA, respectivamente, do DAUNOL.

As curvas de concentração plasmática *versus* tempo da DAUN e do DAUNOL da paciente investigada estão apresentadas na **Figura 7**, e as curvas de velocidade de excreção urinária de ambos os analitos *versus* tempo médio do período de coleta (*midpoint)* estão apresentadas na **Figura 8**.

Os parâmetros farmacocinéticos, bem com a fração livre, estão apresentados na **Tabela 4**. Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN (tricompartimental) e DAUNOL (monocompartimental) avaliados como concentração plasmática total para a paciente diagnosticada com LMA foram calculados após a terceira infusão de DAUN.

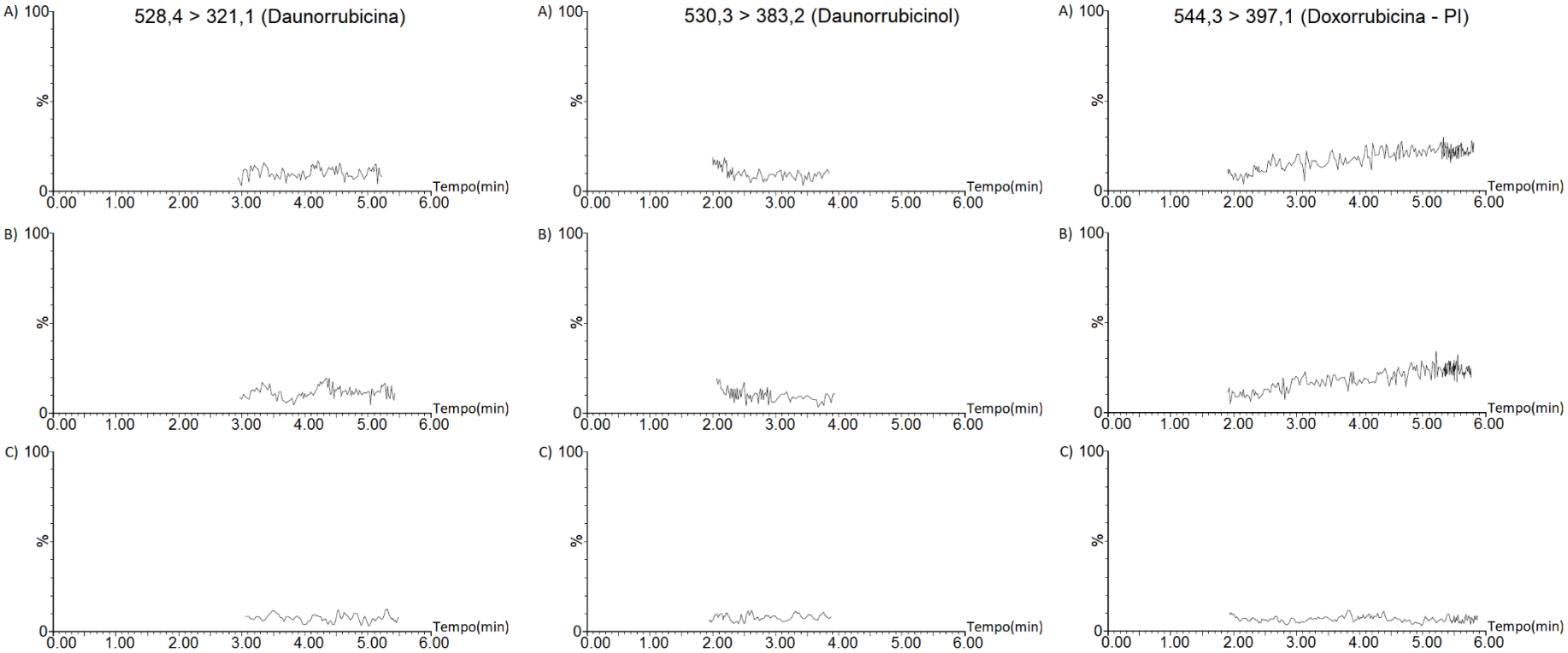

Figura 3: Cromatogramas referentes às matrizes branco em plasma (A), ultrafiltrado de plasma (B) e urina (C) analisadas nas transições da DAUN, do DAUNOL e do padrão interno DOXO.

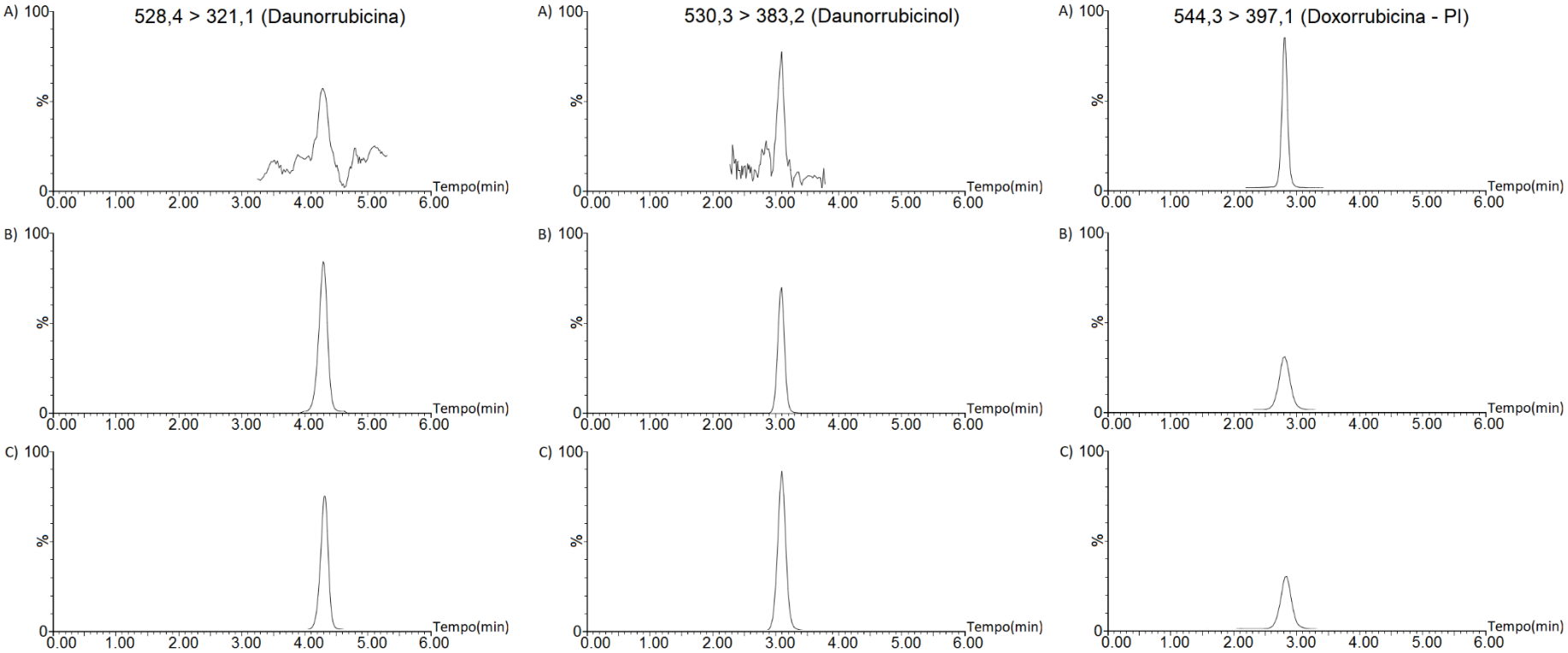

Figura 4: Cromatogramas referentes à análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em plasma. (A) Limite inferior de quantificação (0,1 ng/mL); (B) Plasma branco enriquecido com os analitos na concentração de 100 ng/mL; (C) Plasma de uma paciente com LMA coletado ao final da infusão de 60mg/m^2/24 h de daunorrubicina.

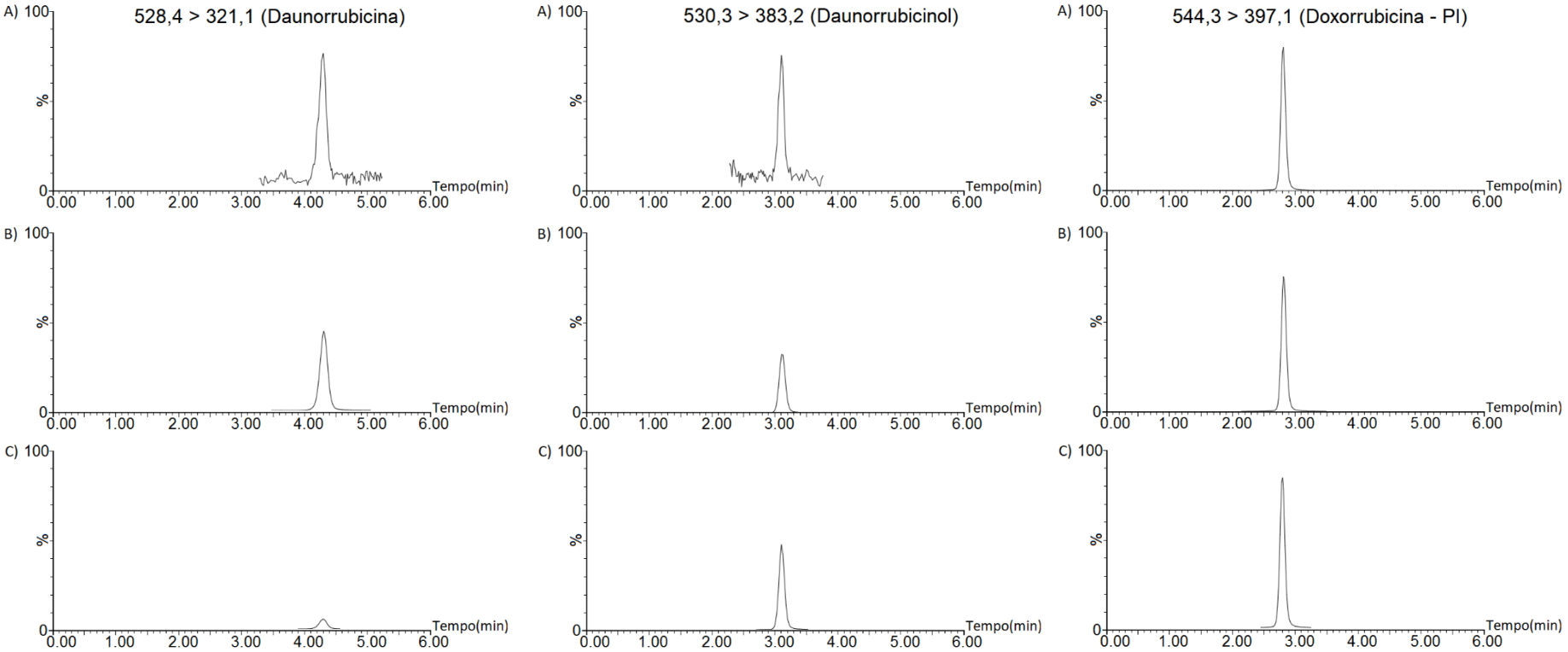

Figura 5: Cromatogramas referentes à análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em ultrafiltrado de plasma. (A) Limite inferior de quantificação (0,05 ng/mL); (B) Ultrafiltrado de plasma branco enriquecido com os analitos na concentração de 10 ng/mL; (C) Ultrafiltrado de plasma de uma paciente com LMA coletado 8h após o término da terceira infusão de 60mg/m^2/24 h de daunorrubicina.

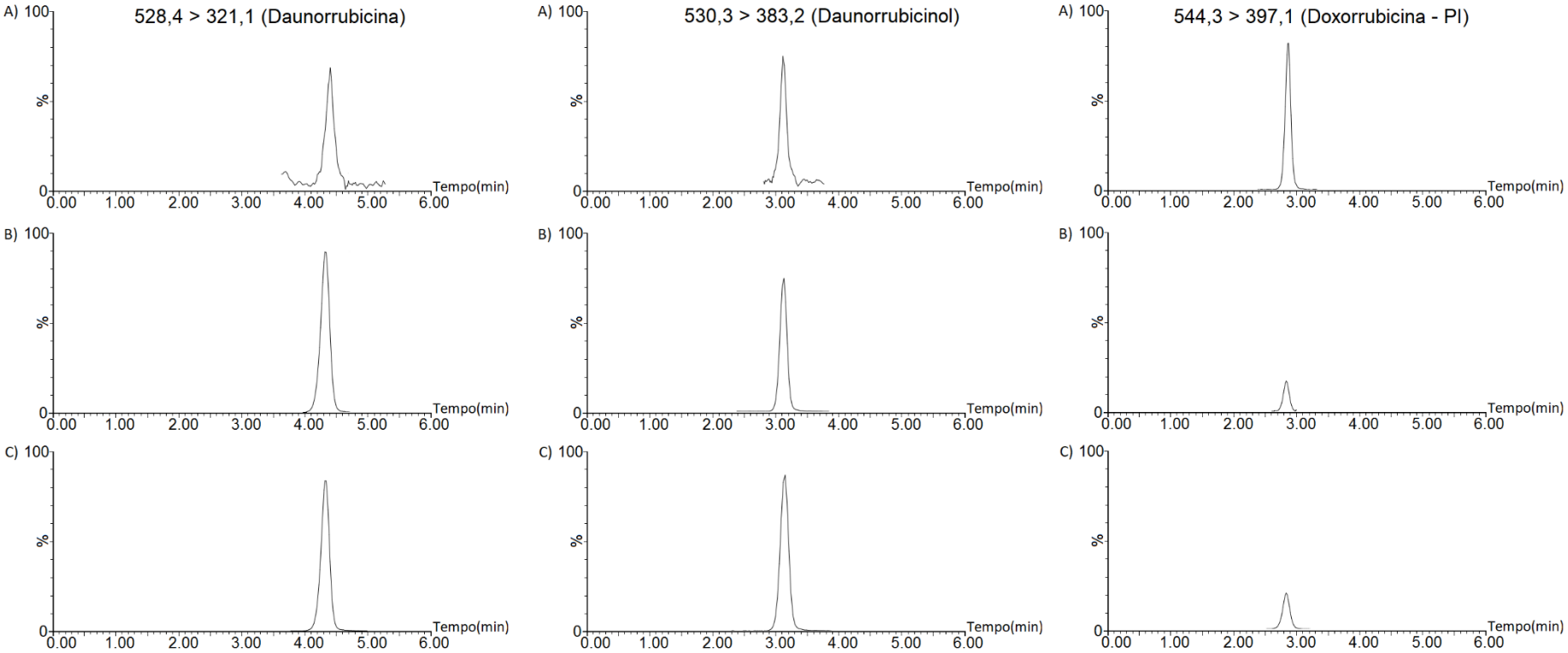

Figura 6: Cromatogramas referentes à análise da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em urina. (A) Limite inferior de quantificação (0,5 ng/mL); (B) Urina enriquecida com os analitos na concentração de 100 ng/mL; (C) Urina de uma paciente com LMA coletada no período de 72 - 96h após o término da terceira infusão de 60mg/m^2/24 h de daunorrubicina.

Tabela 2: Limites de confiança do método de análise da DAUN em amostras de plasma, ultrafiltrado de plasma e urina.

	Plasma		Ultrafiltrado		Urina	
Efeito Matriz (FMN)	**média**	**CV (%)**	**média**	**CV (%)**	**média**	**CV (%)**
	1,25	13,82	1,16	6,82	1,15	4,79
Linearidade (ng/mL)	0,1 – 1000		0,05 – 40		0,5 - 3000	
r	0,99456		0,99452		0,99642	
equação	y = 0,096*x + 0,0005		y = 0,086*x + 0,002		y = 0,074*x + 0,004	
Intra-corrida (n=6) (%)	**CV**	**EPR**	**CV**	**EPR**	**CV**	**EPR**
LIQ	11,60	1,21	6,88	13,35	5,72	5,90
CQB	11,47	3,39	8,03	6,13	4,31	0,65
CQM	4,56	3,83	0,87	13,74	4,19	8,32
CQA	4,68	9,41	2,50	6,60	2,57	11,63
CQD (1:10)	4,36	8,76	-	-	6,26	5,24
Intercorridas (n=6) (%)						
LIQ	9,75	3,08	12,60	3,79	7,01	4,67
CQB	8,72	0,49	6,23	7,82	4,16	-0,49
CQM	4,05	5,67	3,22	10,78	3,65	7,79
CQA	3,93	9,78	4,18	-7,35	3,19	11,55
CQD (1:10)	4,00	10,47	-	-	5,35	5,34
Estabilidade						
Congelamento/Descongelamento (n=3 ciclos)						
CQB (n=6)	9,05	3,16	4,86	0,56	3,28	-5,46
CQA (n=6)	4,27	9,56	1,54	5,01	3,32	0,01
Curta duração						
CQB (n=6)	10,52	14,90	4,31	5,04	7,17	-6,78
CQA (n=6)	6,00	12,46	1,61	-0,19	3,37	5,95
Pós processamento						
CQB (n=6)	8,89	1,33	6,73	5,88	4,97	-6,96
CQA (n=6)	3,17	9,86	1,26	4,53	4,33	8,36

Teste de ligação inespecífica à membrana do dispositivo de ultrafiltração			
	não filtrado CV %	**ultrafiltrado CV %**	**EPR* %**
CQB (n = 5)	3,34	9,29	-13,91
CQA (n = 5)	5,74	6,63	-11,55

FMN: Fator de matriz normalizado por PI. CV: coeficiente de variação. r: coeficiente de correlação. EPR: erro padrão relativo. LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD: controles de qualidade do limite inferior de quantificação, de baixa, média e alta concentração, e de diluição.

EPR* = $\left(\frac{Média\ do\ ultrafiltrado - média\ do\ não\ filtrado}{média\ do\ não\ filtrado}\right) x\ 100$

Tabela 3: Limites de confiança do método analítico do metabólito DAUNOL em amostras de plasma, ultrafiltrado de plasma e urina.

	Plasma		**Ultrafiltrado**		**Urina**	
Efeito Matriz (FMN)	**média**	**CV (%)**	**média**	**CV(%)**	**média**	**CV (%)**
	1,17	11,01	1,08	5,78	1,06	4,15
Linearidade (ng/mL)	0,1 – 1000		0,05 – 40		0,5 - 3000	
r	0,99671		0,99517		0,99623	
equação	y = 0,048**x* + 0,002		y = 0,049**x* + 0,002		y = 0,048**x* + 0,001	
Intra-corrida (n=6) (%)	**CV**	**EPR**	**CV**	**EPR**	**CV**	**EPR**
LIQ	6,14	13,24	4,94	5,55	5,48	-2,82
CQB	8,53	7,23	7,18	10,34	7,80	-6,49
CQM	2,11	8,24	3,07	5,80	2,98	-10,34
CQA	2,04	12,73	0,20	14,00	2,55	-4,30
CQD (1:10)	1,63	10,35	-	-	5,10	-6,65
Intercorridas (n=6) (%)						
LIQ	11,28	5,54	9,76	1,13	9,07	3,00
CQB	7,12	5,50	4,83	-10,03	6,94	-4,29
CQM	2,35	7,82	4,16	8,42	4,38	-7,47
CQA	2,56	10,91	5,34	-10,68	4,25	-0.08
CQD (1:10)	4,32	8,87	-	-	5,18	-4,05
Estabilidade						
Congelamento/Descongelamento (n=3 ciclos)						
CQB (n=6)	5,63	11,15	4,79	9,74	6,38	-3,29
CQA (n=6)	4,70	12,72	1,84	8,53	2,75	-0,39
Curta duração						
CQB (n=6)	4,02	12,25	6,27	-13,00	10,42	-0,46
CQA (n=6)	1,84	11,44	1,29	-8,94	3,27	4,49
Pós processamento						
CQB (n=6)	8,75	6,93	10,29	1,90	7,30	0,42
CQA (n=6)	1,83	9,17	1,03	5,97	4,11	6,99

Teste de ligação inespecífica à membrana do dispositivo de ultrafiltração			
	não filtrado CV %	**ultrafiltrado CV %**	**EPR* %**
CQB (n = 5)	6,13	2,97	-13,89
CQA (n = 5)	4,14	3,49	-10,82

FMN: Fator de matriz normalizado por PI. CV: coeficiente de variação. r: coeficiente de correlação. EPR: erro padrão relativo. LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD: controles de qualidade do limite inferior de quantificação, de baixa, média e alta concentração, e de diluição.

EPR* = $\left(\frac{Média\ do\ ultrafiltrado - média\ do\ não\ filtrado}{média\ do\ não\ filtrado}\right) x\ 100$

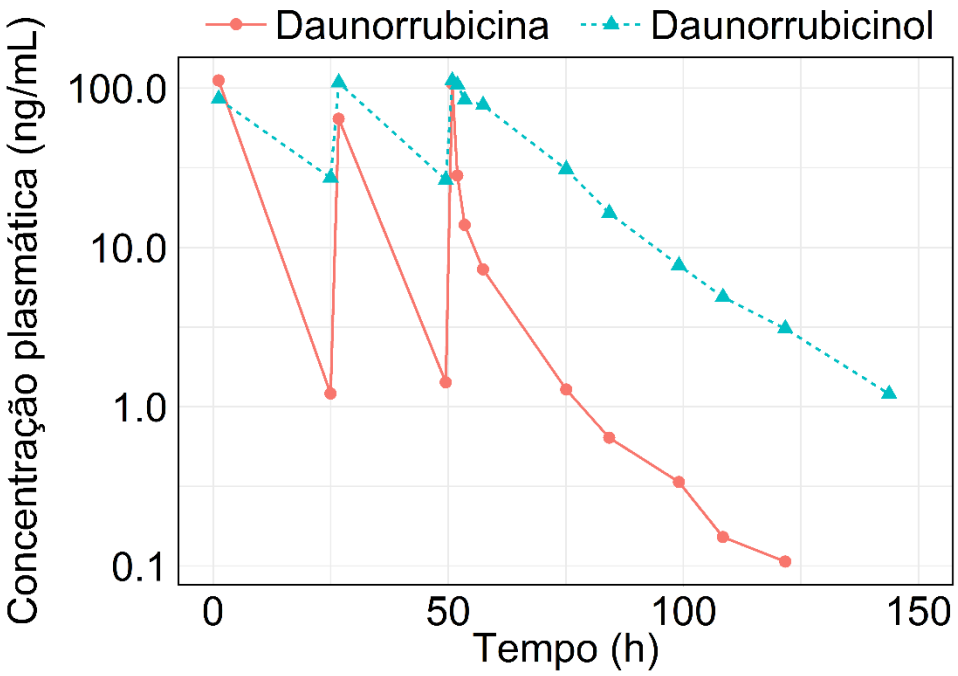

Figura 7: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol em uma paciente diagnosticada com LMA tratada com 3 infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora.

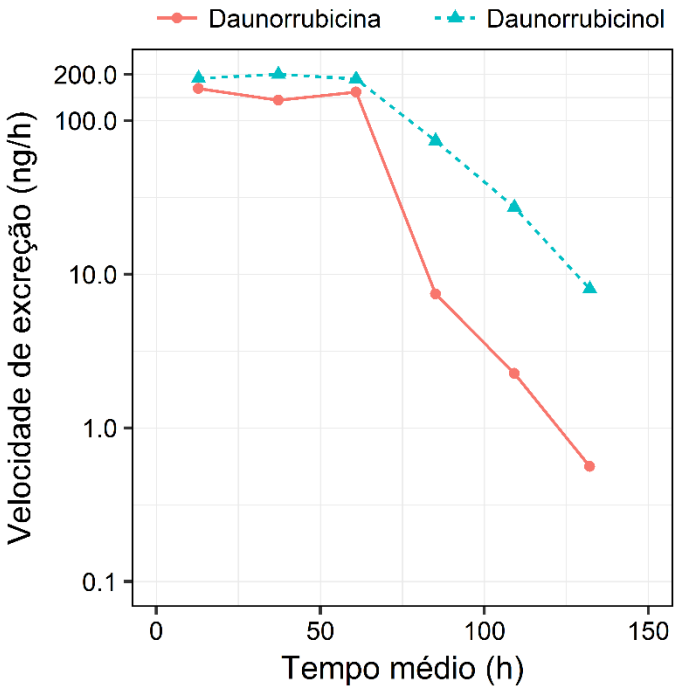

Figura 8: Curvas de velocidade de excreção urinária da daunorrubicina e do daunorrubicinol *versus* tempo médio do período de coleta de uma paciente diagnosticada com LMA tratada com 3 infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora.

Tabela 4: Disposição cinética da daunorrubicina e do daunorrubicinol após a infusão endovenosa durante 1 hora da terceira dose de 60mg/m^2 de daunorrubicina a uma paciente portadora de LMA.

Parâmetro	Daunorrubicina	Daunorrubicinol
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	307,79	2106,94
C_{max} (ng/mL)	112,11	107,60
Vd_{ss} (L)	2115,71	-
CL (L/h)	319,70	-
MRT (h)	6,62	18,89
Vd_1 (L)	361,90	-
α (h^{-1})	1,84	-
t ½ α (h)	0,37	-
Vd_2 (L)	719,55	-
β (h^{-1})	0,19	-
t ½ β (h)	3,58	-
Vd_3 (L)	1034,25	-
γ (h^{-1})	0,05	-
t ½ γ (h)	13,62	-
t ½ (h)	-	13,09
$AUMC^{0-\infty}$ (ng.h.h/mL)	-	41239,96
K10 (1/h)	-	0,05
Fração Livre	0,36	0,30
Fel (%)	4,05	7,27
CL renal (L/h)	12,36	-
CL_M (L/h)	-	22,19
CL hepático (L/h)	307,34	-

$AUC^{0-\infty}$: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; **$AUMC^{0-\infty}$**: área sob o primeiro momento da curva (concentração x tempo) *versus* tempo; **Cmax**: concentração plasmática máxima; **Vdss**: volume de distribuição no estado de equilíbrio; **CL**: *clearance* total; **MRT**: tempo médio de residência; **Vd_1**: volume de distribuição no compartimento central; **α**: constante de velocidade de distribuição; **t ½ α**: meia vida de distribuição; **Vd_2**: volume de distribuição no segundo compartimento; **β**: constante de velocidade de eliminação rápida; **t ½ β**: meia-vida de eliminação rápida; **Vd_3**: volume de distribuição no terceiro compartimento; **γ**: constante de velocidade de eliminação lenta; **t ½ γ**: meia vida de eliminação lenta; **K10** constante de velocidade de eliminação do compartimento central. **Fel:** fração da dose excretada na urina; **CL renal:** *clearance* renal; **CL_M:** *clearance* de formação do metabólito; **CL hepático:** *clearance* hepático.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo reporta o desenvolvimento e a validação de métodos de análise sequencial da DAUN e seu metabólito DAUNOL em plasma, ultrafiltrado e urina empregando LC-MS/MS. Os métodos foram aplicados no estudo da farmacocinética da DAUN e seu metabólito DAUNOL em uma paciente diagnosticada com leucemia mieloide aguda, após a administração da terceira infusão de 60 mg/m^2/dia.

O método de análise sequencial da DAUN e DAUNOL em plasma exigiu sensibilidade para quantificar as concentrações plasmáticas obtidas até 96 horas após a administração da DAUN (60 mg/m^2) em função da variabilidade dos valores de meias-vidas de eliminação lenta ($t_{1/2}\gamma$) entre 6 e 47 h reportados na literatura (GESSNER et al., 1987; ROBERT et al., 1992). O desenvolvimento do método ainda exigiu pequenos volumes de plasma (50 μL) com o propósito de sua aplicação em pacientes adultos e pediátricos.

Como as estruturas químicas das antraciclinas são muito semelhantes entre si, estudos disponíveis na literatura reportam, frequentemente, a escolha de uma delas como padrão interno para determinar as concentrações de outra (YANG, 2007). A doxorrubicina, uma antraciclina de estrutura e propriedades físico-químicas similares à daunorrubicina, foi utilizada no presente estudo como padrão interno, já que apresentou resultados adequados em relação à separação cromatográfica, e apresentou-se estável nas condições de preparo de amostra.

O tempo de corrida cromatográfica é um parâmetro importante a ser considerado quando tratamos de métodos analíticos aplicados a grande número de amostras biológicas. O tempo da corrida cromatográfica total utilizando uma coluna de fase reversa LiChrospher® 60 RP-Select B sob eluição isocrática foi de 5 min. Apenas o estudo de Yang et al. (2006) reporta tempo de corrida cromatográfica inferior a 5 min (3 minutos), porém sob eluição em gradiente. Métodos analíticos aplicados em estudos farmacocinética clínica requerem a análise sequencial de grande número de amostras biológicas e, portanto, a eluição em gradiente pode representar uma desvantagem para o reequilíbrio da coluna cromatográfica entre análises sequenciais, aumentando o tempo entre as injeções. O presente trabalho disponibiliza a vantagem de se trabalhar com fase móvel em eluição isocrática e sem a utilização de tampão. Outros estudos reportam tempos de corrida cromatográfica entre 9,1 a 17,2 min para a DAUN e de 6,7 a 15,8 min para o DAUNOL (LACHÂTRE et al., 2000; SOTTANI et al., 2008; MAUDENS et al., 2009; FOGLI et al., 2013).

A precipitação proteica das amostras de plasma com acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico representa um procedimento simples e rápido, de fácil execução, que evita perdas

durante a evaporação do solvente e durante transferências entres os tubos, seguido da injeção direta do sobrenadante ao sistema de HPLC. Este procedimento apresenta-se como vantajoso frente à análise do grande número de amostras requerido em estudos de farmacocinética. A análise de diferentes amostras branco de plasma não apresentou picos interferentes de componentes endógenos nos tempos de retenção dos analitos de interesse, nem do padrão interno, indicando que o método apresenta adequada seletividade **(Figura 3)**. Os coeficientes de variação obtidos para todos os fatores de matriz normalizado por padrão interno (FMN) foram inferiores a 15%, demonstrando a ausência de efeito matriz **(Tabela 2)**. As amostras de branco de matrizes analisadas imediatamente após as amostras correspondentes dos LSQs não apresentaram picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos, indicando a ausência de efeito residual proveniente de injeções anteriores.

O método desenvolvido e validado no presente estudo apresenta LIQ de 0,1ng/mL de plasma para a DAUN e DAUNOL utilizando alíquotas de apenas 50 μL de plasma. Assim, o presente método é mais sensível do que os relatados na literatura empregando detector por fluorescência (BOLANOWSKA et al., 1983; KROGH-MADSEN et al., 2010; FOGLI et al., 2013), MS (LACHÂTRE et al., 2000) ou MS/MS (YANG, 2007) com alíquotas de plasma variando entre 100-500 μL de plasma ou soro humano ou plasma de ratos. Vale ressaltar que o único estudo que emprega LC-MS/MS para a análise da DAUN (YANG, 2007) não analisa o metabólito DAUNOL, utiliza alíquotas de 100 μL de plasma de rato e reporta LIQ de 0,25 ng/mL de plasma.

O método para a análise sequencial da DAUN e DAUNOL em plasma mostrou linearidade no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,1-1000 ng/mL **(Tabelas 2 e 3)**. Os estudos de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e erro padrão relativo inferiores a 15% inferindo que os métodos são exatos e precisos **(Tabelas 2 e 3)**.

Os testes de estabilidade apresentaram coeficientes de variação inferiores a 15%, garantindo a estabilidade após três ciclos de congelamento/descongelamento, após 5 h na bancada à temperatura ambiente e 24 h após o processamento (amostras mantidas no injetor a 12 ° C) **(Tabelas 2 e 3)**.

O método aqui descrito utilizando LC-MS/MS permitiu quantificar a DAUN e o DAUNOL em plasma por até 96 h após a administração da terceira infusão de 60mg/m^2/dia de daunorrubicina, e pode ser considerado o de maior sensibilidade até então reportado na literatura utilizando alíquotas de apenas 50 μL de plasma.

O método de análise da concentração livre da DAUN e DAUNOL em plasma desenvolvido e validado no presente estudo é semelhante ao método de análise para a

determinação da concentração total em plasma, exceto pela exigência de um procedimento prévio capaz de separar o fármaco livre do fármaco ligado às proteínas plasmáticas. No presente estudo foi empregado o método de ultrafiltração utilizando o dispositivo *Centrifree*®, um dispositivo que resulta na formação de um ultrafiltrado, no qual o fármaco livre encontra-se na mesma concentração da amostra não filtrada, pois o fármaco ligado às proteínas do plasma não atinge o ultrafiltrado (MILLIPORE CORPORATION, 2018a, 2018b).

As amostras de plasma foram adicionadas de tampão fosfato 0,1 M pH = 7,4 (1:1, v/v) antes do procedimento de ultrafiltração com o propósito de manter os ultrafiltrados em pH próximo a 7,4, pois a DAUN é instável em pH maior que 8 (BOSANQUET, 1986; MANIEZ-DEVOS ET AL., 1986). Ressalta-se que as amostras de plasma de pH 7,4 resultam em ultrafiltrados com valores de pH variando entre 9 a 10. Seguindo as recomendações desse estudo, as amostras de plasma e os CQs foram preparados utilizando alíquotas de 150 µL de plasma adicionadas de 150 µL de tampão fosfato (pH 7,4), sendo coletados 50 µL do ultrafiltrado. Nestas condições, os estudos de precisão, exatidão e estabilidades apresentaram coeficientes de variação e erro padrão relativo menores que 15% **(Tabelas 2 e 3)**.

O tempo de ultrafiltração representa um fator limitante para a viabilidade da análise em função da degradação dos analitos em pH básico e da constante de equilíbrio entre os ligantes e os sítios de ligação à proteína (WHITAKER et al., 2008). Dessa forma, a etapa de ultrafiltração foi realizada no menor tempo possível (10 min) e com volume de ultrafiltrado inferior a 40% do volume inicial com o propósito de manter a concentração do fármaco livre constante (SEBILLE, 1990; WHITAKER et al., 2008). Também foi realizado o teste de ligação inespecífica (NSB) dos analitos à membrana do dispositivo de ultrafiltração. Os resultados das soluções ultrafiltradas foram comparados com as soluções não submetidas ao procedimento de ultrafiltração e os valores de EPR encontrados foram de -13,92 e -11,55% para o CQB e o CQA, respectivamente, da daunorrubicina, e de -13,89 e -10,82% para o CQB e o CQA, respectivamente, do daunorrubicinol (**Tabelas 2 e 3**). Os valores inferiores a 15% indicaram que a porcentagem dos analitos retidos no filtro não altera a precisão e a exatidão da análise da concentração livre no plasma.

O método de análise da concentração livre da DAUN e DAUNOL em plasma apresentado no presente estudo é o primeiro a empregar LC-MS/MS, é o primeiro a analisar o metabólito DAUNOL em ultrafiltrado, é o mais sensível da literatura (LIQ=0,05 ng/mL de ultrafiltrado) quando comparado aos métodos que utilizam eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser (LIF), com LIQ de 50ng/mL de ultrafiltrado utilizando

alíquotas de 500 µL de plasma (WHITAKER et al., 2008) ou HPLC com detecção por fluorescência (ROBERT et al., 1980; CHASSANY et al., 1996).

O método desenvolvido e validado no presente estudo para a análise da DAUN e DAUNOL em urina utiliza alíquotas de apenas 50 µL e emprega o mesmo procedimento de preparo da amostra relatado para o plasma e ultrafiltrado. Os dados mostram ausência de efeito matriz (**Tabelas 2 e 3**) e ausência de efeito residual. O método apresenta ampla faixa de linearidade (0,5-3000 ng/mL de urina) e sensibilidade (LIQ=0,5 ng/mL) **(Tabelas 2 e 3)** compatível para analisar as concentrações de DAUN e DAUNOL em amostra de urina coletada no intervalo de 72-96 h após a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2). Outros métodos da literatura de análise da DAUN em urina empregando LC-MS/MS relatam valores de LIQ tão baixos quanto 0,03-0,15 ng/mL em urina, mas utilizam volumes de 5 mL de urina, empregam extração em fase sólida como preparo de amostra e não analisam o metabólito DAUNOL (SOTTANI et al., 2004, 2008).

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados na investigação da farmacocinética da DAUN e do DAUNOL em uma paciente diagnosticada com leucemia mieloide aguda após ter recebido a terceira infusão de 60 mg/m^2 de DAUN. As **Figuras 7 e 8** mostram que os métodos de análise da DAUN e DAUNOL em plasma e urina, respetivamente, permitiram a quantificação de amostras obtidas até aproximadamente 96 h à partir da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia durante três dias consecutivos). A razão metabólica AUC_{DAUNOL}/AUC_{DAUN} foi de aproximadamente 7, as meias-vidas de eliminação de aproximadamente 13 h para a DAUN (**t ½ γ)** e DAUNOL (t ½) e o *clearance* total da DAUN de 319,70 L/h **(Tabela 4)**.

Resultados próximos foram observados por Galletis et al. (1994) com valores de *clearance* total da DAUN de 212 L/h após infusão endovenosa de 50 mg/m^2 do fármaco durante 15 minutos. A fração recuperada na urina foi de 4,05% como fármaco inalterado e 7,27% como metabólito DAUNOL. Os citados valores de fração eliminada na urina foram usados para o cálculo do *clearance* renal da DAUN (12,36 L/h), *clearance* não renal da DAUN (307,34 L/h) e *clearance* de formação do metabólito DAUNOL (22,19 L/h). Não há dados na literatura referentes aos valores de *clearances* renal e não renal da DAUN, assim com o para o *clearance* de formação do metabólito DAUNOL.

A ligação da DAUN às proteínas plasmáticas foi de 64%, enquanto a ligação do metabólito DAUNOL foi de 70% **(Tabela 4)**. Valores similares de ligação da DAUN às proteínas plasmáticas (60-90%) foram relatados em estudos anteriores da literatura (EKSBORG

et al., 1982; CHASSANY et al., 1996; WHITAKER et al., 2008). Não há dados de ligação do metabólito DAUNOL às proteínas plasmáticas.

O método desenvolvido e validado para a análise sequencial de DAUN e seu metabólito DAUNOL em plasma, ultrafiltrado e urina empregando LC-MS/MS apresenta sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos clínicos para a investigação da farmacocinética e do metabolismo da DAUN.

8. CONCLUSÕES

1 - Os métodos de análise sequencial da DAUN e DAUNOL em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina empregando LC-MS/MS foram validados nos intervalos de 0,1 a 1000 ng/mL de plasma, 0,05 a 40 ng/mL de ultrafiltrado e de 0,5 a 3000 ng/mL de urina.

2 - Os métodos de análise sequencial da DAUN e DAUNOL permitiram a quantificação de amostras de plasma e urina até 144 h após o início da primeira infusão de DAUN de 60 mg/m^2/dia durante 3 dias.

3 - A razão metabólica AUC $_{DAUNOL}$/AUC $_{DAUN}$ foi de aproximadamente 7 para uma paciente diagnosticada com leucemia mielóide aguda e tratada com infusão de DAUN de 60 mg/m^2/dia durante 3 dias. As meias-vidas de eliminação foram de aproximadamente 13 h para a DAUN (t ½ γ) e DAUNOL (t ½) e o *clearance* total da DAUN de 319,70 L/h.

4 - A ligação da DAUN às proteínas plasmáticas foi de 64%, enquanto a ligação do metabólito DAUNOL foi de 70%.

5 - A fração recuperada na urina foi de 4,05% como fármaco inalterado e 7,27% como metabólito DAUNOL. O *clearance* renal da DAUN foi de 12,36 L/h, o *clearance* não renal da DAUN de 307,34 L/h e o *clearance* de formação do metabólito DAUNOL de 22,19 L/h.

9. REFERÊNCIAS

ANVISA, **RDC N° 27 de 17 de maio de 2012**. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html, 2012).

BOLANOWSKA, W.; GESSNER, T.; PREISLER, H. A Simplified Method for Determination of Daunorubicin, Adriamycin , and their Chief Fluorescent Metabolites in Human Plasma by High-Pressure Liquid Chromatography. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 10, p. 187-191, 1983.

BOSANQUET, A. G. Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. II. Assay methods, adriamycin and the other antitumour antibiotics. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 1986.

BROWN, J. E.; WILKINSON, P. A.; BROWN, J. R. Rapid high-performance liquid chromatograpbic assay for the authracycliues daunorubicin and 7-con-O-methylnogarol in plasma. **Journal of Chromatography**, v. 226, p. 521-525, 1981.

CHASSANY, O. et al. Comparative serum protein binding of anthracycline derivatives. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 38, n. 6, p. 571-3, 1996.

DOMBRET, H.; GARDIN, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 127, n. 1, p. 53-61, 2016.

EKSBORG, S.; EHRSSON, H. Liquid Chromatographic determination of daunorubicin and daunorubicinol in plasma from leukemic patients. **Journal of Chromatography**, v. 153, p. 211-218, 1978.

EKSBORG, S.; EHRSSON, H.; EKQVIST, B. Protein binding of anthraquinone glycosides, with special reference to adriamycin. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 10, p. 7-10, 1982.

FOGLI, S. et al. An Improved HPLC Method for Therapeutic Drug Monitoring of Daunorubicin, Idarubicin, Doxorubicin, Epirubicin, and Their 13-Dihydro Metabolites in Human Plasma. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 1-36, 2013.

GALETTIS, P.; BOUTAGY, J.; MA, D. D. Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. **British journal of cancer**, v. 70, p. 324-9, 1994.

GESSNER, T. et al. Plasma levels of daunorubicin metabolites and the outcome of ANLL therapy. **Medical oncology and tumor pharmacotherapy**, v. 4, p. 23-31, 1987.

KROGH-MADSEN, M.; HANSEN, S. H.; HONORÉ, P. H. Simultaneous determination of cytosine arabinoside, daunorubicin and etoposide in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1967-1972, 2010.

LACHÂTRE, F. et al. Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of chromatography. B**, v. 738, p. 281-91, 2000.

MANIEZ-DEVOS, D. M. et al. Degradation of doxorubicin and daunorubicin in human and rabbit biological fluids. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 4, p. 353-65, 1986.

MAUDENS, K. E. et al. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 3907-3915, 2009.

MILLIPORE CORPORATION. Assay of Free Anticonvulsant Drugs, Application note, AN1002EN00. Disponível em: www.millipore.com/publications.

MILLIPORE CORPORATION. Clinical Guidelines for Monitoring Free Drug Concentration: An Overview. Disponível em: www.millipore.com/publications.

ROBERT, J. Extraction of Anthracyclines from Biological Fluids for HPLC Evaluation. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 3, p. 1561-1572, 1980.

ROBERT, J.; RIGAL-HUGUET, F.; HURTELOUP, P. Comparative pharmacokinetic study of idarubicin and daunorubicin in leukemia patients. **Hematological Oncology**, v. 10, p. 111-116, 1992.

SEBILLE, B. Methods of drug protein binding determinations. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 4, p. 151-161, 1990.

SHAFER, D.; GRANT, S. Update on rational targeted therapy in AML. **Blood reviews**, v. 30, p. 275-83, 2016.

SOTTANI, C. et al. Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid

chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 22, p. 2645-2659, 2008.

_____. Trace determination of anthracyclines in urine: a new high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for assessing exposure of hospital personnel. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 2426-2436, 2004.

VARATHARAJAN, S. et al. Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. **European journal of clinical pharmacology**, v. 68, p. 1577-86, 2012.

_____. Population pharmacokinetics of Daunorubicin in adult patients with acute myeloid leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, p. 1051-1058, 2016.

WHITAKER, G. et al. CE-LIF method for the separation of anthracyclines: application to protein binding analysis in plasma using ultrafiltration. **Journal of separation science**, v. 31, p. 1828-33, 2008.

YANG, Y. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantification of daunorubicin in rat plasma. **Talanta**, v. 71, p. 596-604, 2007.

Capítulo II

Farmacocinética compartimental da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda

1. INTRODUÇÃO

As antraciclinas são amplamente usadas no tratamento da LMA há mais de 50 anos. No entanto, o mecanismo de ação destes fármacos continua incerto, incluindo a intercalação ao DNA com consequente inibição de sua síntese; a formação de espécies reativas de oxigênio com consequente dano ao DNA e peroxidação lipídica; a interferência na função da enzima helicase e a inibição da enzima topoisomerase II. No entanto, mesmo que a prévia intercalação ao DNA seja necessária para a atividade antineoplásica das antraciclinas, essa intercalação, por si só, não elimina as células leucêmicas. A inibição da enzima topoisomerase II (enzima nuclear essencial que regula a topologia do DNA durante vários processos: replicação, transcrição e recombinação) permanece como o efeito citotóxico predominante e mais aceito. A DAUN entra nas células por difusão passiva e liga-se ao complexo ternário (também chamado de complexo clivável) formado pela associação entre DNA, enzima e fármaco na região próxima ao sítio de clivagem do DNA. Ela estabiliza esse complexo, permitindo que o DNA seja fragmentado pela topoisomerase II, mas impede que a mesma enzima execute o passo seguinte, a religação dos fragmentos, levando a célula à apoptose (ZUNINO et al., 2001; MELE et al., 2016; MADONNA, 2017).

O uso clínico das antraciclinas infelizmente é limitado por algumas desvantagens, tais como a grande possibilidade de desenvolver resistência aos antineoplásicos utilizados, a mielossupressão, afetando particularmente neutrófilos e plaquetas, náuseas, vômitos, diarreia, estomatite, alopecia, tromboflebites e a cardiotoxicidade, que pode resultar em arritmia e insuficiência cardíaca congestiva (REIS-MENDES et al., 2016).

A cardiotoxicidade induzida pelo tratamento com DAUN é complexa e multifatorial, sendo influenciada pela dose administrada, idade ou ainda interações medicamentosas. Além disso, a variabilidade genética interindividual e o estado de saúde do paciente durante e após o tratamento também apresentam impacto considerável nos efeitos cardiovasculares dos medicamentos utilizados (COSTA et al., 2013; REIS-MENDES et al., 2016).

Diversos mecanismos foram sugeridos para tentar explicar a cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas. As hipóteses mais amplamente aceitas são o estresse oxidativo causado pela formação de espécies reativas de oxigênio durante o ciclo de redução do fármaco original; a presença de metabólitos cardiotóxicos que tendem a se acumular nas células cardíacas e que apresentam prolongada meia-vida de eliminação e as mudanças na homeostase do cálcio e do ferro (MENNA et al., 2012; REIS-MENDES et al., 2016; SALVATORELLI et al., 2018).

A redução da carbonila presente no carbono-13 da DAUN resulta na formação do álcool secundário daunorrubicinol (DAUNOL), o qual apresenta capacidade significativamente menor de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* quando comparado ao fármaco inalterado, além de estar associado à cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas. Esse padrão principal de biotransformação é mediado por uma família heterogênea de enzimas citossólicas dependentes de NADH, composta pelas carbonil-redutases (CBR) e as aldo-ceto redutases (AKR). A DAUN é metabolizada ao DAUNOL principalmente pelas CBR (isoformas *CBR1* e *CBR3*) e, em menor extensão, pelas AKR **(Figura 1 – Introdução geral)**. Esse metabolismo ocorre em todas as células, já que as enzimas envolvidas são distribuídas por todo o organismo. As antraciclinas e seus metabólitos também são substratos de glutationa S-transferases (GSTM1, GSTP1 e GSTT1) (SKARKA et al., 2011; EDWARDSON et al., 2015). Thompson et al. (2014) relatam menores valores de *clearance* da DAUN em pacientes com o genótipo GSTP1*B/*B quando comparados aos pacientes com o genótipo GSTP1*A/*A ou tipo selvagem.

A variabilidade interindividual no metabolismo da DAUN pode resultar em complicações potenciais tanto na toxicidade quanto na eficácia do fármaco, reforçando a importância de se entender os fatores que influenciam essa variabilidade. Conforme foi demonstrado por estudos recentes, os pacientes genotipados com a variante *CBR1* rs25678CG+GG tendem a apresentar maior área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de DAUN do que os pacientes genotipados com o alelo selvagem rs25678CC. Diferentemente, a área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de DAUNOL não demonstra nenhuma associação significativa com a expressão das isoformas *CBR1* e *CBR3*. Portanto, o aumento na expressão de CBR leva à perda da eficácia do fármaco. Com base na literatura disponível, são conhecidas quatro isoformas de CBR, sendo que é suposto que a super expressão de *CBR1* possa contribuir com a resistência à DAUN pelo aumento da conversão ao metabólito DAUNOL (VARATHARAJAN et al., 2012, 2017).

Os estudos da farmacocinética clássica da DAUN e seu metabólito DAUNOL são escassos, antigos e com muitas lacunas, uma vez que a literatura de maneira geral usa dados da doxorrubicina para descreve a farmacocinética da daunorrubicina (PISKA et al., 2017). Os estudos da farmacocinética da DAUN e seu metabólito DAUNOL mostram que a meia-vida de eliminação do metabólito (37,3 h) é prolongada em relação ao fármaco inalterado (7,98 h) em pacientes com LMA (ROBERT et al., 1992; GALETTIS et al., 1994). Outros estudos não relatam a meia-vida de eliminação do metabólito DAUNOL provavelmente em função do relativo curto período de amostragem (≤ 24h) (PAUL et al., 1980; GALETTIS et al., 1994). As

razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN obtidas em amostras coletadas 3 h após a primeira, segunda e terceira infusões de DAUN variaram entre 2,36-3,26 (GESSNER et al., 1987), enquanto as razões de área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) DAUNOL/DAUN foram de 4,71 em pacientes com LMA (ROBERT et al., 1992, 1993).

Considerando que a DAUN e o metabólito DAUNOL diferem em termos de eficácia e toxicidade, as razões DAUNOL/DAUN podem contribuir na identificação dos fatores que interferem na resistência ao câncer, pois células leucêmicas transfectadas com o gene CBR1 exibem redução da citotoxicidade a DAUN em função da quase total conversão ao metabólito DAUNOL (94%) após 2 h (GONZALEZ ET AL., 1995). Outro estudo mostra correlação entre a expressão de CBR1, a concentração intracelular do metabólito DAUNOL e a redução da citotoxicidade a DAUN em células primárias derivadas de pacientes com LMA (VARATHARAJAN et al., 2012). Assim, o presente estudo visa avaliar as razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN observadas em função do tempo até 144 h após o início da primeira infusão em pacientes adultos diagnosticados com LMA. O estudo ainda reporta a farmacocinética compartimental da DAUN e DAUNOL com dados oriundos de urina e plasma como concentração total e concentração livre nos referidos pacientes investigados quanto aos polimorfismos dos genes CBR1 e GSTP1.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a farmacocinética da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em plasma e urina de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda empregando modelo não compartimental.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN observadas em função do tempo até 144 h após o início da primeira infusão em pacientes adultos diagnosticados com leucemia mieloide aguda.

-Desenvolver o modelo de farmacocinética compartimental da DAUN e seu metabólito DAUNOL em plasma e urina de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda.

-Avaliar a fração livre da DAUN e seu metabólito DAUNOL pacientes portadores de leucemia mieloide aguda.

-Investigar os polimorfismos dos genes *CBR1 e GSTP1* nos pacientes portadores de leucemia mieloide aguda.

-Correlacionar os polimorfismos dos genes *CBR1 e GSTP1* com os valores de AUC da DAUN e do DAUNOL.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/HCFMRP-USP) em 25 de março de 2015, de acordo com o processo n° 9064/2014 (ANEXO A). O projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP-USP) em 26 de junho de 2015 (ANEXO B).

Os pacientes receberam explicação detalhada dos procedimentos e foram incluídos no estudo somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Foi garantida ao paciente a liberdade de recusar a participar ou de retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo ao seu tratamento.

Ressalta-se que esta pesquisa não interferiu nos protocolos vigentes do hospital local para o tratamento dos pacientes investigados.

3.2. Casuística

Foram investigados pacientes adultos (> 12 anos; n=12) diagnosticados com LMA com indicação para uso da DAUN, atendidos no HCFMRP-USP no período de setembro de 2015 a abril de 2017.

3.3. Protocolo clínico

O protocolo clínico está descrito em detalhes no item 4 do Capítulo I. Antes do início do estudo, uma amostra de sangue total periférico foi coletada com EDTA para a realização dos estudos de genotipagem. A seguir, todos os pacientes adultos (n=12) investigados receberam DAUN (60 mg/m^2/dia) por infusão intravenosa de 1 h durante 3 dias consecutivos. As coletas seriadas de sangue foram realizadas ao longo das 3 infusões, como segue: no término da primeira infusão, 24 h após o término da primeira infusão, no término da segunda infusão, 24 h após o início da segunda infusão, no término da terceira infusão e 1, 2, 6, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h após o término da terceira infusão. As amostras de sangue (alíquotas de 4,5 mL) coletadas em tubos contendo citrato de sódio tamponado como anticoagulante, foram centrifugadas (1400 g durante 10 min a 4 °C) e os plasmas armazenados a -80 °C até a análise. A urina total foi coletada em intervalos de 24 h (frascos individuais) desde o início até 144 h após o início da primeira infusão de DAUN. A urina total referente a cada período de 24 h foi mensurada e uma alíquota de 15 mL armazenada a -80 °C até a análise. O protocolo de coleta de amostras biológicas está apresentado na **Figura 9**.

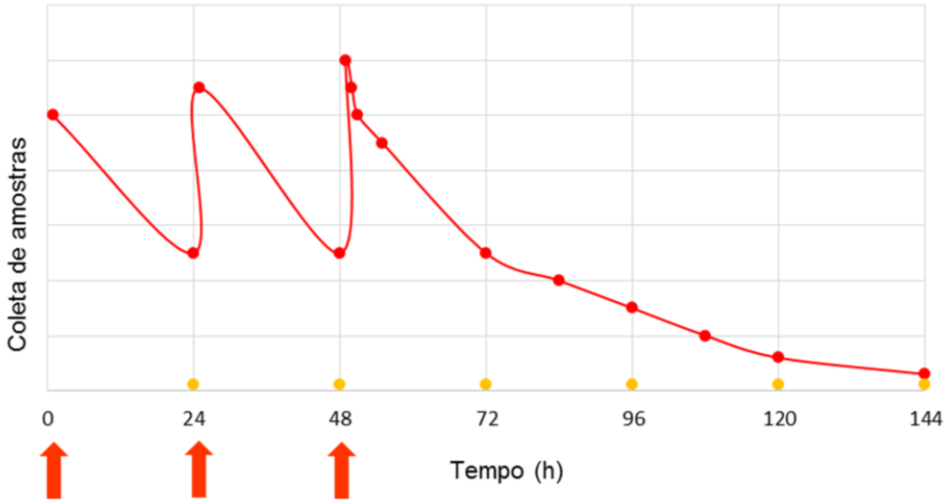

Figura 9: Esquema de coletas de sangue e urina. As setas laranjas representam as infusões de DAUN (60 mg/m^2). Os círculos vermelhos representam as coletas de sangue e os amarelos as coletas de urina.

3.4 Determinação dos genótipos dos genes CBR1 e GSTP1

O DNA genômico foi extraído de uma amostra de sangue total periférico coletada com EDTA, empregando o *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (QIAGEN, Hombrechtikon, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio de discriminação alélica (*TaqMan® Real-Time PCR Assays*, Applied BiosystemsTM, Foster City, CA, EUA) para a identificação dos polimorfismos (*single nucleotide polymorphism* - SNP) foi realizado utilizando o termociclador *Roche LightCycler 480* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), mensurando a fluorescência final emitida da clivagem na sonda específica para o alelo (*Endpoint Genotying Analysis*). Foram avaliados os alelos mais frequentes dos genes CBR1 e GSTP1, de acordo com a descrição apresentada na **Tabela 5**. A avaliação dos ensaios foi realizada pelo programa *LightCycler 480*, versão 1,5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

Tabela 5: Descrição dos principais polimorfismos dos genes *CBR1 e GSTP1*

Gene	dbSNP	Variante
CBR1	rs25678	312G>C
GSTP1	rs1695	1578A>G

4. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN e do seu metabólito DAUNOL foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo ou de excreção urinária *versus* tempo *midpoint*. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.4 (Certara USA, Inc., Princeton, NJ, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN foram avaliados empregando modelo bicompartimental (modelo 10), enquanto os parâmetros farmacocinéticos do DAUNOL foram avaliados empregando modelo monocompartimental (modelo 2).

Para os dados em urina, os parâmetros farmacocinéticos da DAUN e do seu metabólito DAUNOL foram calculados empregando modelo não compartimental do mesmo programa.

Os valores de área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo da DAUN e DAUNOL foram calculados pelo método dos trapezoides no período do início até 96 h da terceira infusão (AUC^{0-96}) e com extrapolação para o infinito ($AUC^{0-\infty}$). O *clearance* total (Cl_T) foi obtido dividindo a Dose da DAUN pela $AUC^{0-\infty}$. O volume de distribuição (Vss) foi calculado pela equação padrão do *software.*

Os volumes de distribuição dos dois compartimentos (Vss) da daunorrubicina foram calculados pelas equações padrão do programa. A área sob a curva concentração plasmática versus tempo (AUC) do daunorrubicinol foi calculada até 96 h pelo método dos trapezoides seguido por extrapolação para o infinito.

As concentrações livres da DAUN e DAUNOL foram avaliadas em amostras de plasma correspondentes aos valores de Cmax da fase de eliminação β da terceira infusão de DAUN de cada paciente investigado. A fração livre no plasma (F_u) foi determinada pela divisão: concentração livre no plasma/concentração total no plasma.

A quantidade de DAUN inalterada (Ae) ou metabolizada a DAUNOL (M) excretada na urina em cada período de coleta foi determinada multiplicando-se a concentração urinária (C_u) pelo correspondente volume de urina (V_u) coletado no período. A quantidade excretada na urina de 24 h foi obtida através da somatória dos valores referentes a cada período de coleta.

O cálculo da quantidade de DAUN excretada como metabólito DAUNOL ($F_{el\ M}$) foi realizado após a correção da quantidade do metabólito excretado (M) através do peso molecular da DAUN.

A fração da dose de DAUN excretada inalterada (F_{el}) ou metabolizada ($F_{el\ M}$) foi calculada dividindo-se, respectivamente, (Ae) ou (M) pela dose de DAUN.

O *clearance* renal (Cl ren) da DAUN foi calculado dividindo-se a quantidade de DAUN excretada na urina (Ae) pela AUC da DAUN no plasma no mesmo intervalo de tempo *t*.

O *clearance* de formação (Cl_M) do DAUNOL foi calculado multiplicando-se o *clearance* total da DAUN (Cl_T) pela fração de DAUNOL excretada na urina de 48 h ($F_{el\ M}$) (KEARNS et al., 2003).

O *clearance* renal (Cl ren) da DAUN foi calculado multiplicando-se o *clearance* total pela fração da dose excretada na urina de 48 h (F_{el}) (KEARNS et al., 2003).

O *clearance* hepático (Cl hep) da DAUN foi calculado subtraindo-se o *clearance* renal (Cl ren) do *clearance* total (Cl) da DAUN (KEARNS et al., 2003; BENET, 2010).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados preliminares estão expressos através das médias e intervalos de confiança 95% (IC 95%). Os testes estatísticos para a análise dos dados experimentais foram realizados com o auxílio dos programas R versão 3.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria) e RStudio® versão 0.99.903 (RStudio, Inc., Boston, MA, EUA).

6. RESULTADOS

Os dados antropométricos e o tratamento dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12) estão apresentados na **Tabela 6** como dados individuais. Todos os pacientes receberam citarabina, dexametasona e ondasentrona em associação com a DAUN (60 mg/m^2/dia) administrada durante 3 dias consecutivos por infusão endovenosa de 1 h. A evolução clínica ao longo da primeira indução de remissão, período de avaliação dos pacientes investigados, está apresentada na **Tabela 7**. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes diagnosticados com LMA estão apresentados nas **Tabelas 8** e **9**.

Tabela 6: Características antropométricas e tratamento dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)

	Paciente												
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**Média (CV%)**
Sexo	F	F	M	F	F	M	F	M	M	F	F	F	--
Idade (anos)	28	23	63	53	50	52	21	27	67	31	37	41	41,08 (38,21)
Peso (kg)	99,7	64,2	79	96	69	76	88	72,7	96,6	76,7	62,0	56,5	78,03 (18,39)
Altura (m)	1,63	1,53	1,70	1,53	1,60	1,73	1,63	1,81	1,77	1,59	1,60	1,49	1,63 (6,11)
IMC (Kg/m^2)	37,5	27,4	27,3	41,0	26,9	25,4	33,12	22,19	30,83	30,34	24,22	25,45	29,32 (19,02)
ASC (m^2)	2,12	1,65	1,93	1,92	1,72	1,90	1,93	1,92	2,14	1,80	1,64	1,50	1,85 (10,42)
Daunorrubicina Dose (mg)	127,2	99,0	115,8	115,0	103,4	114,0	115,8	115,0	128,0	108,0	98,4	90,0	110,80 (10,36)
Medicamentos associados	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	--

IMC Índice de massa corporal; ASC Área superficial corporal
1-dexametasona, **2-** citarabina, **3-**ondasentrona

Tabela 7: Evolução clínica ao longo da primeira indução de remissão dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Disfunção hepática*	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Moderada[1]	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Hepatotoxicidade durante a 1ª infusão	Modera[2]	Nenhuma	---	---	Nenhuma	Nenhuma	Grave[3]	Nenhuma	---	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Insuficiência renal	Ausente	Ausente	Ausente	Moderada[4]	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Arritmia cardíaca*	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Infarto prévio do miocárdio*	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Fração de ejeção do ventrículo esquerdo	67	70	76	67	67	73	61	65	65	67	69	64
Disfunção cardíaca durante a 1ª infusão	Nenhuma	Nenhuma	Não reportada (óbito)	Não reportada (óbito)	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Não reportada	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
% de blastos no sangue*	66	10	81	20	37	0	29	1	10	57	1	0
% de blastos na medula óssea*	88	54	89	0**	58	32	65	39	24	86	64	78
% de blastos na medula óssea após a 1ª indução	6	3	---	---	8	10	6	6	---	16	1	5
Avaliação da resposta após a 1ª indução	Remissão parcial	Remissão completa	---	---	Remissão parcial	Remissão parcial	Remissão parcial	Remissão parcial	---	Remissão parcial	Remissão completa	Remissão parcial
Estratificação de risco	D	I	---	---	I	I	D	D	---	D	I	F

*avaliação no momento do diagnóstico
Moderada[1]: bilirrubinas> 1,5 x limite superior do nível normal (ULNL) e TGO ou TGP> 2,5 x ULNL
Moderada[2]: disfunção moderada (bilirrubina 1,5 - 2,5)
Grave[3]: disfunção grave: bilirrubina> 2,5 x LSNL; TGO / TGO> 5 x ULNL
Moderada[4]: creatinina sérica 1,3 a 2 mg / dL
**: aspirado seco (*dry tap*)
D: desfavorável; I: intermediário; F: favorável

Tabela 8: Hemograma dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)

	VR	Unidade	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Glóbulos vermelhos	3,9 – 5,0	10^6/µL	2,21	2,68	2,33	2,51	2,19	2,28	1,94	2,99	2,58	2,57	2,2	2,28
Hemoglobina	12,0 – 15,5	g/dL	7,5	7,8	8,1	7,9	7,8	7,7	7,1	8,6	7,1	8,5	7,5	7,4
Hematócrito	35 – 45	%	21	23	19	22	23	24	20	27	20	26	21	21
VCM	82 – 98	FL	94,0	85	83	88	104	105	105	89	78	102	96	93
HCM	26 – 34	PG	34,1	29	34,8	31,4	35,9	33,8	36,4	28,9	27,6	33,2	33,7	32,3
CHCM	31 – 36	g/dL	36,1	34,2	42,1	35,7	34,7	32,2	34,7	32,6	35,2	32,7	35	34,6
RDW	11,9 – 15,5	%	16,7	14,9	18,3	13,3	14,5	17,2	16,2	19,6	14,7	18,5	19,4	13,8
Glóbulos brancos	3,5 – 10,5	10^6/µL	36,6	2,0	288,5	1,6	15,2	1,5	1,1	78,8	5,7	42	5,6	10,5
Neutrófilos	1,7 – 8,0	10^6/µL	6,8	0,7	25,7	0	3,0	0,3	0,2	49,6	3,3	1,3	2,8	0,6
Linfócitos	0,9 – 2,9	10^6/µL	14,8	0,5	5,7	0,7	3,0	1,0	0,8	4,0	2,1	2,6	1,6	9,4
Monócitos	0,3 – 0,9	10^6/µL	4,2	0	17,1	0,1	2,7	0,1	0,1	0,8	0	1,8	0,1	0,4
Eosinófilos	0,05 – 0,5	10^6/µL	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0
Basófilos	0,0 – 0,1	10^6/µL	10,5	0	2,9	0	0	0	0	0,8	0	0	0	0
Plaquetas	150 – 450	10^3/µL	133,0	135,0	66,0	31	74	19	36	123	44	80	66	22

VR: valores de referência; **VCM:** volume corpuscular médio; **HCM:** hemoglobina corpuscular média; **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média; **RDW:** *red cell distribution width*

Tabela 9: Parâmetros bioquímicos* dos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12)

	VR	Unidade	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Albumina	3,5 – 4,8	g/dL	3,9	3,7	2,8	3,8	3,5	4,2	3,8	4,0	3,8	4,4	4,3	3,1
ALT (TGP)	≤ 31,0	U/L	14,0	38,9	14,3	11,0	88,0	23,9	26,0	14,7	33,1	10,3	16	30,1
AST (TGO)	≤ 32,0	U/L	15,0	79,5	34,1	15,4	79,0	18,4	24,9	20,4	21,8	30,0	10,1	27,7
Bilirrubina total	0,2 – 1,2	mg/dL	0,42	0,25	0,57	0,5	0,3	0,42	0,81	0,38	1,4	0,4	0,95	0,3
Bilirrubina direta	≤ 0,3	mg/dL	0,1	0,11	0,23	0,1	0,1	0,11	0,25	0,17	0,5	0,2	0,24	0,1
Bilirrubina indireta	≤ 0,9	mg/dL	0,32	0,14	0,34	0,4	0,2	0,31	0,56	0,21	0,9	0,2	0,76	0,2
Ureia	10,0 - 50,0	mg/dL	20	13,0	75	30,0	--	46,0	17,0	33,0	33	33	20	35
Creatinina	0,7 – 1,5	mg/dL	0,86	0,65	2,08	0,69	0,52	0,95	0,62	1,17	1,33	0,79	0,7	1,07
Ácido úrico	2,0 – 5,0	mg/dL	3,1	2,10	8,9	6,8	4,10	6,9	1,6	3,9	4,8	4,5	3,6	2,84
Fosfatase Alcalina	65 – 300	U/L	98	348	123	420	283	164	121	202	229	111	170	97
Gama GT	11 – 50	U/L	43	180	71	51	65	41	130	59	87	16	18	42
Lactato desidrogenase	230 - 460	U/L	859	5390	883	858	1397	280	510	954	811	1365	387	3707
Proteínas totais	6,0 – 8,5	g/dL	7,20	--	7,20	6,20	6,3	5,5	--	5,8	--	--	--	5,0

*Avaliações bioquímicas realizadas no momento do diagnóstico

Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN foram avaliados empregando modelo bicompartimental de acordo com a estrutura apresentada na **Figura 10**, enquanto os parâmetros farmacocinéticos do DAUNOL foram avaliados empregando modelo monocompartimental de acordo com a estrutura apresentada na **Figura 11**. O modelo bicompartimental para a análise da daunorrubicina foi selecionado como base nos menores valores de CV referentes ao parâmetro AUC.

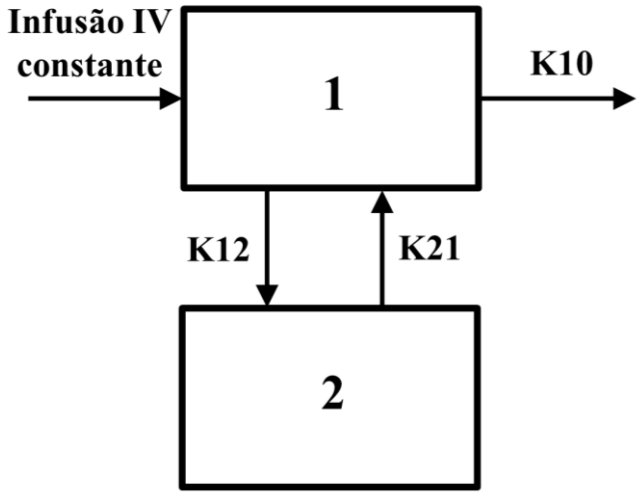

Figura 10: Esquema do modelo bicompartimental do programa Phoenix® WinNonlin® empregado nos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina como concentração total.

Figura 11: Esquema do modelo monocompartimental do programa Phoenix® WinNonlin® empregado nos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos do daunorrubicinol como concentração total.

As curvas de concentração plasmática total de daunorrubicina e daunorrubicinol em função do tempo estão apresentadas como concentrações observadas e concentrações preditas pelo programa Phoenix-WinNonlin®. As concentrações plasmáticas em função do tempo estão apresentadas como concentrações individuais na **Figura 12** e como média geométrica e IC 95% na **Figura 13**.

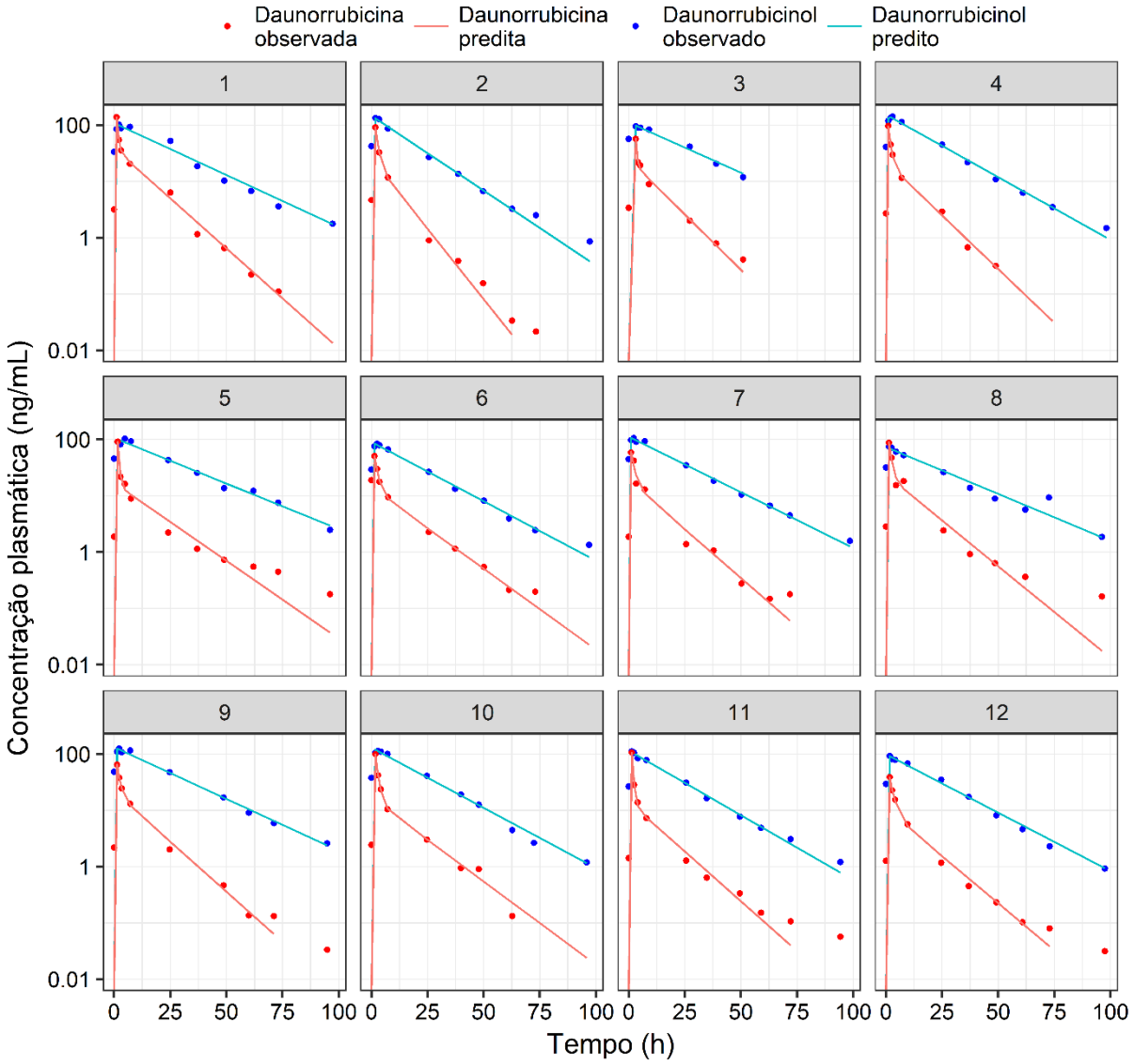

Figura 12: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol, observadas e preditas, pelos modelos do programa Phoenix® WinNonlin® até 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12). Dados individuais.

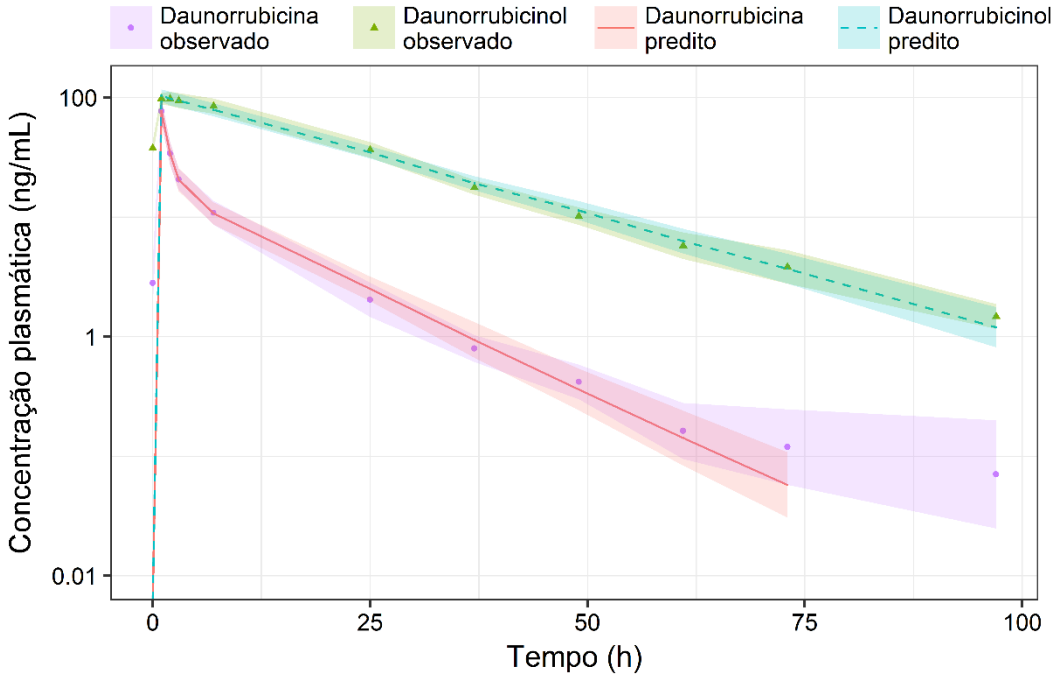

Figura 13: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol, observadas e preditas, pelos modelos do programa Phoenix® WinNonlin® até 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12). Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %.

As curvas concentração plasmática *versus* tempo da DAUN e do metabólito DAUNOL, obtidas para os pacientes investigados (n=12) seguindo a administração de três doses consecutivas de DAUN (60 mg/m^2/dia) administradas por infusão endovenosa de 1 h, estão apresentadas nas **Figuras 14** e **15**, respectivamente, como dados individuais e como média geométrica e IC 95%.

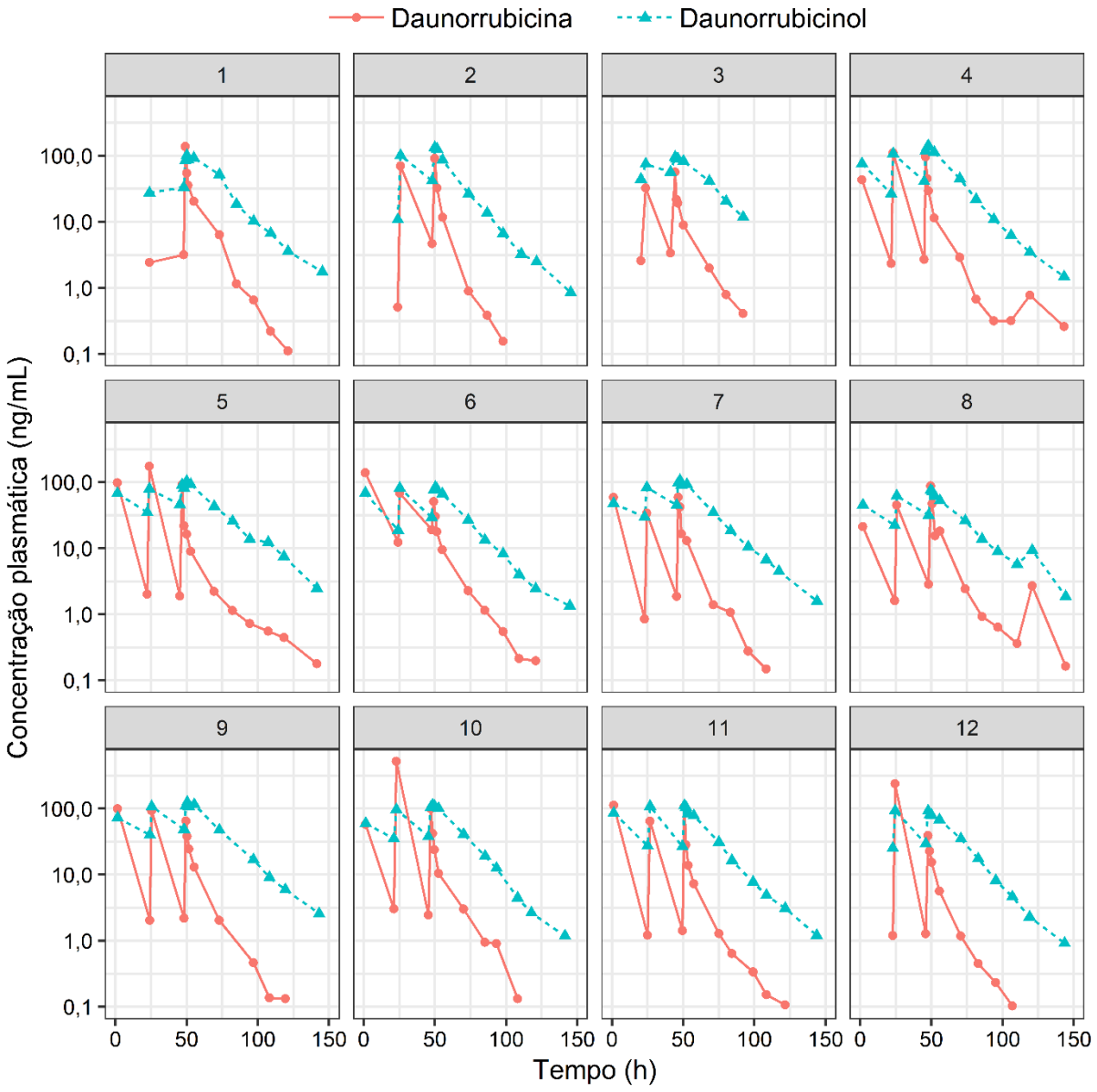

Figura 14: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Dados individuais.

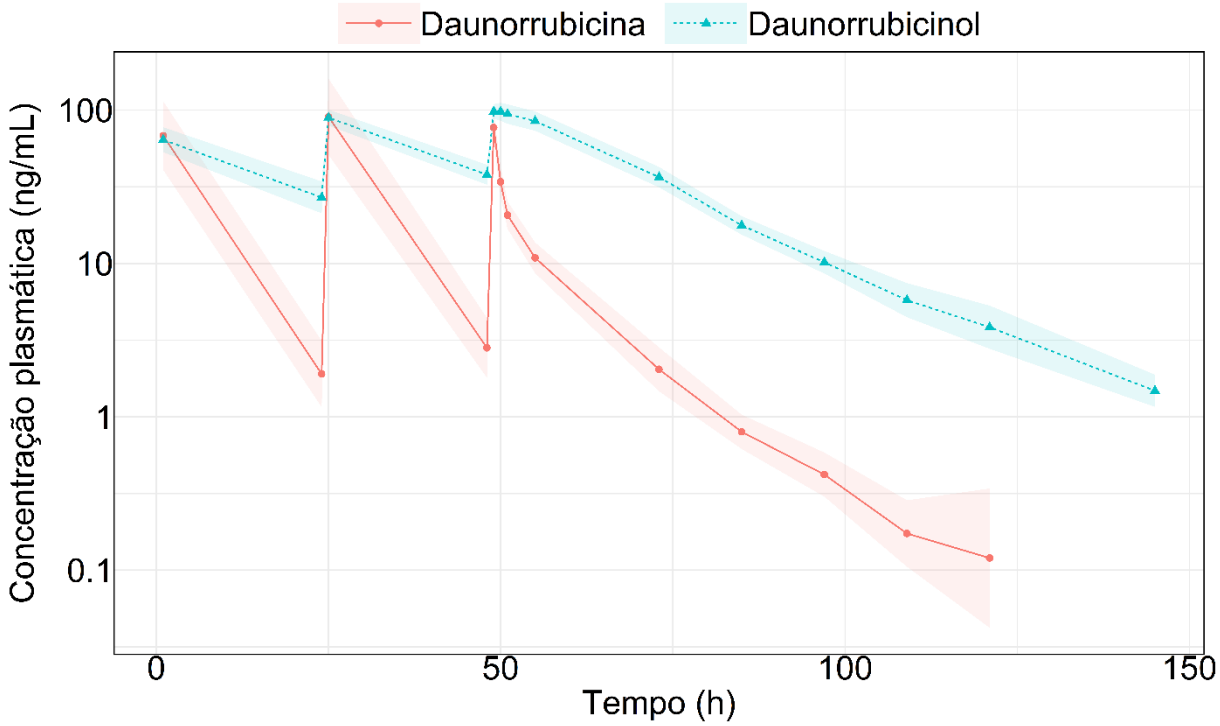

Figura 15: Curvas de concentração plasmática total *versus* tempo da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados e diagnosticados com LMA (n=12), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %.

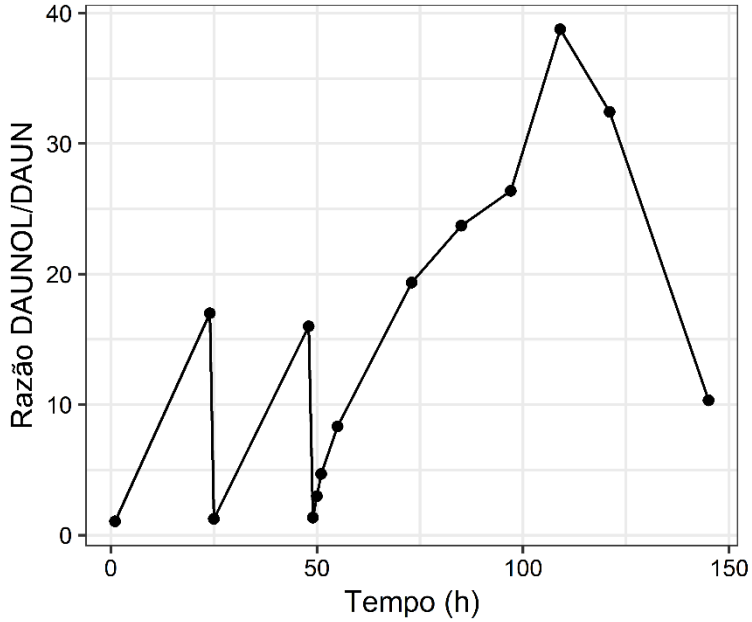

Figura 16: Razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN observadas em função do tempo seguindo a primeira, segunda e terceira infusões de daunorrubicina (60 mg/m^2 durante 1 h a cada 24 h). Dados apresentados como médias para os 12 pacientes adultos diagnosticados com LMA.

As curvas velocidade de excreção urinária *versus* tempo médio do período de coleta da DAUN e do metabólito DAUNOL, obtidas para os pacientes investigados (n=12) seguindo a administração de três doses consecutivas de DAUN (60 mg/m^2/dia) administradas por infusão endovenosa de 1 h, estão apresentadas nas **Figuras 17** e **18**, respectivamente, como dados individuais e como média geométrica e IC 95%.

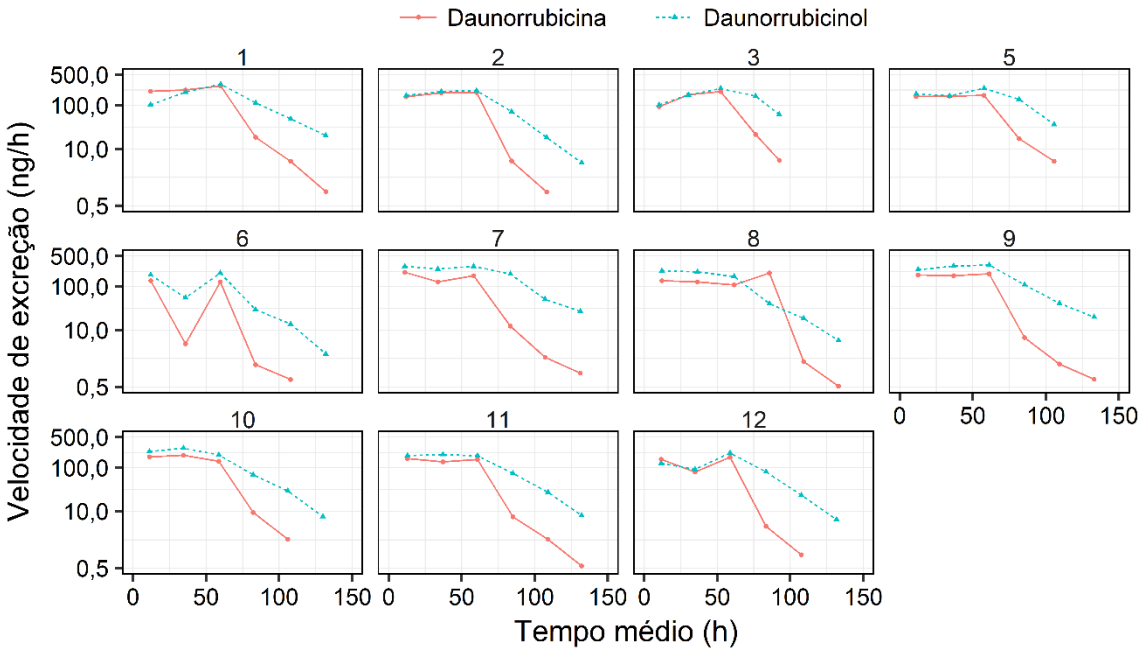

Figura 17: Curvas da velocidade de excreção urinária *versus* tempo médio do período de coleta da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Dados individuais.

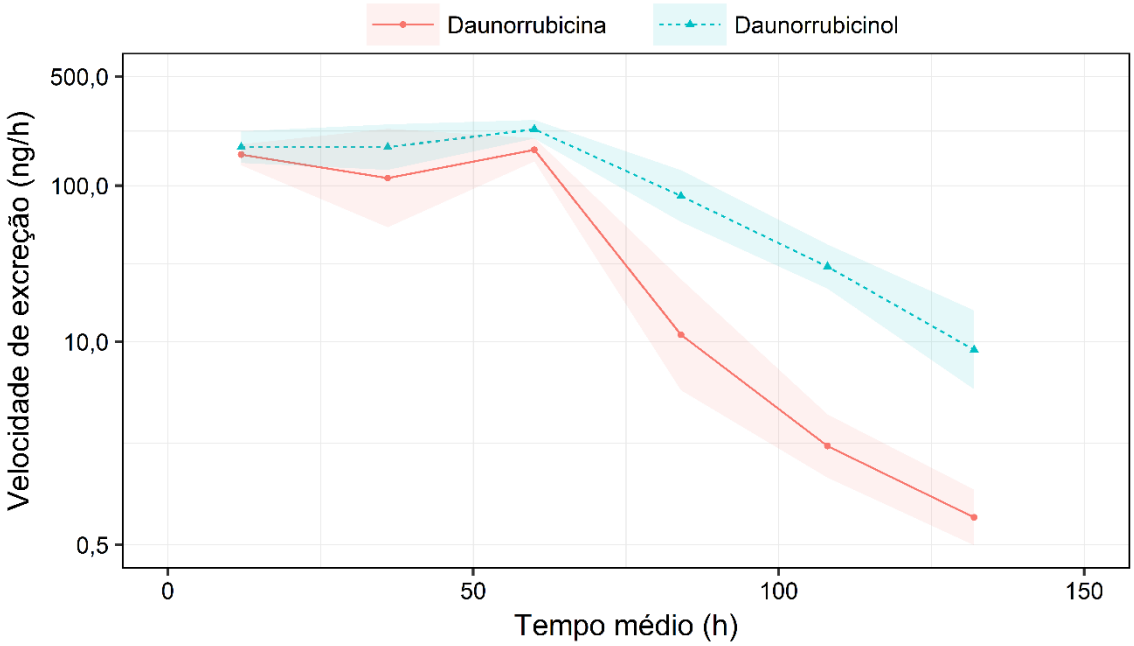

Figura 18: Curvas da velocidade de excreção urinária *versus* tempo médio do período de coleta da daunorrubicina e do daunorrubicinol referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), tratados com três infusões endovenosas de daunorrubicina (60 mg/m^2/dia) durante 1 hora. Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %.

Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN estão apresentados na **Tabela 10** como média geométrica e IC 95% e na **Tabela 11** como dados individuais. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos com dados de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia).

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo bicompartimental da daunorrubicina para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Os dados estão apresentados como média geométrica e IC 95%.

Parâmetro	daunorrubicina Média geométrica (IC 95%)	CV (%)
C_{max} (ng/mL)	96,02 (75,95 – 121,38)	6,50
$t_{½\alpha}$ (h)	0,67 (0,55 – 0,83)	15,34
$t_{½\beta}$ (h)	8,70 (7,98 – 9,48)	11,65
α (1/h)	1,03 (0,84 – 1,27)	15,36
β (1/h)	0,08 (0,07 – 0,09)	11,66
A (ng/mL)	146,10 (103,09 – 207,07)	12,80
B (ng/mL)	18,44 (15,38 – 22,12)	16,99
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	380,75 (329,78 – 439,59)	5,84
$AUMC_{0-\infty}$ (h^2.ng/mL)	3325,10 (2808,37 – 3936,90)	13,74
MRT (h)	8,05 (7,13 – 9,09)	10,88
V_{ss} (L)	2331,25 (1892,98 – 2870,99)	9,70
V_1 (L)	659,56 (477,77 – 910,51)	11,83
V_2 (L)	1622,91 (1330,67 – 1979,33)	12,34
Cl (L/h)	289,54 (254,20 – 329,54)	5,94
K_{10} (1/h)	0,44 (0,35 – 0,55)	10,98
K_{12} (1/h)	0,46 (0,35 – 0,60)	21,56
K_{21} (1/h)	0,19 (0,16 – 0,21)	17,09

C_{max}: concentração plasmática máxima; **$t_{½\alpha}$:** meia-vida de distribuição; **$t_{½\beta}$:** meia-vida de eliminação; **α:** constante de velocidade de distribuição; **β:** constante de velocidade de eliminação; **A:** intercepto da reta corrigida da fase de distribuição com o eixo das ordenadas; **B:** intercepto da reta corrigida da fase de eliminação com o eixo das ordenadas; **$AUC_{0-\infty}$:** área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **$AUMC_{0-\infty}$:** área sob o primeiro momento da curva "concentração plasmática × tempo" *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **MRT:** tempo de residência médio; **V_{ss}:** volume de distribuição estimado no estado de equilíbrio; **V_1:** volume de distribuição do compartimento central; **V_2:** volume de distribuição do compartimento periférico; **Cl:** *clearance* total; **K_{10}:** constante de velocidade de eliminação do fármaco do compartimento central; **K_{12}:** constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o compartimento periférico; **K_{21}** constante de velocidade de distribuição do compartimento periférico para o compartimento central.

Tabela 11: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo bicompartimental da daunorrubicina para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais.

	P1	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**	**P6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
C_{max} (ng/mL)	143,24	149,68	70,66	100,73	166,69	51,22	63,65	98,73	73,06	169,30	111,16	54,55
$t_{½\alpha}$ (h)	0,43	0,77	0,37	0,64	0,42	0,93	0,98	0,76	0,86	0,81	0,46	1,15
$t_{½\beta}$ (h)	8,48	6,03	7,64	7,90	10,91	10,47	8,69	9,26	8,47	10,19	8,52	9,00
α (1/h)	1,61	0,89	1,86	1,08	1,66	0,74	0,71	0,91	0,81	0,86	1,49	0,61
β (1/h)	0,08	0,11	0,09	0,09	0,06	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08
A (ng/mL)	240,44	205,88	289,24	142,42	343,07	62,26	64,64	128,95	80,60	236,51	228,98	59,68
B (ng/mL)	36,67	23,57	21,75	21,10	16,23	13,32	18,02	22,69	20,54	15,76	13,44	10,17
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	598,12	435,28	395,14	371,85	461,55	285,18	317,21	444,94	350,91	506,89	318,55	230,53
$AUMC_{0-\infty}$ (h^2.ng/mL)	5933,56	2298,03	3318,10	3080,75	4414,26	3354,21	3118,84	4481,18	3385,47	3998,86	2349,87	1990,71
MRT (h)	9,34	4,69	6,90	7,70	8,98	11,05	9,33	9,45	9,10	7,35	6,70	8,14
V_{ss} (L)	1985,32	1067,70	2021,34	2381,38	2011,57	4417,81	3406,80	2441,50	3318,46	1565,80	2070,22	3176,01
V_1 (L)	459,02	431,47	372,36	703,26	287,79	1508,25	1400,93	758,33	1265,58	428,10	405,91	1288,53
V_2 (L)	1526,30	636,23	1648,98	1678,12	1723,78	2909,55	2005,87	1683,16	2052,88	1137,70	1664,31	1887,48
Cl (L/h)	212,67	227,44	293,06	309,27	224,03	399,74	365,06	258,46	364,76	213,06	308,90	390,40
K_{10} (1/h)	0,46	0,53	0,79	0,44	0,78	0,27	0,26	0,34	0,29	0,50	0,76	0,30
K_{12} (1/h)	0,94	0,29	0,95	0,52	0,81	0,36	0,31	0,44	0,37	0,31	0,65	0,23
K_{21} (1/h)	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28

C_{max}: concentração plasmática máxima; **$t_{½\alpha}$:** meia-vida de distribuição; **$t_{½\beta}$:** meia-vida de eliminação; **α:** constante de velocidade de distribuição; **β:** constante de velocidade de eliminação; **A:** intercepto da reta corrigida da fase de distribuição com o eixo das ordenadas; **B:** intercepto da reta corrigida da fase de eliminação com o eixo das ordenadas; **$AUC_{0-\infty}$:** área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **$AUMC_{0-\infty}$:** área sob o primeiro momento da curva "concentração plasmática × tempo" *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **MRT:** tempo de residência médio; **V_{ss}:** volume de distribuição estimado no estado de equilíbrio; **V_1:** volume de distribuição do compartimento central; **V_2:** volume de distribuição do compartimento periférico; **Cl:** *clearance* total; **K_{10}:** constante de velocidade de eliminação do fármaco do compartimento central; **K_{12}:** constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o compartimento periférico; **K_{21}** constante de velocidade de distribuição do compartimento periférico para o compartimento central.

Os parâmetros farmacocinéticos do metabólito DAUNOL estão apresentados na **Tabela 12** como média geométrica e IC 95% e na **Tabela 13** como dados individuais. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos com dados de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia).

Tabela 12: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo monocompartimental do daunorrubicinol para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Os dados estão apresentados como média geométrica, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de variação.

Parâmetro	**daunorrubicinol Média (IC 95%)**	**CV (%)**
C_{max} (ng/mL)	106,43 (95,33 – 118,82)	3,85
Kel (1/h)	0,05 (0,04 – 0,05)	5,02
$t_{½}$ (h)	15,04 (13,92 – 16,26)	5,02
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	2380,87 (2171,46 – 2610,48)	4,48
$AUMC_{0-\infty}$ (h^2.ng/mL)	53242,86 (46804,20 – 60567,26)	8,51
MRT (h)	21,70 (20,09 – 23,45)	5,02

C_{max}: concentração plasmática máxima observada; **Kel:** constante de velocidade de eliminação; **$t_{½}$:** meia-vida de eliminação**; $AUC_{0-\infty}$:** área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **$AUMC_{0-\infty}$:** área sob o primeiro momento da curva "concentração plasmática × tempo" *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **MRT:** tempo de residência médio

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos avaliados por modelo monocompartimental do daunorrubicinol para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12) seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais.

	P1	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**	**P6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
C_{max} (ng/mL)	103,19	136,31	98,55	144,84	102,28	84,88	107,77	70,35	126,75	123,83	107,60	94,65
Kel (1/h)	0,04	0,06	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05
$t_{½}$ (h)	16,31	11,33	16,85	13,52	18,60	14,27	15,23	18,07	16,36	14,06	13,10	14,49
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	2489,31	2309,28	2547,34	2911,59	2804,19	1808,09	2422,69	1877,95	1877,95	2578,74	2106,95	2027,09
$AUMC_{0-\infty}$ (h^2.ng/mL)	60039,84	39106,95	65763,35	58512,96	76871,13	38498,90	54452,48	50124,06	73994,85	53688,91	41239,96	43403,75
MRT (h)	23,53	16,35	24,32	19,51	26,83	20,58	21,98	26,07	23,61	20,28	18,90	20,91

C_{max}: concentração plasmática máxima observada; **Kel:** constante de velocidade de eliminação; **$t_{½}$:** meia-vida de eliminação**; $AUC_{0-\infty}$:** área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **$AUMC_{0-\infty}$:** área sob o primeiro momento da curva "concentração plasmática × tempo" *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito; **MRT:** tempo de residência médio

Os valores de fração livre da DAUN e do metabólito DAUNOL estão apresentados na **Tabela 14** como média e IC 95%. Os valores de fração livre foram oriundos de amostras de plasma referentes aos valores de Cmax seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia) aos pacientes portadores de LMA (n=12).

Tabela14: Fração livre de daunorrubicina e do daunorrubicinol para os pacientes investigados portadores de LMA (n=12), avaliada em amostras de plasma referentes ao Cmax da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais, média e IC 95%.

Paciente	**Daunorrubicina (F_u %)**	**Daunorrubicinol (F_u %)**
1	4,70	17,00
2	14,32	22,74
3	37,03	34,46
4	29,96	35,13
5	32,36	30,35
6	25,35	33,74
7	21,26	29,28
8	20,71	29,81
9	31,18	31,65
10	26,54	24,67
11	35,88	29,95
12	43,51	39,75
Média (IC 95%)	23,91 (17,33 - 32,99)	29,23 (25,84 – 33,07)
CV (%)	14,66	8,72

As curvas de velocidade de excreção urinária de daunorrubicina e daunorrubicinol em função do tempo médio do período de coleta estão apresentadas como concentrações observadas e concentrações preditas pelo modelo não compartimental. As velocidades de excreção urinária em função do tempo estão apresentadas como concentrações individuais na **Figura 19** e como média geométrica e IC 95% na **Figura 20**.

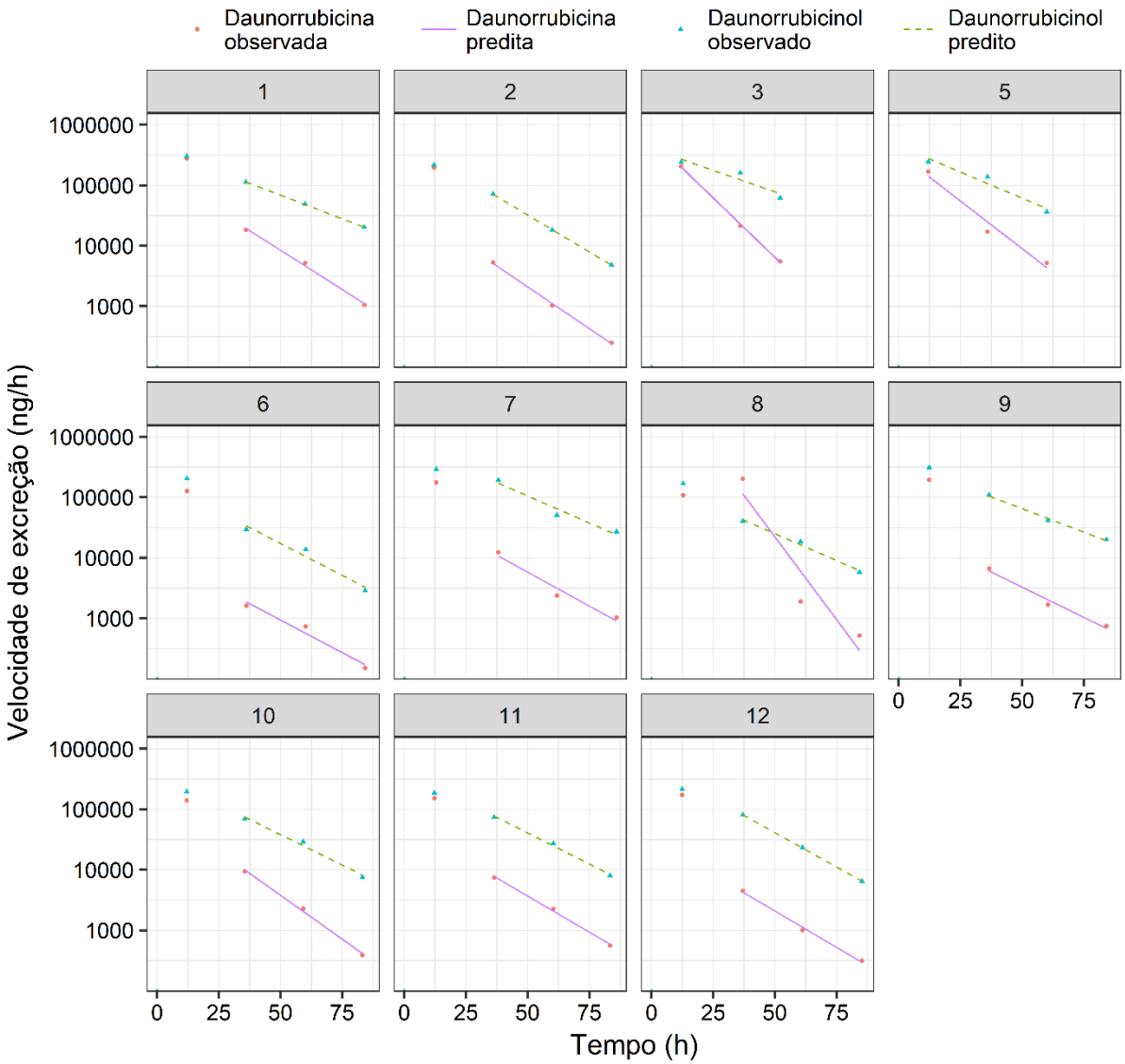

Figura 19: Curvas de velocidade de excreção urinária de daunorrubicina e daunorrubicinol em função do tempo médio do período de coleta, observadas e preditas no intervalo de zero a 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12). Dados individuais.

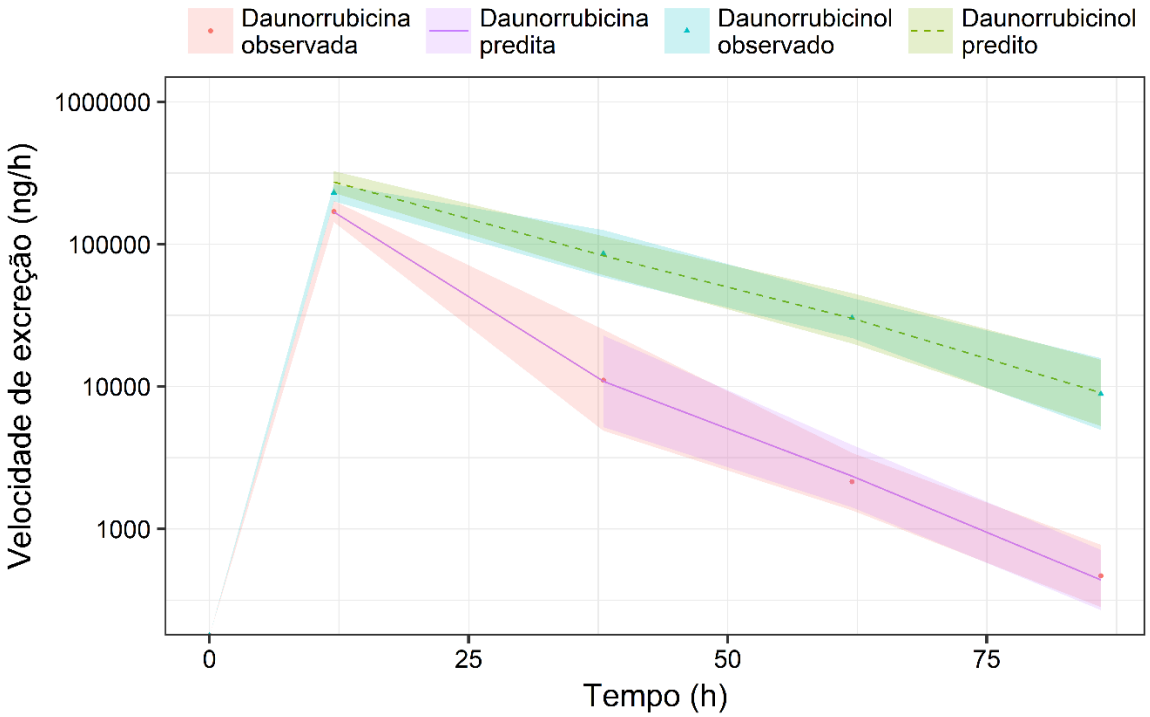

Figura 20: Curvas de velocidade de excreção urinária de daunorrubicina e daunorrubicinol em função do tempo médio do período de coleta, observadas e preditas no intervalo de zero a 96 h após o início da terceira infusão de daunorrubicina (60 mg/m^2) durante 1 h, referentes aos pacientes investigados diagnosticados com LMA (n=12). Os dados estão apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %.

Os parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL obtidos com dados de urina e de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=12), seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia), estão apresentados na **Tabela 15** como média geométrica e IC 95% e na Tabela 16 como dados individuais.

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL obtidos com dados de urina e de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados apresentados como como média geométrica e IC 95%.

	daunorrubicina Média geométrica (IC 95%)	**daunorrubicinol Média geométrica (IC 95%)**
Cl (L/h)	287,81 (248,12 - 333,86)	--
Cl_{ren} (L/h)	12,66 (10,79 – 14,87)	--
Cl_{hep} (L/h)	274,81 (236,30 – 319,60)	--
Cl_M (L/h)	--	22,78 (18,20 – 28,50)
F_{el} (%)	4,40 (3,82 – 5,06)	--
F_{elM} (%)	--	7,91 (6,77 – 9,25)
Ae (mg)	4,83 (4,13 – 5,64)	--
Ae_M (mg)	--	8,69 (7,31 – 10,33)

Cl: *clearance* total da daunorrubicina; **Cl_{ren}:** *clearance* renal da daunorrubicina; **Cl_{hep}:** *clearance* hepático da daunorrubicina; **Cl_M:** *clearance* de formação do metabólito daunorrubicinol; **F_{el}:** fração da dose de daunorrubicina excretada na urina na forma inalterada; **F_{elM}:** fração da dose de daunorrubicina excretada na urina como daunorrubicinol; **Ae:** quantidade de daunorrubicina excretada na urina; **Ae_M:** quantidade de daunorrubicina excretada na urina como daunorrubicinol

Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL obtidos com dados de urina e de plasma dos pacientes investigados portadores de LMA (n=11), seguindo a administração da terceira infusão de DAUN (60 mg/m^2/dia). Dados individuais.

	1	**2**	**3**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Cl (L/h)	212,67	227,44	293,06	224,03	399,74	365,06	258,46	364,76	213,06	308,90	390,40
Cl_{ren} (L/h)	12,16	11,23	13,95	9,96	10,98	15,52	16,78	14,32	7,17	12,51	19,24
Cl_{ren} (%)	5,72	4,94	4,76	4,45	2,75	4,25	6,49	3,92	3,37	4,05	4,93
Cl_{hep} (L/h)	200,50	216,21	279,11	214,07	388,77	349,54	241,68	350,45	205,89	296,39	371,16
Cl_{hep} (%)	94,28	95,06	95,24	95,55	97,25	95,75	93,51	96,08	96,63	95,95	95,07
Cl_M (L/h)	19,46	17,22	25,79	21,74	21,13	44,35	13,08	33,58	14,13	22,47	34,91
F_{el} (%)	5,72	4,94	4,76	4,45	2,75	4,25	6,49	3,92	3,37	4,05	4,93
F_{elM} (%)	9,15	7,57	8,80	9,70	5,29	12,15	5,06	9,21	6,63	7,27	8,94

Cl: *clearance* total da daunorrubicina; **Cl_{ren}:** *clearance* renal da daunorrubicina; **Cl_{hep}:** *clearance* hepático da daunorrubicina; **Cl_M:** *clearance* de formação do metabólito daunorrubicinol; **F_{el}:** fração da dose de daunorrubicina excretada na urina na forma inalterada; **F_{elM}:** fração da dose de daunorrubicina excretada na urina como daunorrubicinol; **Ae:** quantidade de daunorrubicina excretada na urina; **Ae_M:** quantidade de daunorrubicina excretada na urina como daunorrubicinol

Os genótipos da *CBR1 e GSTP1* referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=12) estão apresentados na **Tabela 17**. As associações dos polimorfismos com o parâmetro farmacocinético AUC estão apresentadas nas **Figuras 21** e **22**.

Tabela 17: Genótipos da *CBR1 e GSTP1* referentes aos pacientes investigados portadores de LMA (n=12).

Paciente	*CBR1* (rs25678)	*GSTP1* (rs1695)
P1	GG	AG
P2	GG	AA
P3	GG	AG
P4	CG	AG
P5	GG	GG
P6	GG	AA
P7	GG	AA
P8	GG	AA
P9	CG	AG
P10	GG	AA
P11	CG	AA
P12	CC	AG

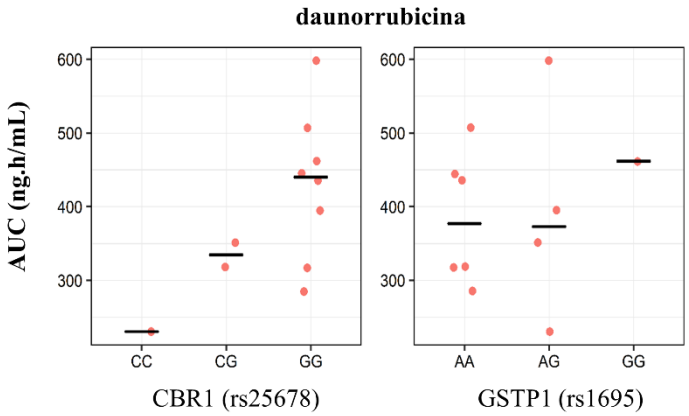

Figura 21: Associação entre a AUC da daunorrubicina e os polimorfismos da CBR1 e GSTP1.

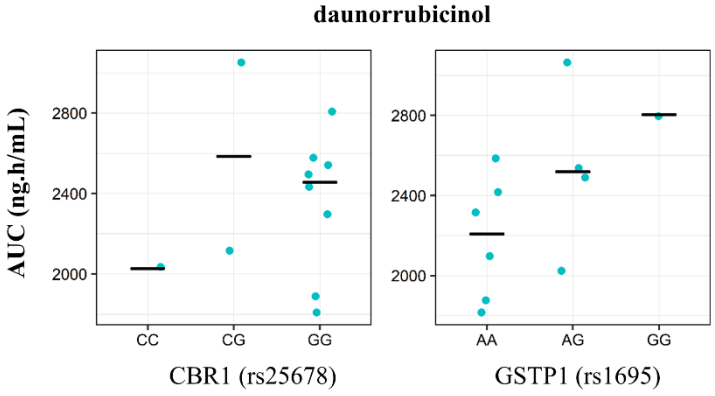

Figura 22: Associação entre a AUC do daunorrubicinol e os polimorfismos da CBR1 e GSTP1.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados 12 pacientes adultos, recrutados no período de setembro de 2015 a abril de 2017, diagnosticados com LMA e com indicação de tratamento com a DAUN **(Tabelas 6-9)**.

As amostras seriadas de sangue (n=14) foram coletadas de cada paciente ao longo das três infusões consecutivas de DAUN de 60 mg/m^2/dia e até 96 h após a terceira infusão com o objetivo de melhor avaliar o decaimento das concentrações plasmáticas. As amostras de urina foram coletadas de 0 a 144 h a partir da primeira infusão, em intervalos de 24 h **(Figura 9)**. Todos os pacientes foram tratados durante o período do estudo concomitantemente com citarabina, dexametasona e ondasentrona.

Os estudos que reportam a farmacocinética da DAUN não lipossomal em pacientes adultos são escassos, incompletos e antigos na literatura. Assim, a discussão dos nossos resultados foi estruturada na comparação com os trabalhos de Robert et al. (1992), Paul et al. (1980), Paul et al. (1987), Gessner et al. (1987) e Galettis et al. (1994).

A meia-vida de eliminação da DAUN é um dado pouco encontrado na literatura. Considerando que Robert et al. (1992) na investigação de sete pacientes adultos reportaram valores de 37,3 h para o metabólito DAUNOL, no presente estudo os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados como dose única considerando que o estado de equilíbrio (três a cinco vezes a meia-vida de eliminação) não foi atingido após a administração da terceira infusão de DAUN ocorrida 48 h após o início da primeira infusão. Primeiramente, para os dados em plasma, foi tentada uma abordagem compartimental, já que, visualmente, as curvas das concentrações plasmáticas pelo tempo apresentavam um decaimento tricompartimental. No entanto, os valores dos coeficientes de variação referentes ao parâmetro AUC da DAUN foram menores por modelo bicompartimetal quando comparados ao modelo tricompartimental **(Figura 12)**.

A meia-vida de eliminação da DAUN, um parâmetro híbrido, dependente do volume de distribuição e do *clearance*, foi calculada como 8,7 h (7,98-9,48) para a DAUN e 15,04 h (13,92-16,26) para o DAUNOL **(Tabelas 10 e 12)**. Logo, os valores de meias-vidas de eliminação observados no presente estudo são inferiores aos valores anteriormente reportados por Robert et al. (1992). Vale ressaltar que o estudo de Robert et al. (1992) investigaram pacientes com LMA durante a última infusão do período de consolidação (28 dias após o período de indução da remissão), enquanto no presente estudo os pacientes foram investigados

durante a última infusão do período de indução de remissão (primeiro ciclo). No entanto, Galettis et al. (1994) reportam meia-vida de eliminação de 7,27 h para a DAUN, um valor próximo ao encontrado no presente estudo, na investigação de cinco pacientes durante o período de indução de remissão (50 mg/m^2), mas sem nenhuma informação quanto a infusão avaliada.

Os dados apresentados nas **Figuras 14 e 15** mostram que a concentração do metabólito DAUNOL em plasma excedeu a de DAUN aproximadamente 2 h do final da infusão; em seguida, decaiu lentamente por até 96 h. A razão metabólica de $AUC_{0-\infty}$ DAUNOL/DAUN foi de 6,25, variando individualmente entre 4,16 a 8,79, um dado que exibe variação interindividual de aproximadamente 100% **(Tabelas 11 e 13)**. A razão de AUC_{DAUNOL}/AUC_{DAUN} mostra acúmulo plasmático do metabólito, um dado compatível com o estudo de Robert et al. (1992) com relato de acúmulo plasmático do metabólito de aproximadamente 5 vezes. Ressalta-se que a razão de AUC_{DAUNOL}/AUC_{DAUN} pode ser um dado de importância na clínica em termos de eficácia e toxicidade, considerando que o metabólito DAUNOL é considerado menos citotóxico e portanto menos ativo como anticancerígeno quando comparado ao fármaco inalterado (Reis-Mendes et al., 2016). No entanto, Varatharajan et al. (2016) relatam que os pacientes que atingiram remissão completa da doença apresentaram valores de AUC de DAUN significativamente menores quando comparados aos pacientes com remissão parcial, um dado que ainda merece ser validado com um número maior de pacientes na busca de um intervalo de concentrações terapêuticas para a DAUN. No presente estudo, os valores de AUC da DAUN variaram em aproximadamente 100% **(Tabela 11)**, sendo que dos 12 pacientes investigados, apenas 2 apresentaram remissão completa da doença **(Tabela 7)**, mas sem nenhuma correlação com o parâmetro farmacocinético.

No entanto, as razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN obtidas em função do tempo são próximas a unidade até aproximadamente 1 h após o início da segunda e terceira infusões, mas atingem valores tão altos quanto 38 aproximadamente 60 h após o início da terceira infusão **(Figura 16)**. Ou seja, as razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN variam em função do tempo devido às diferenças nos valores de meias-vidas de eliminação da DAUN e DAUNOL, assim como às diferenças observadas em função do tempo na velocidade de formação do metabólito DAUNOL. Estudos anteriores relatam que as razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN em amostras coletadas 3 h após a primeira, segunda e terceira infusões de DAUN variaram entre 2,36-3,26 (GESSNER et al., 1987).

O *clearance* total da DAUN de 289,54 L/h (254,20-329,54) (Tabela 10) é próximo aos valores observados por Galletis et al. (1994) de 212 L/h após infusão endovenosa de 50 mg/m^2

do fármaco durante 15 minutos e próximo ao valor de 269,8 L/h relatado por Varatharajan et al. (2016) no primeiro dia do período de indução de remissão.

Os dados de excreção urinária permitiram o cálculo do clearance renal da DAUN (12,66 L/h) em pacientes adultos, um dado que possibilitou o cálculo do clearance hepático da DAUN (274,81 L/h) e clearance de formação do DAUNOL (22,78 L/h); Tabela 15. A DAUN é um fármaco de eliminação essencialmente hepática, considerando que o clearance total é muito próximo do clearance hepático. Ressalta-se ainda que o clearance de formação do metabólito DAUNOL é aproximadamente 10% do clearance hepático, um dado que infere a preponderância da excreção biliar na eliminação da DAUN.

A fração da dose eliminada na urina sob a forma inalterada e metabolizada foi de 4,40 (3,82 - 5,06) e 7,91 (6,77 - 9,25), respectivamente (Tabela 15). Paul et al. (1980) relatam que, em conjunto, a excreção de DAUN e DAUNOL representou apenas cerca de 15% da dose administrada de DAUN em até 96 h.

O presente estudo também reporta pela primeira vez em amostras clínicas a ligação da DAUN e DAUNOL às proteínas do plasma. A ligação da DAUN às proteínas plasmáticas foi de 72,41% (67,02-78,24) e do DAUNOL foi de 69,88% (66,72-73,20); **Tabela 14**. Uma porcentagem semelhante foi reportada para DAUN por Whitaker et al. (2008) que inferiram, a partir de dados *in vitro*, uma taxa de ligação de 77-94%.

No presente estudo também foi investigado o polimorfismo da CBR1, a principal enzima envolvida no metabolismo da DAUN ao DAUNOL, metabólito menos potente que o fármaco inalterado. Estudos anteriores sugerem que a avaliação da expressão do gene da CBR1 pode ser útil na identificação de pacientes com risco de desenvolver resistência ou cardiotoxicidade à DAUN devido ao aumento da formação de DAUNOL (VARATHAJAN et al., 2012, 2016). Os dados apresentados na **Tabela 17 e na Figura 21** mostram que os pacientes genotipados com a variante rs25678 (C>G) da CBR1 (GG e CG; n=11) apresentaram tendência de maiores valores de AUC da DAUN quando comparados ao paciente genotipado como CC (n=1). Este resultado está de acordo com os dados reportados por outros autores (VARATHAJAN et al., 2012, 2016).

As antraciclinas também são substratos de glutationa S-transferases (GSTM1, GSTP1 e GSTT1), sendo a GSTP1 polimórfica. Considerando que o polimorfismo rs1695 da GSTP1 (Ile105Val) com frequência 0,322 na população brasileira (REFARGEN, 2018) resulta na redução da atividade catalítica da enzima (FEI et al., 2018), os dados apresentados na **Figura 21** sugerem tendência de maior valor de AUC da DAUN para o paciente genotipado como GG (n=1) quando comparado aos pacientes genotipados como AG ou AA (n=11). Estudos

anteriores reportados por Thompson et al. (2014) mostraram que pacientes genotipados com o haplótipo GSTP1*A/*A (105Ile/114Ala; n=19) mostraram menores valores de AUC da DAUN quando comparados aos pacientes genotipados com o haplótipo GSTP1*B/*B (105Val/114Ala; n=7).

Concluindo, a influência de fatores genéticos na farmacocinética da DAUN com base nas enzimas envolvidas no seu metabolismo (CBR1 e GSTP1) deve ser investigada em estudo com número de pacientes compatível com poder estatístico com o objetivo de garantir segurança e eficácia no tratamento com a DAUN.

8. CONCLUSÕES

1- As razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN obtidas em função do tempo foram próximas a unidade até aproximadamente 1 h após o início da infusão, mas atingiram valores tão altos quanto 38 aproximadamente 60 h após o início da terceira infusão. A razão metabólica de $AUC_{0-\infty}$ DAUNOL/DAUN foi de 6,25, variando individualmente entre 4,16 a 8,79, um dado que exibe variação interindividual de aproximadamente 100% nos pacientes diagnosticados com LMA.

2- A farmacocinética da DAUN e DAUNOL, avaliada por modelo bicompartimental e monocompartimental, mostrou meias-vidas de eliminação de 8,7 (7,98-9,48) e 15,04 (13,92-16,26) h, respectivamente nos pacientes diagnosticados com LMA. O *clearance* total da DAUN foi de 289,54 (254,20-329,54) L/h, o clearance renal de 12,66 (10,79-14,87) L/h e o clearance hepático de 274,81 (236,30-319,60) L/h. O clearance de formação do metabólito DAUNOL foi de 22,78 (18,20-28,50) L/h.

3- A ligação da DAUN às proteínas plasmáticas avaliada pelo método da ultrafiltração foi de 72,41 (67,02-78,24) % e do DAUNOL de 69,88 (66,72-73,20) % nos pacientes diagnosticados com LMA.

4- Os pacientes diagnosticados com LMA genotipados com a variante rs25678 (C>G) da CBR1 (GG e CG; n=11) apresentaram tendência de maiores valores de AUC da DAUN quando comparados ao paciente genotipado como CC (n=1). O paciente genotipado com a variante rs1695 da GSTP1 (Ile105Val) (GG; n=1) também apresentou tendência de maior valor de AUC da DAUN quando comparado aos pacientes genotipados como AG ou AA (n=11).

9. REFERÊNCIAS

BENET, L. Z. Clearance (née Rowland) concepts: a downdate and an update. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, v. 37, p. 529-39, 2010.

COSTA, V. M. et al. The heart as a target for xenobiotic toxicity: the cardiac susceptibility to oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, v. 26, p. 1285-311, 2013.

EDWARDSON, D. et al. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. **Current Drug Metabolism**, v. 16, p. 412-426, 2015.

FEI, LV. et al. Relationship between GSTP1 rs1695 gene polymorphism and myelosuppression induced by platinum-based drugs: a meta-analysis. **The International Journal of Biological Markers**, p. 364–371, 2018.

GALETTIS, P.; BOUTAGY, J.; MA, D. D. Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. **British journal of cancer**, v. 70, p. 324-9, 1994.

GESSNER, T. et al. Plasma levels of daunorubicin metabolites and the outcome of ANLL therapy. **Medical oncology and tumor pharmacotherapy**, v. 4, p. 23-31, 1987.

GONZALEZ, B. et al. Protection against daunorubicin cytotoxicity by expression of a cloned human carbonyl reductase cDNA in K562 leukemia cells. **Cancer research**, v. 55, p. 4646-50, 1995.

KEARNS, G. L. et al. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. **The New England journal of medicine**, v. 349, p. 1157-67, 2003.

MADONNA, R. Early Diagnosis and Prediction of Anticancer Drug-induced Cardiotoxicity: From Cardiac Imaging to "Omics" Technologies. **Revista Española de Cardiología**, v. 70, p. 576-582, 2017.

MELE, D. et al. Current views on anthracycline cardiotoxicity. **Heart Failure Reviews**, p. 1-14, 2016.

MENNA, P. et al. Anthracycline cardiotoxicity. **Expert opinion on drug safety**, v. 11, p. 21-36, 2012.

PAUL, C. et al. Determination of Daunorubicin and its main metabolites in plasma, urine and leukaemic cells in patients with acute myeloblastic leukaemia. **Cancer Letters**, v. 9, p. 263-269, 1980.

PISKA, K. et al. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. **Investigational New Drugs**, v. 35, p. 375-385, 2017.

REFARGEN_PGENI. **Rede Nacional de Farmacogenética**. Disponível em: http:// www.refargen.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=56. Acesso em dezembro de 2018.

REIS-MENDES, A. F. et al. The Role of the Metabolism of Anticancer Drugs in Their Induced-Cardiotoxicity. Current drug metabolism, v. 17, n. 1, p. 75-90, 2016.

RITSCHEL, W.; KEARNS, G. **Handbook of Basic Pharmacokinetics**. including Clinical Applications. sixth ed. Washington, DC, 2004.

ROBERT, J. Use of pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in the development of new anthracyclines. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 32, p. 99-102, 1993.

ROBERT, J.; RIGAL-HUGUET, F.; HURTELOUP, P. Comparative pharmacokinetic study of idarubicin and daunorubicin in leukemia patients. Hematological Oncology, v. 10, n. September 1991, p. 111-116, 1992.

SALVATORELLI, E. et al. Low-Dose Anthracycline and Risk of Heart Failure in a Pharmacokinetic Model of Human Myocardium Exposure: Analog Specificity and Role of Secondary Alcohol Metabolites. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 364, p. 323-331, 2018.

SKARKA, A. et al. Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. **Chemico-biological interactions**, v. 191, p. 66-74, 2011.

THOMPSON, P. et al. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of daunorubicin in children: a report from the Children's Oncology Group. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 74, p. 831-8, 2014.

VARATHARAJAN, S. et al. ATP-binding casette transporter expression in acute myeloid leukemia: association with in vitro cytotoxicity and prognostic markers. **Pharmacogenomics**, v. 18, p. 235-244, 2017.

_____. Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. **European journal of clinical pharmacology**, v. 68, p. 1577-86, 2012.

WHITAKER, G. et al. CE-LIF method for the separation of anthracyclines: application to protein binding analysis in plasma using ultrafiltration. **Journal of separation science**, v. 31, p. 1828-33, 2008.

ZUNINO, F.; PRATESI, G.; PEREGO, P. Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. **Biochemical pharmacology**, v. 61, p. 933-8, 2001.

Capítulo III

Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda

1. INTRODUÇÃO

Na prática clínica, a maioria dos medicamentos que passaram por estudos clínicos com evidências de segurança e eficácia foram avaliados na população adulta. Porém, considerando que frequentemente esses medicamentos são necessários na terapia pediátrica e que, tradicionalmente, crianças têm sido excluídas da participação em pesquisas clínicas, muitas vezes os regimes de dosagem são estabelecidos de forma empírica para esta população (FERREIRA et al., 2012; BARKER et al., 2018).

A maioria dos regimes de dosagem aplicados em neonatos e crianças são provenientes de dados da população adulta corrigidos pelo peso ou superfície corpórea. Entretanto essa simples extrapolação dos dados de adultos para os pediátricos pode não ser apropriada, já que crianças diferem da população adulta em muitos aspectos e não apenas em idade e peso: a composição fisiológica é diferente para neonatos, lactentes e crianças; o desenvolvimento e a maturação dos órgãos podem alterar os processos farmacocinéticos e a resposta aos fármacos, especialmente em menores que 2 anos de idade; e os intervalos de concentrações plasmáticas associados com eficácia, sofrem alterações com a maturação (RODIEUX et al., 2015).

A obtenção de dados farmacocinéticos de boa qualidade é crucial para determinar regimes de dosagem apropriados para crianças, especialmente as menores que 2 anos de idade, já que é este o grupo que apresenta as maiores diferenças do perfil farmacocinético de adultos e, ao mesmo tempo, é deste mesmo grupo que esses dados são menos prováveis de serem obtidos em ensaios clínicos (FERRO, 2015).

Como as mudanças no desenvolvimento são principalmente não-lineares, a chamada dosagem empírica pode levar a dosagens errôneas, especialmente em grupos etários específicos, como neonatos com baixo peso, aumentando assim o risco de toxicidade ou eficácia reduzida. A heterogeneidade dentro da população pediátrica, variando de neonatos prematuros a crianças obesas, também não pode ser subestimada, considerando que o peso e a área superficial corporal não são necessariamente substitutos para as diferenças na função fisiológica ou de órgãos nos vários subgrupos da população pediátrica (VAN DEN ANKER; ALLEGAERT, 2012; VERMEULEN ET AL., 2017).

Para garantir que as variáveis acima mencionadas sejam consideradas para a seleção da dose e desenho de um estudo clínico, os estudos de farmacocinética populacional representam uma ferramenta importante a ser considerada. Os estudos tradicionais de farmacocinética envolvem a coleta de múltiplas amostras de sangue em cada paciente, geralmente obtidas de acordo com um protocolo rigidamente cronometrado e estruturado, dentro de uma população

de pacientes relativamente pequena. No entanto, esta abordagem apresenta sérias limitações na prática pediátrica por razões éticas e práticas: a estratégia de amostragem fixa interfere potencialmente com o atendimento ao paciente; e a exigência de múltiplas amostras de sangue (frequentemente de 12 a 15) levanta preocupações sobre o acesso venoso e o volume de sangue.

Assim, os estudos de farmacocinética populacional (usando esquemas esparsos de amostragem, nos quais um menor número de amostras de sangue é coletado por indivíduo sem a necessidade de um tempo de amostragem rígido em comparação aos estudos clássicos) evitam que as crianças sejam expostas à prática de grandes números e volumes de amostras de sangue (VERMEULEN et al., 2016).

As abordagens populacionais ainda permitem a quantificação das variabilidades intra e interindividuais, com a possibilidade de identificar covariáveis clinicamente relevantes para a variabilidade interindividual dos parâmetros farmacocinéticos (BRENDEL et al., 2007; KREKELS et al., 2017).

Os estudos de farmacocinética populacional da DAUN incluindo o metabólito DAUNOL foram conduzidos somente em pacientes adultos, empregando modelos de dois (KROGH-MADSEN et al., 2012; VARATHARAJAN et al., 2016) ou cinco compartimentos (CALLIES et al., 2004; BOGASON et al., 2011). Os autores reportam valores de *clearance* total da DAUN variando entre 115-270 L/h com ausência de efeitos de covariáveis, tais como, idade, peso, altura, área de superfície corporal, creatinina sérica, *clearance* de creatinina, bilirrubina, contagem de glóbulos brancos periféricos e alanina amino transferase. No entanto, não há dados relativos a amostragem esparsa para estudos da farmacocinética da DAUN e do seu metabólito DAUNOL em crianças ou adultos.

As principais dificuldades relacionadas à inclusão de crianças em estudos de farmacocinética referem-se às dificuldades dos pais em assinar o consentimento autorizando a participação dos filhos em protocolos que apresentem riscos ligeiramente maiores do que aquele considerado mínimo. Ressaltam-se ainda as dificuldades inerentes às coletas seriadas de sangue, um processo atualmente bastante amenizado em função da possibilidade do uso de coletas esparsas empregando programas específicos de simulação de dados (SKINNER, 2011).

2. OBJETIVOS

1 - Desenvolver e validar o modelo de farmacocinética populacional da DAUN e seu metabólito DAUNOL em pacientes adultos.

2 - Otimizar os tempos de coletas esparsas de amostras de sangue na população pediátrica empregando o perfil farmacocinético da DAUN e seu metabólito DAUNOL na população adulta.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/HCFMRP-USP) em 25 de março de 2015, de acordo com o processo n° 9064/2014 (ANEXO A). O projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP-USP) em 26 de junho de 2015 (ANEXO B).

Os pacientes adultos e os responsáveis pelos pacientes pediátricos receberam explicação detalhada dos procedimentos e foram incluídos no estudo somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Foi garantida aos pacientes a liberdade de recusar a participar ou de retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo ao seu tratamento.

Os responsáveis pelos pacientes pediátricos foram informados em detalhes sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos. Caso fossem recrutados pacientes pediátricos com idade igual ou superior a 6 anos, e alfabetizados, além do consentimento dos seus responsáveis, o próprio paciente pediátrico também teria que consentir e assinar o Termo de Assentimento.

Os estudos foram conduzidos em total conformidade com as leis e regulamentações locais relativas aos ensaios clínicos. Ressalta-se que esta pesquisa não interferiu nos protocolos vigentes do hospital local para o tratamento dos pacientes investigados.

3.2. Casuística

Foram investigados pacientes adultos (> 18 anos; n=12) diagnosticados com LMA com indicação para uso da DAUN, atendidos no HCFMRP-USP no período de setembro de 2015 a abril de 2017. Também foi investigado um paciente pediátrico de 3 anos de idade, diagnosticado com leucemia linfoide aguda (LLA) e com indicação de tratamento com a DAUN.

3.3. Protocolo clínico

O protocolo clínico está descrito em detalhes no item 4 do Capítulo I e no item 3.3 do Capítulo II.

Para o paciente pediátrico recrutado uma amostra de sangue total periférico foi coletada aproximadamente 1 h após o final da infusão da DAUN (25 mg/m^2 em 30 min) no momento de outras amostragens para exames clínicos laboratoriais solicitados pelos médicos.

3.4. Métodos de análise de fármacos e metabólitos em plasma

Os métodos de análise da DAUN e seu metabólito DAUNOL em plasma, ultrafiltrado de plasma e urina foram desenvolvidos e validados empregando LC-MS/MS, de acordo com a descrição apresentada no Capítulo I.

3.5. Farmacocinética populacional da DAUN e DAUNOL

O modelo da farmacocinética populacional da DAUN e seu metabólito DAUNOL foi desenvolvido utilizando o programa de modelagem não linear de efeitos mistos NONMEM (*Nonlinear Mixed Effects Modelling*) versão 7.3.0 (ICON Develop., Ellicott City, MD, EUA), utilizando o método de Laplace com interação (LAPL+ I). O modelo de 5 compartimentos foi usado para descrever a farmacocinética da DAUN, sendo 3 compartimentos para o fármaco inalterado e 2 compartimentos para o metabólito DAUNOL. Os modelos foram selecionados de acordo com a diminuição do valor da *Objective Function Value* (ΔOFV), diminuição do erro residual das estimativas e da observação da qualidade dos gráficos de ajuste do modelo aos dados (*Goodness-Of-Fit*; GOF).

O desempenho do modelo final foi avaliado por *Bootstrapping* e verificação visual preditiva (Visual Predictive Check; VPC) com a assistência do programa RStudio v. 1.0.136 e Perl-speaks-NONMEM (PsN) v. 4.7.0 (Uppsala University, Suécia).

3.6. Análise de covariáveis

Considerando a variabilidade interindividual observada nas concentrações plasmáticas do DAUN e seu metabólito DAUNOL foram testadas algumas covariáveis no modelo de farmacocinética populacional.

A relação entre os parâmetros farmacocinéticos individuais e as covariáveis foi explorada por métodos gráficos (gráfico covariável *versus* parâmetro farmacocinético). As covariáveis demográficas (peso, altura, superfície corporal, gordura corporal, fração livre da DAUN) foram inseridas uma a uma no modelo populacional (análise univariada) e após todas as covariáveis significativas terem sido inseridas no modelo (seleção direta), cada covariável foi removida (eliminação inversa), uma de cada vez. O peso foi avaliado como uma covariável do clearance total e volume de distribuição da DAUN usando função alométrica com coeficiente fixo, respectivamente, de 0,75 e 1. O modelo foi executado novamente e o valor da OFV (*objective function value*) foi registrado. O teste da razão de verossimilhança foi utilizado para avaliar se a diferença na OFV entre o modelo base e o modelo com a covariável era significativa.

Durante as etapas finais do modelo, apenas as covariáveis que resultassem em uma diferença significativa no valor da OFV ($P < 0,005$) seriam mantidas no modelo final.

3.7. Estratégia de amostragem esparsa

Com auxílio do programa PoPED (*Population Experimental Design*), utilizando como método de otimização a expectativa da matriz de informação de Fisher ou simplesmente *ED-Optimality*, foram avaliados diferentes cenários de tempos de coletas para aplicação na avaliação da farmacocinética da DAUN e do DAUNOL. Os cenários foram selecionados com base nos valores da OFV gerados no PoPED e nos coeficientes de variação entre os valores de *clearance* da DAUN estimados com 12 pacientes pediátricos virtuais, avaliados com o número total de coletas (n=14) ou com os tempos de coletas esparsas (duas ou três) propostos pelo programa.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional

O modelo de farmacocinética populacional da DAUN e do seu metabólito DAUNOL em pacientes diagnosticados com LMA foi desenvolvido de forma sequencial. Na primeira etapa, o modelo da DAUN foi construído e os parâmetros estimados foram utilizados para conduzir o modelo do metabólito DAUNOL na segunda etapa. Um diagrama descrevendo o modelo PK para ambos DAUN e metabólito DAUNOL está representado na **Figura 23**.

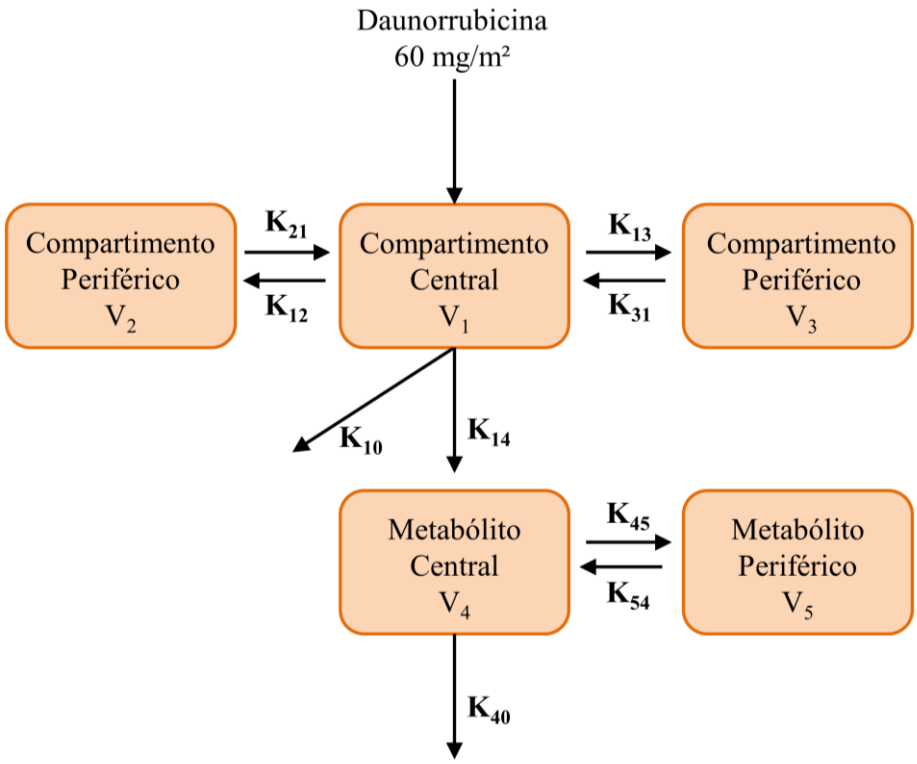

Figura 23: Visão esquemática do modelo da farmacocinética populacional para a daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol. **V**: volume do compartimento; **K**: constante de velocidade.

O modelo que melhor descreveu a farmacocinética da DAUN foi um modelo alométrico exponencial de três compartimentos com eliminação de primeira ordem **(Figura 23)**. Os parâmetros da farmacocinética populacional da DAUN sob a forma inalterada em pacientes diagnosticados com LMA estão apresentadas na **Tabela 18.**

Tabela 18: Farmacocinética populacional da daunorrubicina em pacientes diagnosticados com LMA

Parâmetro	Média populacional	EPR (%)	Variabilidade interindividual	
			ω^2	EPR (%)
Cl (L/h)	305,0	8	0,043	37
Vd_1 (L)	551,0	28	0,396	79
Q_2 (L/h)	31,9	45	0,438	47
Q_3 (L/h)	243,0	26	-	-
Vd_2 (L)	996,0	53	1,54	46
Vd_3 (L)	1050,0	22	-	-
Erro proporcional	0,473	12	-	-
Erro aditivo	0,0099	16	-	-
OFV: 428,735				

EPR: erro padrão relativo; **ω^2:** variância; **Cl**: *clearance* total; **Vd**: volume de distribuição; **Q**: *clearance* intercompartimental; **OFV**: *Object Function Value*.

Os parâmetros estimados na farmacocinética populacional da DAUN sob a forma inalterada foram utilizados para construir o modelo do metabólito DAUNOL. O modelo que melhor descreveu a farmacocinética do metabólito DAUNOL foi um modelo de dois compartimentos com eliminação de primeira ordem **(Figura 23)**. Os parâmetros da farmacocinética populacional do metabólito DAUNOL em pacientes diagnosticados com LMA estão apresentadas na **Tabela 19**.

Tabela 19: Farmacocinética populacional do metabólito daunorrubicinol em pacientes diagnosticados com LMA

Parâmetro	Média populacional	EPR (%)	Variabilidade interindividual	
			ω^2	EPR (%)
FMET	1			
Vd_4 (L)	313,0	3	0,376	59
ClM (L/h)	67,2	7	0,0248	38
Vd_5 (L)	571,0	9	-	-
QM	324,0	18	-	-
Erro proporcional	0,138	9	-	-
Erro aditivo	0,825	36	-	-
OFV: 438,664				

EPR: erro padrão relativo; **ω^2:** variância; **FMET**: fração da dose da DAUN metabolizada a DAUNOL; **ClM**: *clearance* total do metabólito; **Vd**: volume de distribuição; **QM**: *clearance* intercompartimental do metabólito; **OFV**: *Object Function Value*.

4.2. Análise de covariáveis

A avaliação da relação entre covariáveis (peso, altura, superfície corporal, percentual de gordura corporal e fração livre da DAUN) e parâmetros farmacocinéticos da DAUN sob a forma inalterada (Cl, V, V_2, V_3, Q_2 e Q_3) mostrou que nenhuma das covariáveis analisadas resultou em diferença significativa no valor da OFV (*objective function value*) (P <0,005), evidenciando que a introdução das citadas covariáveis não resulta em melhoria do ajuste do modelo aos dados **(Figura 24)**.

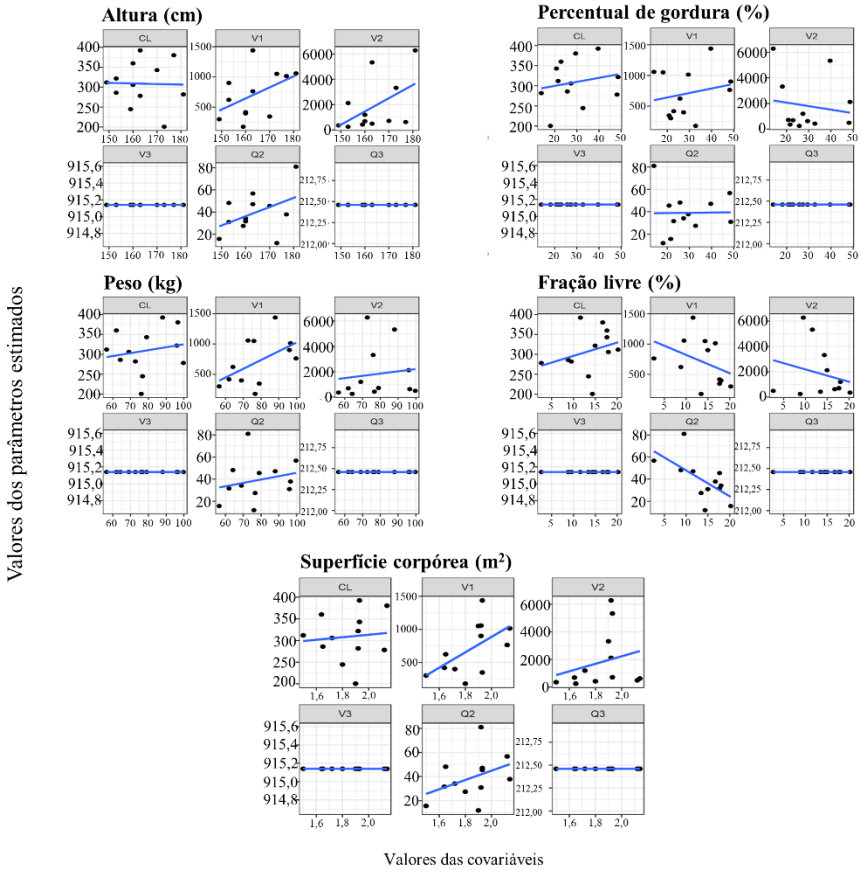

Figura 24: Relação entre covariáveis (peso, altura, superfície corporal, percentual de gordura e fração livre da daunorrubicina) e parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina sob a forma inalterada (Cl, V, V_2, V_3, Q_2 e Q_3).

4.3. Validação do modelo de farmacocinética populacional

A validação do modelo farmacocinético final foi baseada em métodos gráficos e estatísticos.

O *bootstrap* foi utilizado para identificar o viés, a estabilidade e a precisão dos parâmetros estimados. Os procedimentos de *bootstrap* geraram automaticamente uma série de novos conjuntos de dados por amostragem de pacientes simulados (n=1000) com substituição do conjunto de dados original, ajustando o modelo a cada novo conjunto de dados.

Posteriormente, as estimativas dos parâmetros foram usadas para simular as concentrações plasmáticas da DAUN **(Tabela 20)** e do metabólito DAUNOL **(Tabela 21)** em pacientes simulados com regimes posológicos e esquema de amostragem similares ao estudo clínico original. As medianas, os intervalos de percentis 95% e os coeficientes de variação das estimativas dos parâmetros gerados com a inclusão dos 1000 conjuntos de dados virtuais foram comparadas com as estimativas obtidas a partir do conjunto de dados originais.

Baseado nos resultados do *bootstrap* apresentados nas **Tabelas 20** e **21** é possível observar que os parâmetros estimados foram robustos. A estimativa dos parâmetros Cl, Vd_1, Q_2 e Q_3 foram similares com as estimativas do modelo e com baixos valores de viés, mostrando que o modelo apresenta estimativas exatas e estáveis **(Tabelas 18 e 19).**

Tabela 20: Resultados do *bootstrap* do modelo da farmacocinética populacional da daunorrubicina

	Resultados estimados			***Bootstrap* (1000 simulações)**				
Parâmetro	**Média**	**DP**	**Variância**	**Média**	**Viés**	**EP**	**IC 2,5%**	**IC 97,5%**
Cl (L/h)	305,0	52,63	2770,54	299,08	-6,05	29,45	236,20	351,20
Vd_1 (L)	551,0	249,31	62158,91	541,00	-9,75	171,16	177,20	870,90
Q_2 (L/h)	31,9	7,74	59,96	31,94	2,02	16,78	13,20	71,30
Q_3 (L/h)	243,0	48,13	2317,26	251,91	9,21	77,02	137,10	404,70
Vd_2 (L)	996,0	344,80	118934,00	1494,00	499,00	15641,00	331,50	2239,0
Vd_3 (L)	1050,0	212,50	45163,00	1021,00	-30,90	246,00	483,70	1438,0
Erro proporcional	0,473	0,03	0,0008	0,47	-0,003	0,05	0,36	0,57
Erro aditivo	0,0099	0,0002	$3,61x10^{-8}$	0,01	0,0003	0,005	0,005	0,02
IIV Cl	-	0,02	0,0003	0,04	-0,004	0,02	0,009	0,07
IIV V_1	-	0,19	0,03	0,51	0,12	0,64	0,01	2,51
IIV V_2	-	0,51	0,26	1,50	-0,03	0,83	0,29	3,45
IIV Q_2	-	0,22	0,05	0,38	-0,06	0,22	0,009	0,82

DP: desvio padrão; **EP**: erro padrão; **IC**: intervalo de confiança; **Cl**: *clearance* total; **Vd**: volume de distribuição; **Q**: *clearance* intercompartimental; **IIV**: variabilidade interindividual.

Tabela 21: Resultados do *bootstrap* do modelo da farmacocinética populacional do daunorrubicinol

	Resultados estimados			***bootstrap* (1000 simulações)**				
Parâmetro	**Média**	**DP**	**Variância**	**Média**	**Viés**	**EP**	**IC 2,5%**	**IC 97,5%**
Vd_4	313,0	46,78	2188,0	307,0	-6,27	113,0	39,69	547,0
FMET	1	0	0	1	0	0	1	1
ClM	67,2	0,4779	0,2284	67,5	0,2861	3,272	61,03	73,94
Erro proporcional	0,138	0,0003	$1,21x10^{-7}$	0,1304	-0,008	0,0217	0,0922	0,176
Erro aditivo	0,825	0,0056	$3,14x10^{-5}$	0,9201	0,096	0,2596	0,4587	1,457
Vd_5	571,0	21,7	471,0	589,0	18,43	110,59	392,0	839,5
QM	324,0	38,0	1447,0	397,0	74,01	215,84	94,697	1121,8
IIV Cl	-	0,00458	$2,09x10^{-5}$	0,0368	-0,006	0,018	0,01	0,077
ω (2,1)	-	0,0044	$1,95x10^{-5}$	-0,0042	-0,023	0,0694	-0,188	0,1192
IIV V_2	-	0,0951	0,009	1,241	0,2517	0,620	0,4414	2,7895
IIV V_1	-	0,0834	0,0069	0,2285	0,062	0,1689	0,0081	0,6846
IIV Q_2	-	0,0223	0,00049	0,3639	0,1279	0,2546	0,0176	1,0546
IIV Vd_4	-	0,109	0,0120	0,5986	0,2222	1,1354	0,0535	2,7645
IIV ClM	-	0,00237	$5,6x10^{-6}$	0,0232	-0,002	0,0098	0,005	0,0451

DP: desvio padrão; **EP**: erro padrão; **IC**: intervalo de confiança; **FMET**: fração da dose da DAUN metabolizada a DAUNOL; **ClM**: *clearance* total do metabólito; **Vd**: volume de distribuição; **QM**: *clearance* intercompartimental do metabólito; **IIV**: variabilidade interindividual.

Os gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste (*Goodness-of-fit*) do modelo de farmacocinética final apresentados na **Figura 25** (concentrações plasmáticas observadas - DV [*Dependent Variable*] *versus* concentrações plasmáticas preditas - PRED; DV *versus* concentrações plasmáticas preditas individuais - IPRED; resíduos ponderados condicionais CWRES [*Conditional Weighted Residuals*] *versus* PRED e CWRES *versus* tempo), indicam a aceitabilidade do modelo final. Pode-se observar que os CWRES estão aleatoriamente distribuídos em torno do zero para a DAUN e seu metabólito DAUNOL. De forma geral, as previsões populacionais e individuais descreveram os dados de forma adequada.

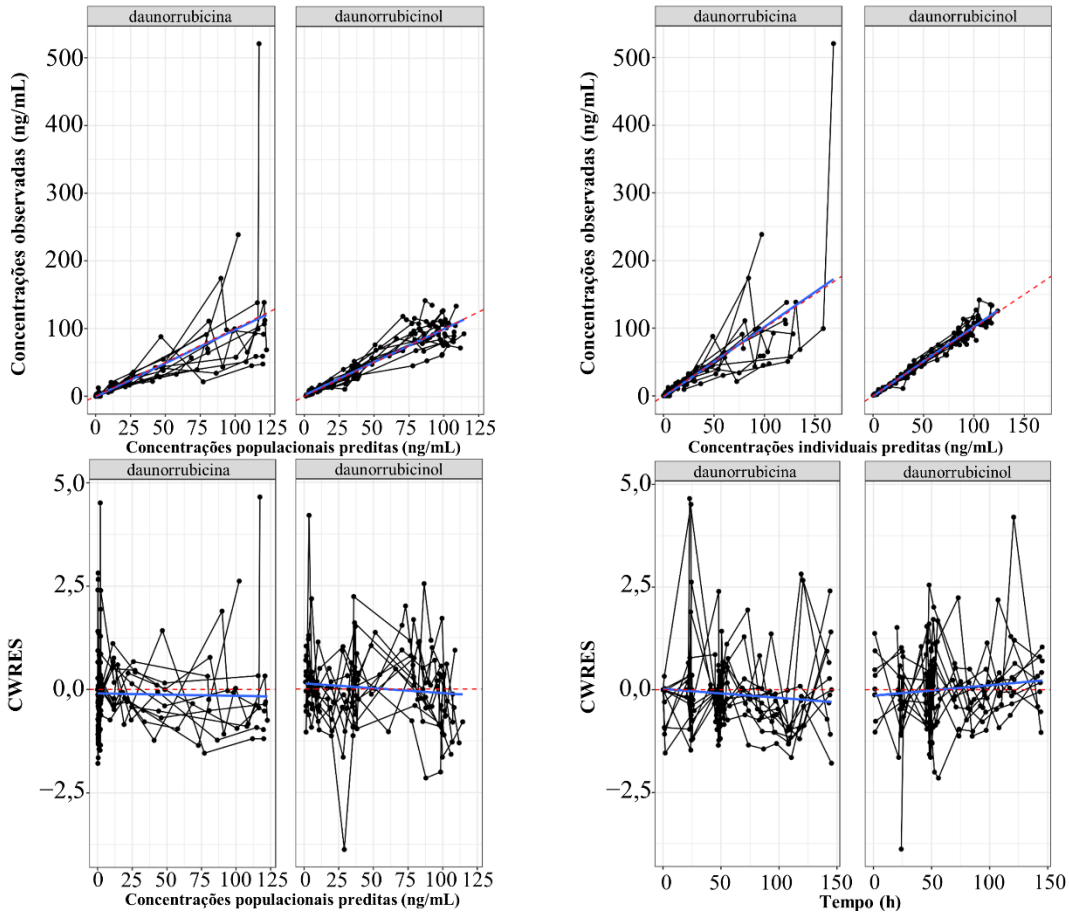

Figura 25: Gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste (*Goodness-of-fit*) do modelo final da farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol: concentrações observadas *versus* concentrações populacionais preditas; concentrações observadas *versus* concentrações individuais preditas; resíduos ponderados condicionais CWRES [*Conditional Weighted Residuals*] *versus* concentrações populacionais preditas e CWRES *versus* tempo.

O processo de validação do modelo de farmacocinética populacional também incluiu o método gráfico de diagnóstico denominado VPC (*Visual Predictive Check*), utilizando simulações de 1000 repetições do estudo original para gerar os gráficos das medianas e dos percentis 5 e 95 dos dados simulados em função do tempo, para confirmar a adequação do modelo aos dados (tendência e variabilidade) e seu desempenho preditivo.

Os gráficos do VPC do modelo final, com todos os indivíduos, apresentados na **Figura 26** mostram que as concentrações preditas estão muito próximas das concentrações observadas, indicando bom desempenho preditivo do modelo.

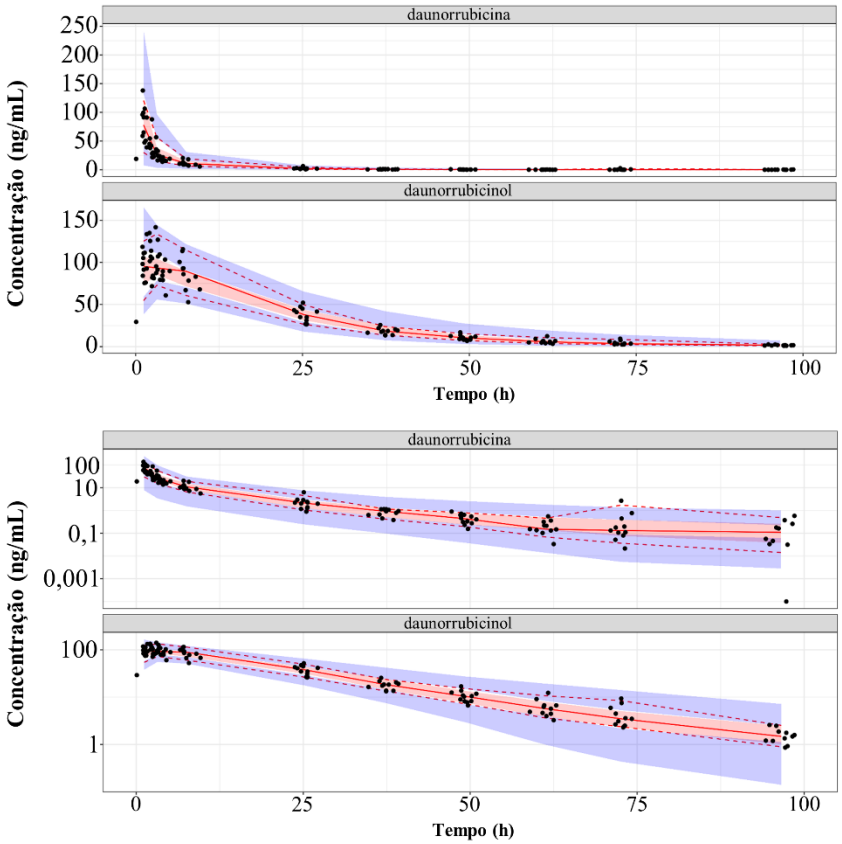

Figura 26: Verificação visual preditiva (VPC - *Visual Predictive Check*) do modelo final da farmacocinética populacional da daunorrubicina e do seu metabólito daunorrubicinol. As linhas tracejadas representam os percentis 5 e 95% e as linhas contínuas as medianas dos dados observados (n=12). As áreas hachuradas representam os intervalos de confiança 90% dos percentis 5°, 50° e 95° dos dados simulados (n=1000).

O método gráfico da análise NPDE (*Normalyzed Predictive Distribution Error*) e os histogramas apresentados na **Figura 27** indicam que a hipótese de uma distribuição normal das diferenças entre os dados observados e preditos é aceitável. Pode-se observar que os erros estão distribuídos de forma normal, a variabilidade da população está bem predita pelo modelo independentemente da planilha com dados originais e não existe distorções nos gráficos NPDE *versus* tempo e NPDE *versus* concentrações preditas.

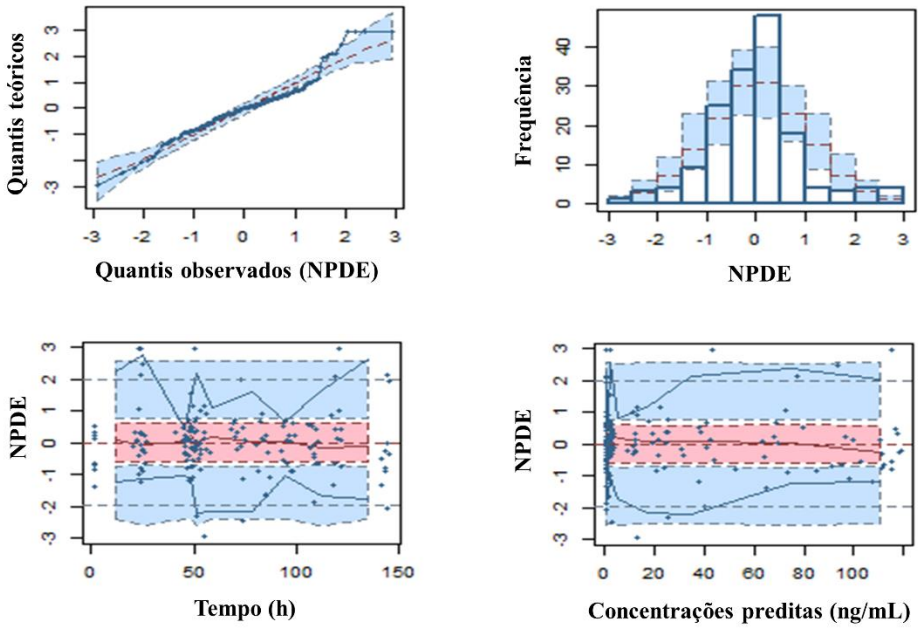

Figura 27: Validação interna do modelo farmacocinético final com NPDE (*Normalyzed Predictive Distribution Error)* para a daunorrubicina e para o metabólito daunorrubicinol. **(A)** Gráfico quantil-quantil do NPDE *versus* distribuição normal padrão esperada; **(B)** Histograma do NPDE com a distribuição normal; **(C)** NPDE *versus* tempo; **(D)** NPDE *versus* concentrações preditas. A distribuição normal é representada pela linha sólida. As linhas pontilhadas representam a média ± 2 desvios padrão.

4.4. Estratégia de amostragem esparsa

O número de tempos de amostragem foi inicialmente fixado entre dois e três com o objetivo de aplicação do protocolo clínico em pacientes pediátricos. O primeiro tempo de amostragem foi fixado em pelo menos 2 h após o início da primeira infusão da DAUN com o objetivo de garantir coletas após a fase de distribuição do fármaco inalterado. O último tempo de amostragem foi fixado em 85 h após o início da primeira infusão da DAUN com o propósito de evitar concentrações plasmáticas de DAUN ou DAUNOL menores que o limite inferior de quantificação (LIQ = 0,1 ng /mL).

O programa PoPED (*Population Experimental Design*) foi utilizado para avaliar os diferentes cenários de tempos de coleta para aplicação na avaliação da farmacocinética da DAUN e DAUNOL em pacientes pediátricos. Os cenários foram selecionados com base nos valores de *clearance* total e volume de distribuição (V_1) da DAUN estimados com 12 pacientes pediátricos virtuais divididos nos grupos 1, 2 e 3 **(Tabela 22)**, avaliados com o número total de coletas (n=14) ou com os tempos de coletas esparsas (cenários) propostos pelo programa para cada grupo. As razões de *clearance* total e Vd_1 entre os valores reais e os valores estimados com as coletas esparsas nos diferentes cenários foram analisadas para avaliar o desempenho do esquema de coletas e a estabilidade do modelo **(Tabela 23)**.

Tabela 22: Otimização dos tempos de amostragem oriundos do PoPED para 12 pacientes pediátricos virtuais

	Tempos de amostragem* (h)		
	primeiro	**segundo**	**terceiro**
Grupo 1 (n=4)	55,43	83,28	95,98
Grupo 2 (n=4)	48,14	60,76	146,30
Grupo 3 (n=4)	45,81	49,22	92,64

*h após o início da primeira infusão

Tabela 23: Parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina obtidos com o número total de coletas (real) ou com as coletas esparsas (estimado) para os pacientes pediátricos virtuais (n=12)

Paciente virtual	**Grupo**	**Peso (kg)**	**clearance total (L/h)**			**Vd_1 (L)**		
			real	**estimado**	**razão***	**real**	**estimado**	**razão***
1	1	33,5	130,29	151,25	1,16	160,31	183,06	1,14
2	1	21,3	109,34	117,53	1,07	99,67	106,44	1,07
3	1	13,0	85,28	82,69	0,97	97,58	87,25	0,89
4	1	19,9	136,37	159,44	1,17	104,95	103,04	0,98
5	2	34,8	181,03	161,80	0,89	281,09	263,92	0,94
6	2	16,5	106,04	107,34	1,01	69,86	88,00	1,26
7	2	13,5	68,99	81,57	1,18	109,71	118,15	1,07
8	2	12,9	77,23	79,63	1,03	132,13	115,75	0,87
9	3	33,6	171,27	155,99	0,91	369,70	266,99	0,72
10	3	19,1	86,67	87,51	1,01	194,27	197,59	1,02
11	3	15,5	80,46	75,31	0,94	94,42	110,32	1,17
12	3	30,8	137,83	149,82	1,08	273,71	293,84	1,07

*razão real/estimado

Os valores de clearance total e volume de distribuição da DAUN foram avaliados acrescentando na planilha original 100 pacientes virtuais. A cada novo paciente adicionado à planilha original, eram realizadas novas estimativas dos parâmetros farmacocinéticos individuais e populacionais para cada grupo. Os parâmetros farmacocinéticos foram comparados entre os diferentes cenários avaliados através das razões entre os valores reais e os valores estimados com as coletas esparsas.

As etapas do estudo de coletas esparsas para a avaliação da farmacocinética da DAUN em pacientes pediátricos estão apresentadas na **Figura 28.**

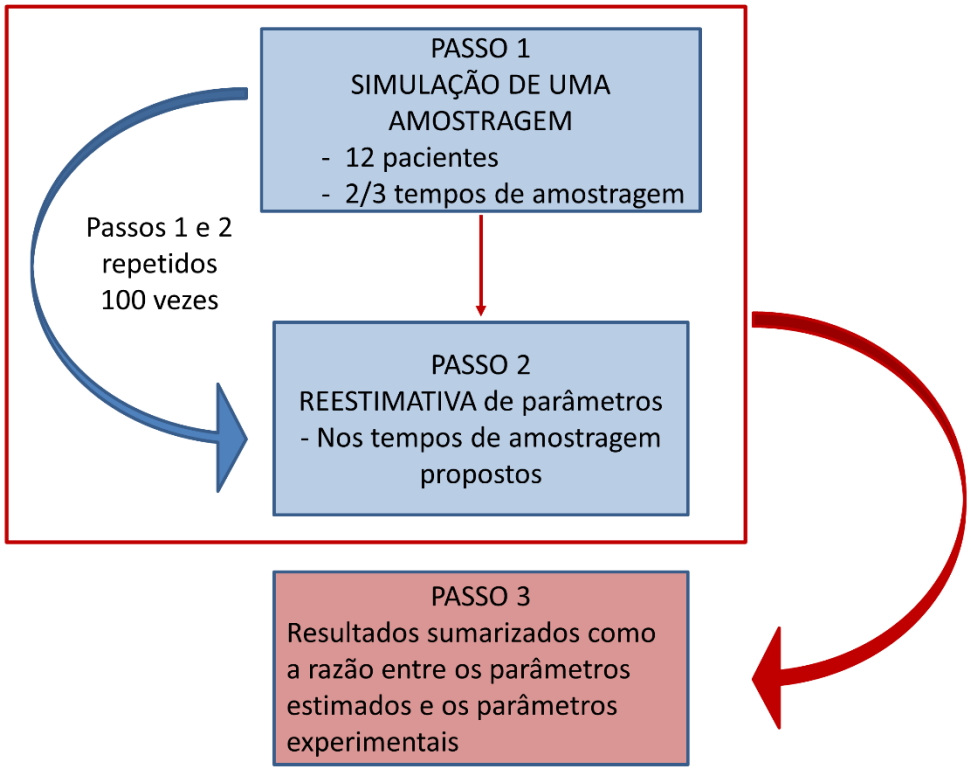

Figura 28: Etapas do estudo de coletas esparsas para a avaliação da farmacocinética da daunorrubicina em pacientes pediátricos.

Tabela 24: Tempos de amostragem propostos pelo programa PoPED para os diferentes cenários avaliados para o estudo da farmacocinética da daunorrubicina e do daunorrubicinol em pacientes pediátricos

		Tempos de amostragem (h)		
		primeiro	**segundo**	**terceiro**
Cenário 1	Grupo 1	36	45	85
	Grupo 2	40	54	80
	Grupo 3	42	53	68
Cenário 2	Grupo 1	55	83	95
	Grupo 2	48	60	144
	Grupo 3	45	48	92
Cenário 3	Grupo 1	45	57	--
	Grupo 2	48	80	--
	Grupo 3	53	68	--
Cenário 4	Grupo 1	45	57	--
	Grupo 2	43	80	--
	Grupo 3	44	68	--

A **Figura 29** mostra o aumento da probabilidade de quantificar concentrações plasmáticas de DAUN e DAUNOL abaixo do LIQ nas amostras coletadas após 85 h após a primeira infusão de DAUN.

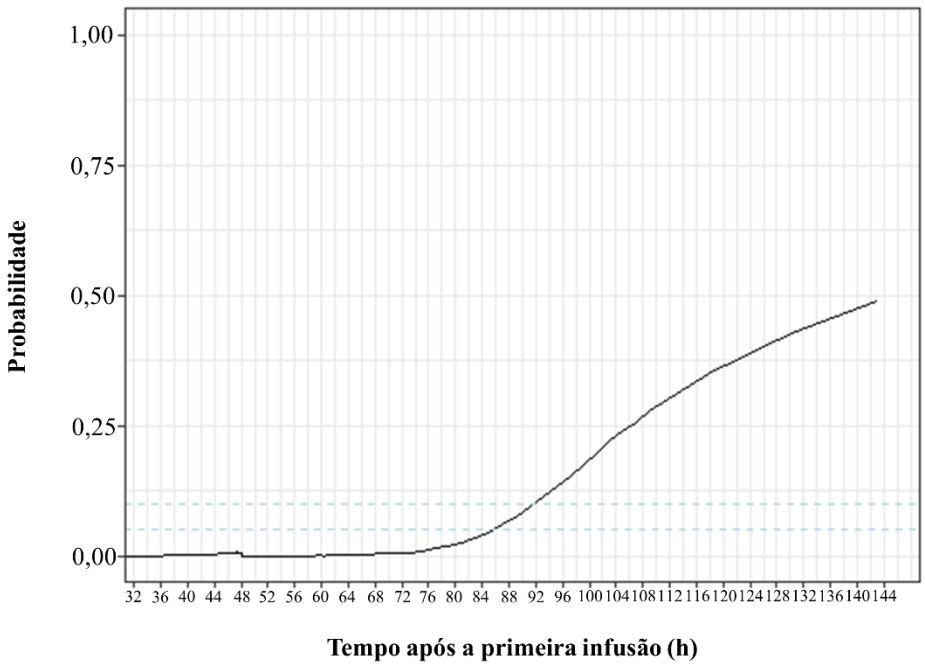

Figura 29: Gráfico do aumento da probabilidade de quantificar concentrações plasmáticas de daunorrubicina e daunorrubicinol abaixo do LIQ nas amostras coletadas após 85 h após a primeira infusão de daunorrubicina.

A **Figura 30** mostra os tempos de coletas esparsas (n=3) propostos para os cenários 1 e 2 no estudo da farmacocinética da DAUN e DAUNOL em pacientes pediátricos.

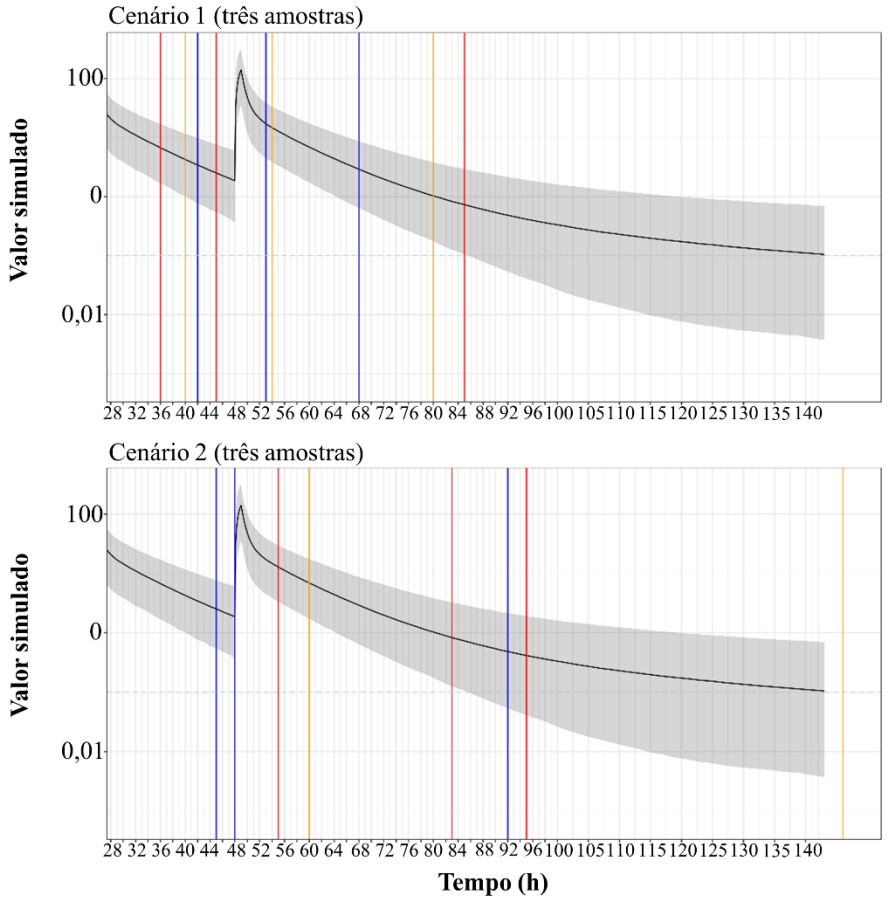

Figura 30: Tempos de coletas esparsas (n=3) propostos para os cenários 1 e 2 no estudo da farmacocinética da daunorrubicina e daunorrubicinol em pacientes pediátricos.

A **Figura 31** mostra os tempos de coletas esparsas (n=2) propostos para os cenários 3 e 4 no estudo da farmacocinética da DAUN e DAUNOL em pacientes pediátricos.

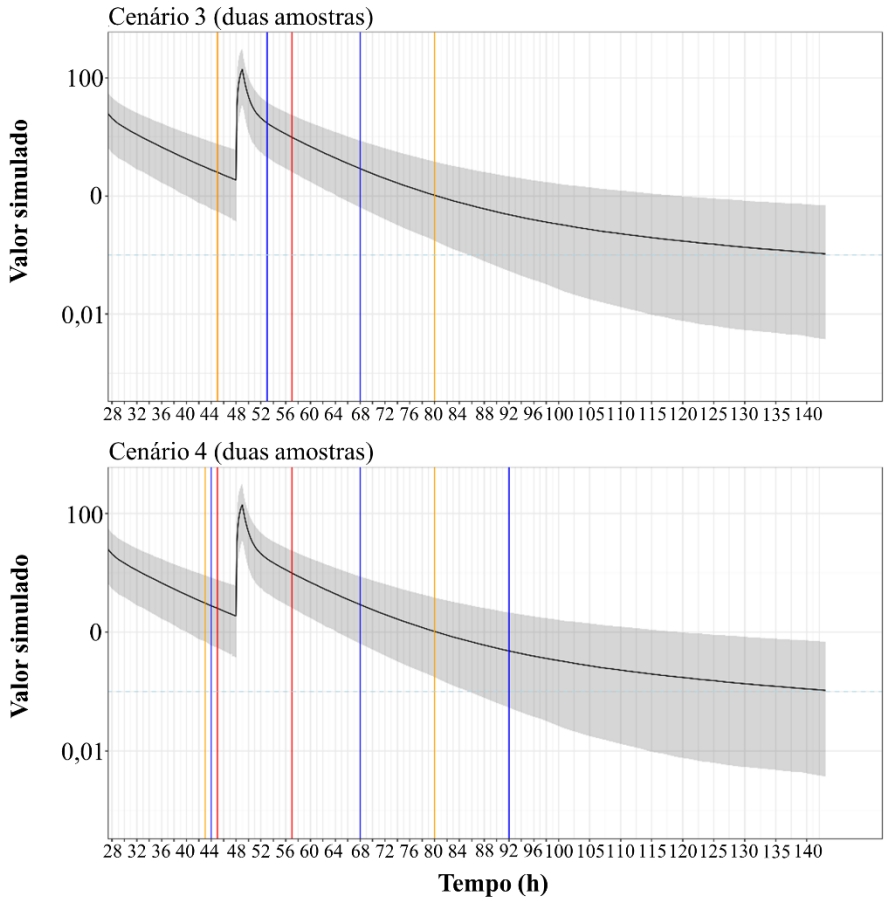

Figura 31: Tempos de coletas esparsas (n=2) propostos para os cenários 3 e 4 no estudo da farmacocinética da daunorrubicina e daunorrubicinol em pacientes pediátricos.

Os dados apresentados na **Figura 32** mostram as razões entre os parâmetros farmacocinéticos da DAUN (*clearance* total, Vd_1, Q_2, Vd_2, Vd_3 e Erro proporcional) e DAUNOL (Vd_4, ClM, Erro proporcional, Vd_5 e QM) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 1** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

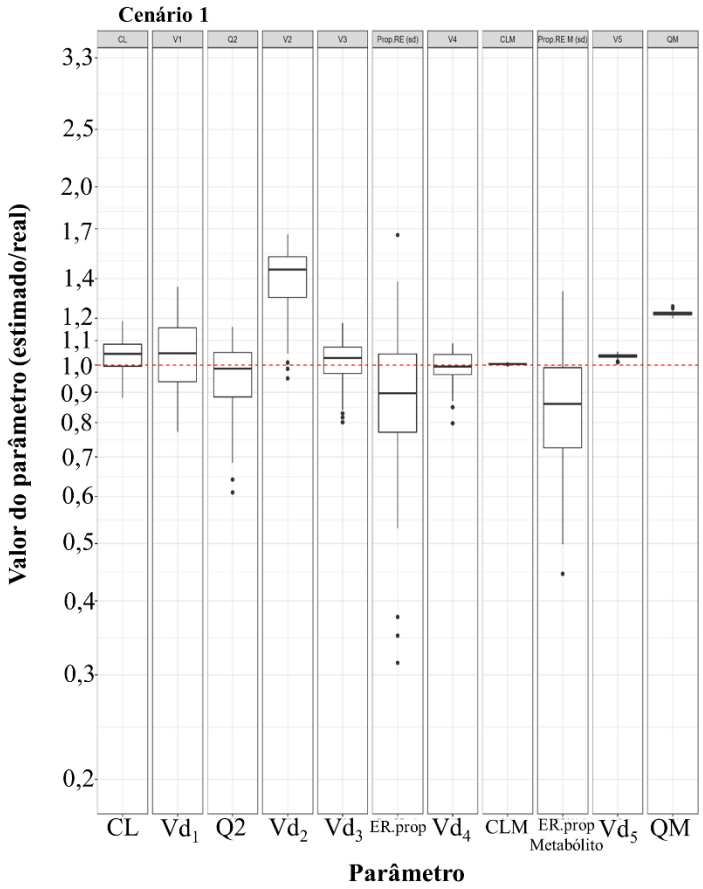

Figura 32: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 1** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 33** mostram as razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual – VII dos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 1** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

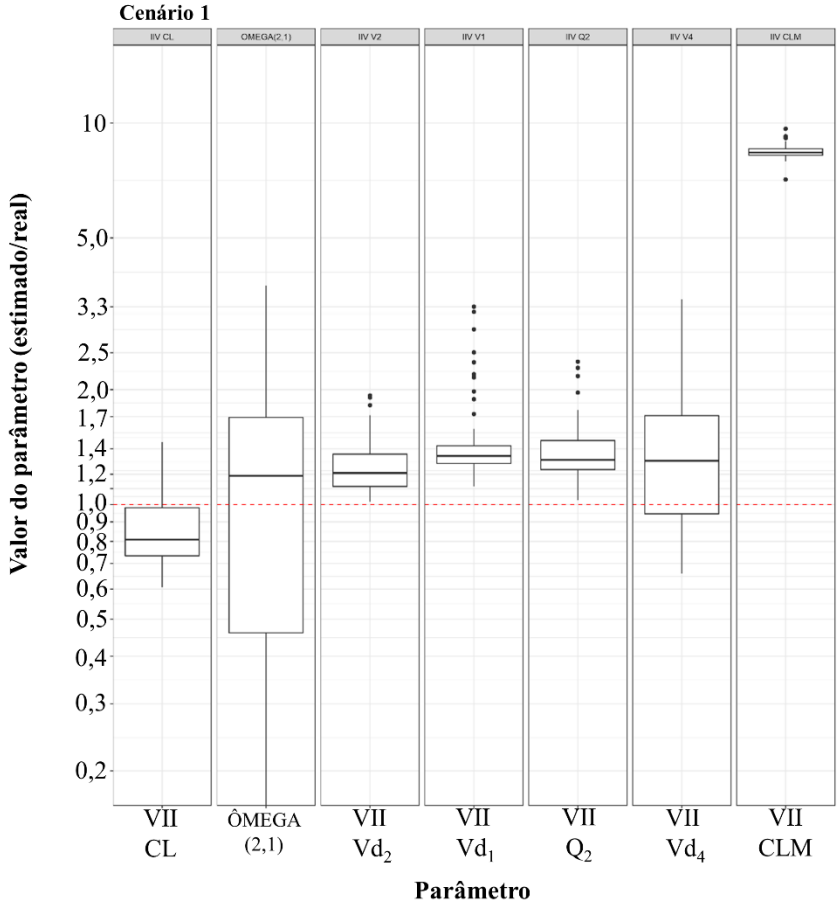

Figura 33: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 1** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 34** mostram as razões entre os parâmetros farmacocinéticos da DAUN (clearance total, Vd_1, Q_2, Vd_2, Vd_3) e DAUNOL (Vd_4, ClM, Vd_5 e QM) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 2** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

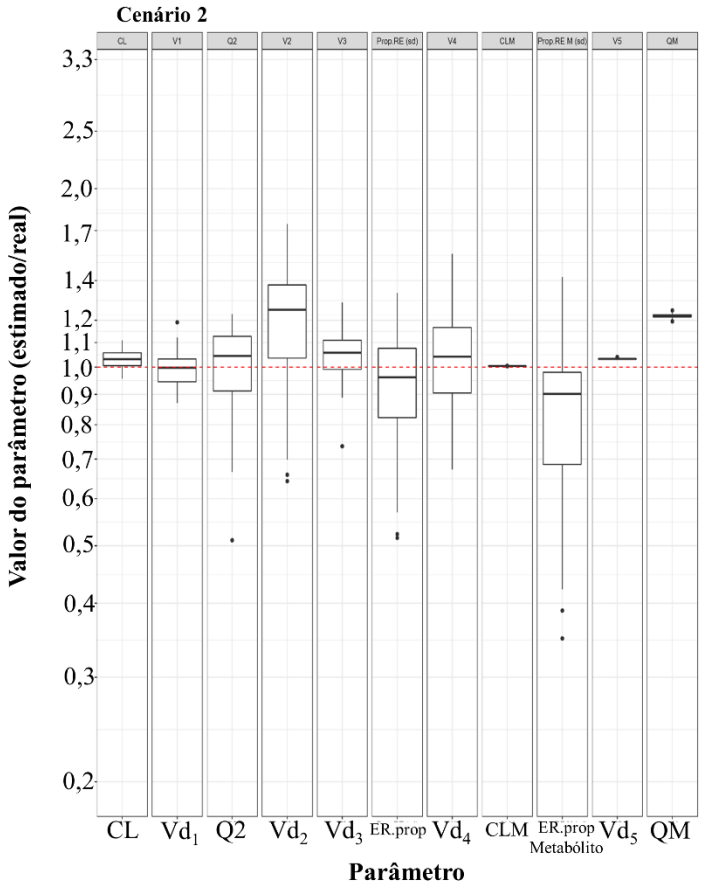

Figura 34: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 2** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 35** mostram as razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 2** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

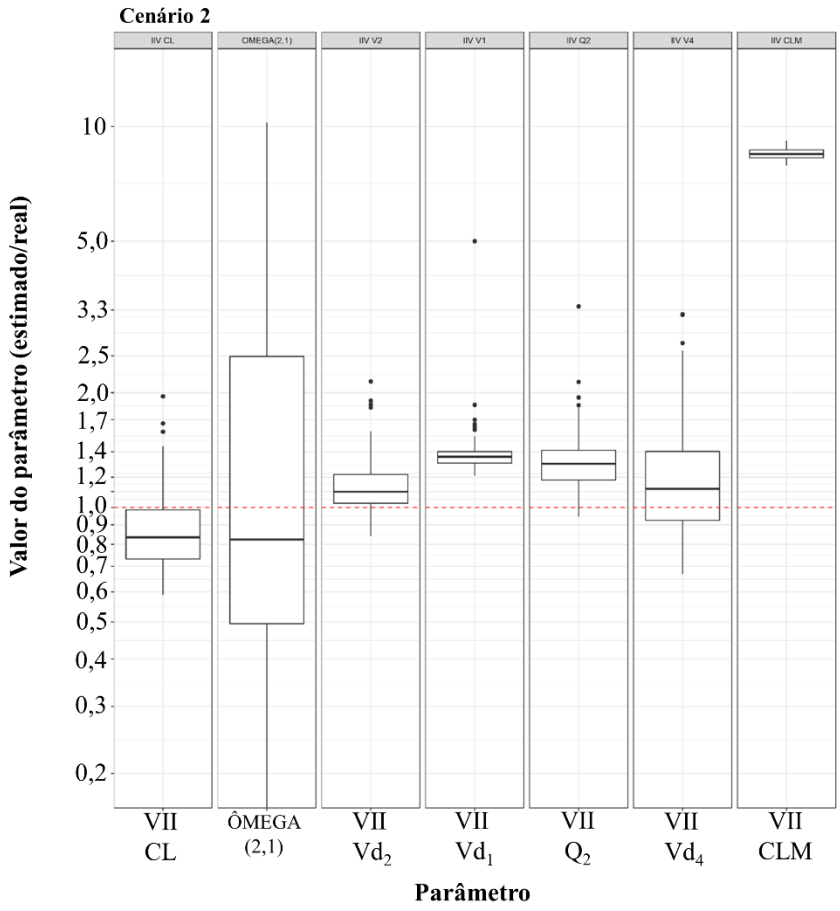

Figura 35: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 2** (n=3; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 36** mostram as razões entre os parâmetros farmacocinéticos da DAUN (*clearance* total, Vd_1, Q_2, Vd_2, Vd_3) e DAUNOL (Vd_4, ClM, Vd_5 e QM) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 3** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

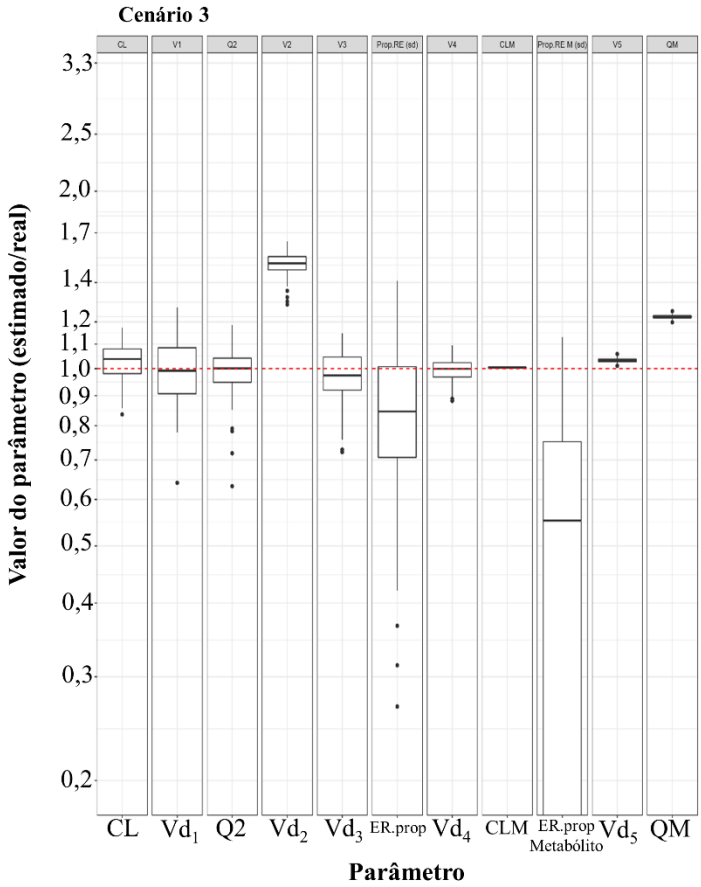

Figura 36: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 3** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 37** mostram as razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual – VII dos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 3** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

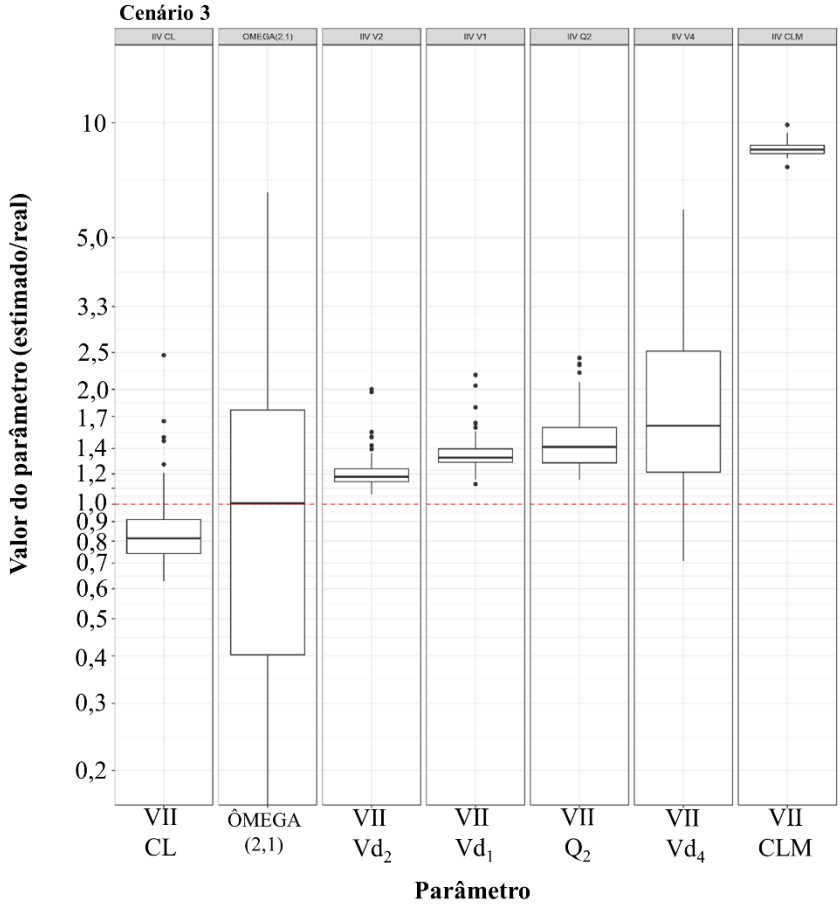

Figura 37: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 3** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 38** mostram as razões entre os parâmetros farmacocinéticos da DAUN (clearance total, Vd_1, Q_2, Vd_2, Vd_3) e DAUNOL (Vd_4, CLM, Vd_5 e QM) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 4** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

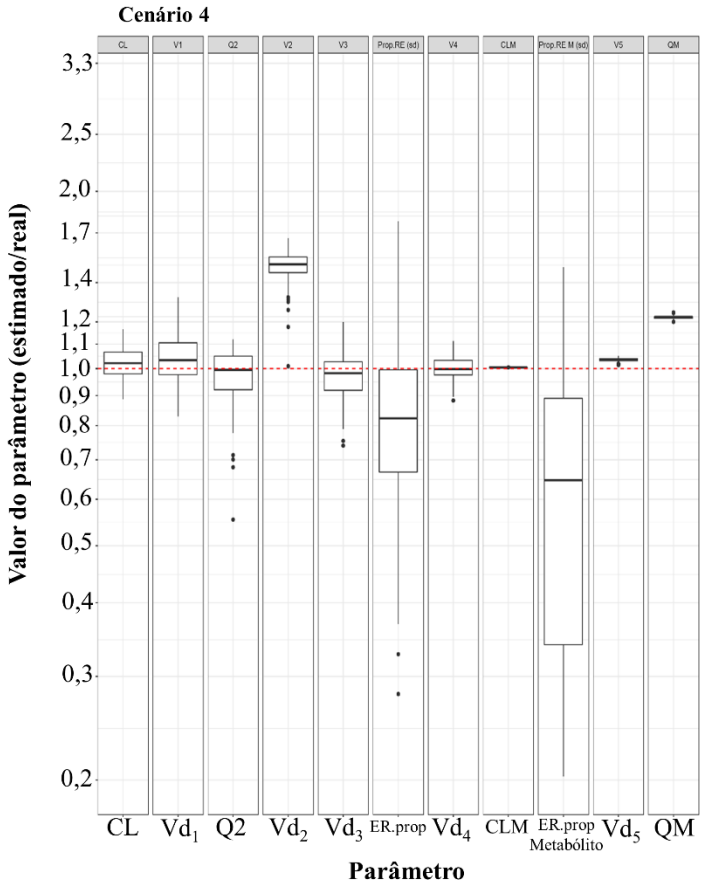

Figura 38: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol obtidos com as coletas esparsas do **cenário 4** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Os dados apresentados na **Figura 39** mostram as razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual – VII dos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 4** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

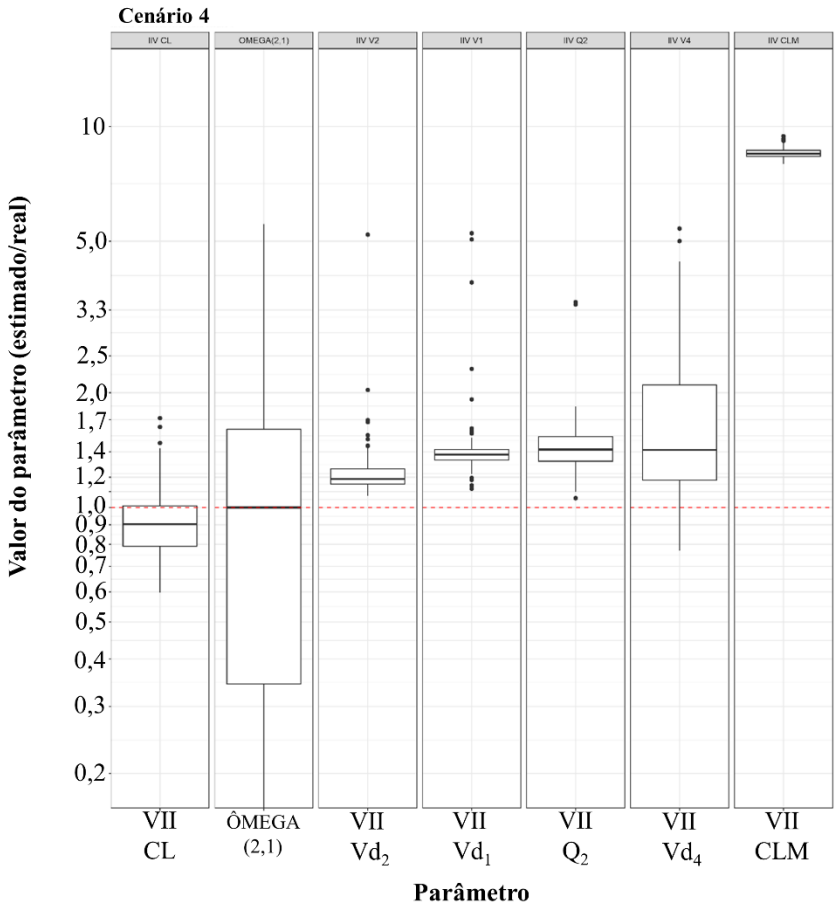

Figura 39: Boxplot (mediana e primeiro e terceiro quartis) das razões entre os efeitos randômicos (variabilidade interindividual –VII dos parâmetros farmacocinéticos da daunorrubicina e daunorrubicinol) obtidos com as coletas esparsas do **cenário 4** (n=2; estimado) e com o número total de coletas (n=14; real) para os pacientes pediátricos virtuais.

Tabela 25: Concentrações (plasma, ultrafiltrado do plasma e urina) da daunorrubicina e do daunorrubicinol em um paciente pediátrico com LLA tratado com 15 mg de daunorrubicina (25 mg/m^2) durante 30 min (primeira infusão)

Paciente pediátrico	**daunorrubicina**	**daunorrubicinol (ng/mL)**
Plasma (ng/mL)	19,30	17,54
DAUNOL/DAUN	0,91	
Ligação às proteínas plasmáticas (%)	77,69	73,72
Ultrafiltrado (ng/mL)	2,15	2,25
Urina (ng/mL)	2479,08	469,63

5. DISCUSSÃO

O presente estudo relata o desenvolvimento e a validação de um modelo de farmacocinética populacional (popPK) da DAUN e do DAUNOL em pacientes adultos diagnosticados com LMA e submetidos à quimioterapia do regime de indução de remissão. Na sequência, foi desenvolvida uma estratégia de amostragem esparsa (duas ou três coletas) ideal na predição da farmacocinética da DAUN e do DAUNOL em pacientes adultos ou pediátricos utilizando apenas 0,5 mL de sangue total.

O modelo popPK da DAUN e DAUNOL foi construído com 5 compartimentos. Os três compartimentos correspondentes ao Vd_1, Vd_2 e Vd_3 descreveram adequadamente a farmacocinética da DAUN sob a forma inalterada. Os dois compartimentos adicionais correspondentes ao Vd_4 e Vd_5 foram inseridos para descrever a farmacocinética do metabólito DAUNOL. Callies et al. (2004) também descreveram a farmacocinética populacional da DAUN e DAUNOL por um modelo com cinco compartimentos. As concentrações plasmáticas do metabolito DAUNOL aumentam rapidamente no plasma em função do metabolismo nos eritrócitos e no fígado e permanecem maiores que as concentrações plasmáticas da DAUN inalterada porque a eliminação do metabólito é um processo mais lento do que a sua formação.

A análise de covariáveis no estudo de popPK pode identificar e quantificar os parâmetros que interferem na exposição ao fármaco inalterado e seu metabólito. O efeito dos parâmetros peso, altura, superfície corporal, percentual de gordura e fração livre da DAUN foram avaliados, individualmente, como covariáveis do modelo popPK da DAUN e DAUNOL. No entanto, nenhuma das covariáveis experimentadas foram incluídas no modelo final por não resultarem em melhorias na adequação dos dados ao modelo. Estudos anteriores também relatam a ausência de melhoria do modelo popPK da DAUN e DANOL com a inclusão de covariáveis demográficas (BOGASON et al., 2011). Krough-Madsen et al. (2012) observaram uma pequena melhora no ajuste dos dados ao modelo com a inclusão da contagem de glóbulos brancos como covariável, no entanto, sem relevância estatística. No entanto, a identificação e inclusão de covariáveis adicionais, tais como os genótipos da CBR1e da FMO3, poderá resultar em predições mais exatas do clearance da DAUN (VARATHARAJAN et al., 2016). Ressalta-se que durante a construção do modelo popPK da DAUN e DANOL, os dados dos referidos genótipos ainda não estavam disponíveis.

Os diagnósticos de validação interna do modelo popPK da DAUN e DANOL foram considerados satisfatórios. Os gráficos de diagnóstico de qualidade do ajuste (*Goodness-of fit*)

revelaram que o modelo forneceu uma descrição adequada e sem viés dos dados, conforme mostrado na **Figura 25**.

Além disso, os sumários de NPDE **(Figura 27)** mostram que a discrepância entre os valores preditos e os observados pode ser assumida como uma distribuição normal. Por fim, as estimativas do parâmetro mediano da análise *bootstrap* mostraram-se de acordo com os resultados observados durante o ajuste original **(Tabelas 20 e 21)**.

Além dos métodos diagnósticos numéricos, métodos gráficos foram utilizados para complementar o processo de validação do modelo. A verificação visual preditiva (*visual predictive check*) (VPC) foi executada usando simulações de 1000 replicatas do estudo original para confirmar a adequação do modelo (tendência e variabilidade) e seu desempenho preditivo. A mediana e os percentis 95 e 5 dos dados simulados plotados contra o tempo **(Figura 26)** mostram que as concentrações preditas são muito próximas das concentrações observadas, inferindo um bom desempenho preditivo do modelo.

No geral, essas técnicas de diagnóstico confirmam que o modelo final de popPK da DAUN e DAUNOL é adequado para fins de simulação de dados.

No presente estudo foram encontrados valores de 305 L/h e de 551 L para o *clearance* total e volume de distribuição (Vd_1), respectivamente para a DAUN; e de 67,2 L/h e 313 L para o *clearance* total e volume de distribuição (Vd_4) do DAUNOL **(Tabelas 18 e 19)**. O *clearance* total da DAUN de 305 L/h está de acordo com o valor de aproximadamente 270 L/h reportado por Varatharajan et al. (2016). O volume de distribuição (Vd_1) da DAUN de 551 L também está de acordo com o valor de 453 L relatado por Krogh-Madsen et al., (2012) e com o valor de 373 L reportado por Bogason et al. (2010). Em relação ao metabólito DAUNOL, o *clearance* total de 67,2 L/h é próximo ao valor de 54,3 L/h relatado por Callies et al. (2004).

A variabilidade interindividual nos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL influencia a eficácia, a toxicidade e, consequentemente, o resultado do tratamento. Semelhante aos relatos anteriores (BOGASON et al., 2010; VARATHARAJAN et al., 2016; KROGH-MADSEN et al., 2012), alta variabilidade interindividual nos parâmetros farmacocinéticos de ambos DAUN e DAUNOL foi observada neste estudo. A variabilidade interindividual no *clearance* total da DAUN foi de 37% (EPR) e no volume de distribuição (Vd_1) de 79% (EPR) **(Tabela 18)**. Ressalta-se que a alta variabilidade interindividual na farmacocinética da DAUN e DAUNOL não pode ser explicada por covariáveis demográficas, contagem de glóbulos brancos periféricos (BOGASON et al., 2010) ou polimorfismos genéticos nas enzimas envolvidas no metabolismo (VARATHARAJAN et al., 2016). No entanto, a busca de covariáveis de influência no *clearance* total da DAUN permanece como um desafio com o

intuito de reduzir a variabilidade interindividual na exposição a DAUN e DAUNOL através de doses previamente ajustadas.

Os modelos popPK podem ser combinados com estratégias de amostragem esparsa com o objetivo de estimar parâmetros farmacocinéticos individuais de maneira tão robusta quanto aquela observada com amostras seriadas. As estratégias de amostragem esparsa são fundamentais na condução de estudos farmacocinéticos em crianças, assim como na avaliação da exposição sistêmica em adultos.

O presente estudo relata pela primeira vez o desenvolvimento de uma estratégia de amostragem esparsa para a avaliação da farmacocinética da DAUN e DAUNOL com o objetivo de aplicação em estudos de popPK em crianças.

No presente estudo, a estratégia de amostragem esparsa foi realizada considerando os tempos de amostragem iguais ou maiores que 2 h após o início da infusão (após a fase de distribuição) e no máximo 85 h após a infusão (concentrações plasmáticas acima do LIQ-limite inferior de quantificação). Assim, foram experimentadas estratégias com dois e com três tempos de coleta.

O desempenho da estratégia de amostragem esparsa e a estabilidade do modelo foram avaliados com base nas razões dos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL entre os valores estimados com as coletas esparsas (duas ou três) nos quatro diferentes cenários propostos pelo programa PopED e os valores reais obtidos com as coletas seriadas **(Figuras 32 a 39)**. As razões dos valores estimado/real para cada parâmetro farmacocinético estão representadas nos gráficos *boxplot* (gráficos de caixa) **(Figura 32 a 39)** com a finalidade de avaliar visualmente a distribuição empírica dos dados para cada cenário. Inicialmente, observa-se grande dispersão dos dados (primeiro e terceiro quartis) para os cenários 3 e 4, tanto para os efeitos fixos (*clearance* total, Vd_1, Q_2, Vd_2, Vd_3, Erro proporcional, Vd_4, *clearance* do metabólito, Erro proporcional do metabólito. Vd_5 e QM), quanto para os efeitos randômicos (IIV *clearance*, ômega (2,1), IIV Vd_2, IIV Vd_1, IIV Q_2, IIV Vd_4, IIV *clearance* do metabólito) **(Figura 36 a 39)**.

Assim, foram eliminados os cenários 3 e 4 e comparados os cenários 1 e 2 com o propósito de definir aquele que resultaria em estimativas mais precisas dos parâmetros farmacocinéticos. A observação visual dos dados permite inferir que o cenário 2 seria mais adequado do que o cenário 1 em função de apresentar razões estimado/real mais próximas da unidade tanto para os efeitos fixos quanto para os efeitos randômicos. Ou seja, a priori o cenário 2 **(Tabela 24)** com coletas nos tempos 55, 83, 95 h (grupo 1); 48, 60, 144 h (grupo 2) ou 45, 48, 92 h (grupo 3) após o início da infusão seria o mais adequado. No entanto, a análise de

probabilidade (BQL *Probability*) de observação de concentrações plasmáticas abaixo dos valores do LIQ (0,1 ng de DAUN ou DAUNOL/mL de plasma) permite inferir que tempos de coleta superiores a 85 h após o início da infusão aumentam de maneira pronunciada a probabilidade de observação de concentrações plasmáticas abaixo do LIQ **(Figura 29)**.

Considerando que o cenário 2 apresenta tempos de coleta superiores a 85 h para os três grupos, optamos pelo cenário 1 [tempos de coleta 36, 45, 85 (grupo 1); 40,54, 80 (grupo 2) e 42, 53, 68 (grupo 3); **Tabela 24**] de amostras esparsas como o mais adequado na estimativa dos parâmetros farmacocinéticos da DAUN e DAUNOL.

A estratégia de amostragem esparsa (cenário 1) nos permitirá estimar parâmetros farmacocinéticos individuais de forma tão robusta quanto seria uma estratégia de amostragem com coletas seriadas. Essa abordagem é muito promissora para a avaliação da exposição a DAUN e DAUNOL tanto em pacientes adultos quanto em crianças, uma vez que a alta variabilidade na farmacocinética exigiria a individualização do regime de dosagem com base na farmacocinética, já que o ajuste da dose com base em peso corporal ou área superficial corporal não contribui na minimização da variabilidade interindividual na farmacocinética.

No presente estudo foi incluído apenas um paciente pediátrico de 3 anos diagnosticado com leucemia linfóide aguda e tratado com uma infusão de DAUN de 25 mg/m^2 durante 30 min (15 mg). A única amostragem de sangue realizada 85 min após o início da infusão **(Tabela 25)** mostra razão de concentrações plasmáticas de DAUNOL/DAUN de 0,91. Os dados apresentados na **Figura 16 (Capítulo II)** evidenciam que as razões de concentrações plasmáticas DAUNOL/DAUN observadas nos doze pacientes adultos investigados tratados com três infusões de DAUN (60 mg/m^2 durante 1 h a cada 24 h) aumentam em função do tempo com observação de valores próximos a 40 em torno de 115 h após o início da primeira infusão. Ressalta-se que os dados da criança investigada foram obtidos nos tempos iniciais após o término da infusão de DAUN, ou seja, antes da fase de distribuição e antes do período estabelecido para o início das coletas (2 h). No entanto, não foi possível a obtenção de outras amostras de sangue como estimado no estudo de amostragem esparsa (36-85 h).

Apesar de ser considerada um fármaco com décadas de experiência clínica, a DAUN destaca-se em função de sua alta eficácia assim como do risco de desenvolvimento de cardiotoxicidade, seja na forma de efeitos subclínicos tardios (mais de 50% dos sobreviventes de câncer infantil), seja na forma de eventos clínicos (1-10% dos sobreviventes de câncer infantil) (EDWARDSON et al., 2015; KRISCHKE et al., 2016).

Krischke et al. (2016) avaliaram o papel dos peptídeos natriuréticos ANP (peptídeo natriurético tipo A) e BNP (peptídeo natriurético tipo B) e das troponinas cardíacas T (cTnT) e

I (cTnI) como potenciais preditores precoces da cardiotoxicidade subclínica e, eventualmente, a longo prazo de uma outra antraciclina (doxorrubicina) em crianças com câncer. Embora as concentrações plasmáticas dos referidos peptídeos natriuréticos e troponinas cardíacas não tenham mostrado correlação significativa com a exposição a antraciclina (representada pela AUC e Cmax), é importante considerar que a cardiotoxicidade ocorre em menos de 10% dos pacientes, e portanto, o número de pacientes recrutados no estudo mencionado é muito baixo (n=101) para permitir a observação de quaisquer correlações.

Seria interessante introduzir em futuros estudos de farmacocinética clínica com significativo número de pacientes, a avaliação da existência de correlação entre a exposição a DAUN (AUC e Cmax) e as concentrações plasmáticas dos biomarcadores peptídeos natriuréticos e troponinas nos pacientes adultos e pediátricos com eventos cardíacos subclínicos ou clínicos tardios. Assim o presente estudo oferece uma ferramenta viável a ser agregada em futuros estudos multicêntricos empenhados na predição da dose não empírica de DAUN em pacientes adultos e pediátricos avaliada com base em farmacocinética e biomarcadores de cardiotoxicidade.

6. CONCLUSÕES

1 - O modelo de farmacocinética populacional da DAUN e DAUNOL, desenvolvido com dados de pacientes pediátricos virtuais, estruturado com cinco compartimentos e validado com métodos gráficos e estatísticos, apresentou bom desempenho preditivo e mostrou-se adequado para fins de simulação de dados.

2 - A estratégia de amostragem esparsa (n=3) com tempos de coleta entre 36-85 h permitiu estimar os parâmetros farmacocinéticos individuais da DAUN e DAUNOL de forma tão robusta quanto a estratégia de amostragem com coletas seriadas, oferecendo uma ferramenta viável a ser agregada em futuros estudos multicêntricos empenhados na predição da dose não empírica de DAUN em pacientes adultos e pediátricos.

7. REFERÊNCIAS

BARKER, C. I. S. et al. Pharmacokinetic studies in children: recommendations for practice and research. **Arch Dis Child**, v. 103, p. 695-702, 2018.

BOGASON, A. et al. Inverse relationship between leukaemic cell burden and plasma concentrations of daunorubicin in patients with acute myeloid leukaemia. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 514-521, 2011.

BRENDEL, K. et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 46, p. 221-34, 2007.

CALLIES, S. et al. Population pharmacokinetic model for daunorubicin and daunorubicinol coadministered with zosuquidar.3HCl (LY335979). **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 54, p. 39-48, 2004.

EDWARDSON, D. et al. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. **Current Drug Metabolism**, v. 16, p. 412-426, 2015.

FERREIRA, A. et al. High prevalence of off-label and unlicensed drug prescribing in a Brazilian intensive care unit. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 82-7, 2012.

FERRO, A. Paediatric prescribing: why children are not small adults. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 79, p. 351-353, 2015.

HEMPEL, G. et al. Pharmacokinetics of daunorubicin and daunorubicinol in infants with leukemia treated in the interfant 99 protocol. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 54, p. 355-360, 2010.

KREKELS, E. H. J. et al. Evidence-based drug treatment for special patient populations through model-based approaches. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 22-26, 2017.

KRISCHKE, M. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a “European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium” trial. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.78, p.1175-84, 2016.

KROGH-MADSEN, M. et al. Population pharmacokinetics of cytarabine, etoposide, and daunorubicin in the treatment for acute myeloid leukemia. **Cancer chemotherapy and pharmacology,** v. 69, p. 1155-63, 2012.

RODIEUX, F. et al. Effect of Kidney Function on Drug Kinetics and Dosing in Neonates, Infants, and Children. **Clinical pharmacokinetics**, v. 54, p. 1183-204, 2015.

SKINNER, A. V. Neonatal pharmacology. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, p. 79-84, 2011.

VAN DEN ANKER, J.; ALLEGAERT, K. Clinical pharmacology in neonates and young infants: the benefit of a population-tailored approach. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 5, p. 5-8, 2012.

VARATHARAJAN, S. et al. Population pharmacokinetics of Daunorubicin in adult patients with acute myeloid leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, p. 1051-1058, 2016.

VERMEULEN, E. et al. How to optimise drug study design: pharmacokinetics and pharmacodynamics studies introduced to paediatricians. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, p. 439-447, 2017.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

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

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 25 de março de 2015.

Ofício nº 1121/2015
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 9064/2014

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **"FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA DAUNORRUBICINA E SEU METABÓLITO DAUNORRUBICINOL EM PACIENTES ADULTOS E PEDIÁTRICOS PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA" – Versão 3 de 27/02/2015,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 404ª Reunião Ordinária realizada em 23/03/2015, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3 de 20/10/2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimas Senhoras
PROFª DRª BELINDA PINTO SIMÕES
MILENA LOCCI DE OLIVEIRA (Doutoranda)
Depto. de Clínica Médica

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Ribeirão Preto, 26 de junho de 2015.

Projeto de pesquisa: "FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA DAUNORRUBICINA E SEU METABÓLITO DAUNORRUBICINOL EM PACIENTES ADULTOS E PEDIÁTRICOS PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA"

Pesquisador Responsável: Dra. BELINDA PINTO SOARES

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

"O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 446/12. Diante disso, a FCFRP-USP, como instituição coparticipante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

Cleni Mara Marzocchi Machado
Coordenadora do CEP/FCFRP

Maria Vitória Lopes Badra Bentley
Diretora da FCFRP/USP

Avenida do Café, s/nº. - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Diretoria – fcfrp@usp.br
Fone: (16) 3315-4181 – Fax: (16) 3315-4892

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo
PESQUISA CIENTÍFICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO PACIENTE:.....IDADE:.....
REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE INDENTIFICAÇÃO:.....
NOME DA PESQUISA: "Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos portadores de leucemia mieloide aguda".

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões (Departamento de Clínica Médica, Divisão de Hematologia HC-FMRP-USP) - CRM 57.383 - Telefone: (16) 3602 2663.
ORIENTADORA DE DOUTORADO: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote (Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas; Laboratório de Farmacocinética Clínica da FCFRP-USP) - Telefone: (16) 3602-4195.
RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TCLE: Milena Locci de Oliveira (Departamento de Análises Clínicas, toxicológicas e Bromatológicas; Laboratório de Farmacocinética Clínica da FCFRP-USP) - Telefone: (16) 3602-4195.
OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Convidamos você a participar, como paciente, da pesquisa chamada "Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos portadores de leucemia mieloide aguda".

A daunorrubicina é o remédio indicado para o seu tratamento da leucemia mieloide aguda. Este remédio é dado por uma injeção e sabemos que concentrações muito elevadas do remédio no sangue podem produzir efeitos adversos não esperados, como anulação da produção de células sanguíneas pela medula, toxicidade cardíaca (taquicardia e insuficiência cardíaca congestiva), e gastrointestinal (náuseas, vômitos e inflamação da parte interna da boca e da garganta); e concentrações muito baixas podem não ser suficientes para eliminar sua doença.

Esta pesquisa tem o objetivo de entender se as crianças com a mesma doença que você devem receber doses diferentes deste remédio. Além disso, os pesquisadores vão usar os

resultados da pesquisa nos adultos para ajudar a diminuir o número de coletas de sangue que precisam ser feitas em crianças com a mesma doença.

Para participar desse estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira, e caso concorde em participar, o seu tratamento não será mudado em nada, não receberá uma forma de atendimento diferente por parte dos pesquisadores e também não terá riscos adicionais. Os pesquisadores irão responder qualquer dúvida que você tiver e ajudar você em qualquer problema que possa ocorrer durante o estudo.

Sua participação é voluntária, ou seja, você é livre para aceitar participar ou não. Se você não quiser participar, você não deixará de ser atendido ou tratado. Se você aceitar participar, pode desistir em qualquer momento, mesmo depois da pesquisa ter sido iniciada, sendo que a desistência não vai prejudicar ou interferir no seu tratamento ou na forma em que é atendido(a) pelos responsáveis e pela equipe médica.

Você não será identificado em nenhum estudo científico resultante dessa pesquisa e suas informações e dados serão sempre mantidos em segredo. Seu nome não será identificado em nenhuma etapa do estudo nem nas etiquetas das amostras coletadas, pois seus dados e informações serão transformados em um código e apenas o pesquisador responsável conhecerá sua verdadeira identificação. Nenhuma informação será liberada sem a sua permissão.

Pacientes adultos e pediátricos colhem sangue rotineiramente como parte dos exames pedidos pelos médicos. Essa coleta é realizada por profissionais responsáveis e especializados da equipe de enfermagem. Ainda assim, às vezes este procedimento pode provocar dor de pequena intensidade e pequenas manchas roxas no local da picada da agulha.

Esta pesquisa apresenta **"risco mínimo"** ao paciente que significa aproveitar a veia do seu braço pega por um(a) enfermeiro(a). Você só será picado uma única vez no braço para colocação de um tubinho de plástico que será utilizado para realizar as coletas de sangue rotineiras e em alguns horários, após você ter recebido o remédio.

Ao todo serão feitas 15 coletas de sangue e a cada vez serão tirados cerca de 5 mL de sangue (aproximadamente uma colher de chá). No sangue coletado realizaremos exames para verificar como o remédio é distribuído e eliminado do seu corpo.

Antes de receber este remédio você deverá eliminar toda a urina da sua bexiga. Depois disso, também será necessário obter amostras da sua urina a cada 24h após a administração do remédio. A urina será coletada em uma garrafa de plástico e nela também realizaremos exames para verificar como seu corpo elimina o remédio.

Não é esperado nenhum benefício imediato a você, pela sua participação no estudo, mas pode ser que, no futuro, os resultados dessa pesquisa contribuam para aumentar o conhecimento

de como a daunorrubicina age no corpo humano, como ela é distribuída e eliminada, e isso poderá ajudar futuros pacientes que precisarão usar o mesmo remédio que você, particularmente as crianças.

Além disso, sua colaboração também poderá ajudar a reduzir o número de coletas de sangue em crianças com o mesmo problema de saúde que o seu.

Eu, _____, abaixo assinado(a), depois de ter recebido informações, e ciente dos meus direitos:

1. Garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa e o tratamento ao qual serei submetido(a);

2. Garantia de receber do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEP HCFMRP), pelo telefone (16) 3602-2228, a resposta a qualquer dúvida ética sobre a pesquisa;

3. Liberdade de aceitar ou não participar da pesquisa, bem como retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu acompanhamento e tratamento no HC-FMRP-USP;

4. Compromisso dos responsáveis pela pesquisa em me proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;

5. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo sobre minhas informações e minha participação durante todo o estudo, mesmo quando forem publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;

6. Garantia de receber uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinada pelo(a) pesquisador(a).

7. Em caso de danos causados pela pesquisa, tenho o direito de procurar as leis vigentes no Brasil.

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

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Sujeito da pesquisa (Nome completo)	Assinatura

Ribeirão Preto, ... de .....de 201.....

Pesquisadora responsável (Nome completo)	Assinatura

Testemunha não ligada à pesquisa

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Nome completo	Assinatura

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do(a) responsável pelo(a) menor

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Responsável pelo menor)

NOME DO PACIENTE:.....IDADE:.....
REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE INDENTIFCAÇÃO:.....
NOME DA PESQUISA: "Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos portadores de leucemias agudas".

RESPONSÁVEIS CLÍNICOS: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli (Departamento de Puericultura e Pediatria HC-FMRP-USP, divisão de Oncopediatria) CRM-SP 66.894 - Telefone (16) 3602-6623.
Profa. Dra. Belinda Pinto Simões (Departamento de Clínica Médica, Divisão de Hematologia HC-FMRP-USP) - CRM 57.383 - Telefone: (16) 3602-2663.
ORIENTADORA DE DOUTORADO: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote (Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas; Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da FCFRP-USP) - Telefone: (16) 3602-4195.
RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TCLE: Milena Locci de Oliveira (Departamento de Análises Clínicas, toxicológicas e Bromatológicas; Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da FCFRP-USP) - Telefone: (16) 3602-4195.
OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

O(a) menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa "Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos portadores de leucemias agudas".

A daunorrubicina é o remédio indicado para o tratamento da leucemia mieloide aguda do(a) paciente. Este remédio é dado por uma injeção e sabemos que concentrações muito

elevadas do remédio no sangue podem produzir efeitos adversos não esperados, como anulação da produção de células sanguíneas pela medula, toxicidade cardíaca (como taquicardia e insuficiência cardíaca congestiva), e gastrointestinal (como náuseas, vômitos e inflamação da parte interna da boca e da garganta); e concentrações muito baixas podem não ser suficientes para eliminar a doença.

Esta pesquisa tem o objetivo de entender se as crianças com a mesma doença que os adultos devem receber doses diferentes deste remédio. Além disso, os pesquisadores vão usar os resultados da pesquisa nos adultos para ajudar a diminuir o número de coletas de sangue que precisam ser feitas nas crianças com a mesma doença.

Para participar desta pesquisa, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira e, caso concorde em participar, o tratamento dele(a) não será mudado em nada e também não terá riscos adicionais. Os pesquisadores irão responder qualquer dúvida que você tiver e ajudar você em qualquer problema que possa ocorrer durante o estudo.

A participação do(a) paciente é voluntária, ou seja, ele(a) é livre para aceitar participar ou não. Se ele(a) aceitar participar, pode desistir em qualquer momento, mesmo depois da pesquisa ter sido iniciada, sendo que a desistência não vai prejudicar ou interferir no seu tratamento ou na forma em que ele(a) é atendido(a) pelos responsáveis e pela equipe médica.

O(a) paciente não será identificado(a) em nenhum estudo científico resultante dessa pesquisa e os dados e informações dele(a) serão sempre mantidos em segredo. O(a) nome dele(a) não será identificado em nenhuma etapa do estudo nem nas etiquetas das amostras coletadas, pois os dados e informações serão transformados em um código e apenas o pesquisador responsável conhecerá a verdadeira identificação do(a) paciente. Nenhuma informação será liberada sem a sua permissão.

Pacientes adultos e pediátricos colhem sangue rotineiramente como parte dos exames pedidos pelos médicos. Essa coleta é realizada por profissionais responsáveis e especializados da equipe de enfermagem. Ainda assim, às vezes este procedimento pode provocar dor de pequena intensidade e pequenas manchas roxas no local da picada da agulha.

Esta pesquisa apresenta **“risco mínimo”** ao paciente que significa aproveitar a veia do braço pega por um(a) enfermeiro(a). Ele(a) só será picado uma única vez no braço para colocação de um tubinho de plástico que será utilizado para realizar as coletas de sangue rotineiras e em alguns horários, após ele(a) ter recebido o remédio.

Ao todo serão retirados cerca de 1 mL de sangue (menos da metade de uma colher de chá). No sangue coletado realizaremos exames para verificar como o remédio é distribuído e eliminado do corpo.

Antes de receber este remédio sugerimos ao paciente que faça xixi, caso esteja ele(a) com vontade. Depois disso, também será necessário obter amostras de urina a cada 4 horas, se possível, até completar 24h após a administração do remédio. A urina será coletada em um copinho de plástico e nela também realizaremos exames para verificar como o corpo elimina o remédio.

Não é esperado nenhum benefício imediato ao paciente, pela participação dele(a) no estudo, mas pode ser que, no futuro, os resultados dessa pesquisa contribuam para aumentar o conhecimento de como a daunorrubicina age no corpo humano, como ela é distribuída e eliminada, e isso poderá ajudar futuros pacientes que precisarão usar o mesmo remédio que ele(a). Além disso, a colaboração dele(a) também poderá ajudar a reduzir o número de coletas de sangue em crianças com o mesmo problema de saúde que o(a) paciente.

Eu, _____, abaixo assinado(a), depois de ter recebido informações, e ciente dos meus direitos:

1 - A qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participação do(a) menor sob minha responsabilidade, sem que isso me traga prejuízo à continuação do acompanhamento e tratamento do(a) paciente pediátrico(a) no HC-FMRP-USP.

2 - A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para o(a) paciente. 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, a participação do(a) paciente pediátrico(a).

3 - Os pesquisadores me garantem que responderão a qualquer pergunta ou farão esclarecimentos a qualquer dúvida sobre dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa e ao tratamento ao qual o(a) paciente pediátrico(a) será submetido.

4 - Os pesquisadores se comprometem a me proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que estas possam afetar minha vontade em permitir a continuação da pesquisa no(a) paciente pediátrico(a).

5 - Os pesquisadores se comprometem a manter segredo dos dados obtidos do(a) paciente pediátrico(a) durante o estudo. Os resultados estarão à minha disposição quando finalizada.

6 - Eu terei direito ao ressarcimento financeiro caso haja gastos gerados exclusivamente pela participação do(a) paciente pediátrico(a) nesta pesquisa.

7 - Em caso de danos causados pela pesquisa eu, responsável pelo(a) menor, tenho o direito de procurar as leis vigentes no Brasil.

Declaro que concedi permissão à participação do(a) menor _____, sob minha responsabilidade, no projeto de pesquisa acima referido e que fui devidamente informado (a) de todos os detalhes.

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Sujeito da pesquisa (Nome completo)	Assinatura

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Pesquisadora responsável (Nome completo)	Assinatura

Testemunha não ligada à pesquisa

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Nome completo	Assinatura

APÊNDICE C – Termo de Assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO

NOME DO PACIENTE:.....IDADE:.....
DOCUMENTO DE INDENTIFCAÇÃO:.....

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos portadores de leucemias agudas".

Seus pais permitiram que você participe. Queremos saber se as crianças com a mesma doença que você devem receber doses diferentes deste remédio daquelas que os adultos recebem. Além disso, os pesquisadores vão usar os resultados da pesquisa nos adultos para ajudar a diminuir o número de coletas de sangue que precisam ser feitas em crianças com a mesma doença.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de 2 à 12 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, e não terá nenhum problema se desistir. Se você quiser participar, antes de receber este remédio sugerimos que você faça xixi, caso esteja com vontade. Depois, precisaremos coletar sua urina em copinhos de plástico, e também precisaremos de 1 mL de sangue (menos da metade de uma colher de chá).

Pacientes adultos e jovens colhem sangue em alguns dias como parte dos exames que os médicos pedem. Essa coleta é realizada por profissionais responsáveis e especializados da equipe de enfermagem. Ainda assim, às vezes este procedimento pode provocar um pouquinho de dor por causa da picadinha da agulha ou ainda que apareçam manchas roxas no local.

Esta pesquisa apresenta **"risco mínimo"** ao paciente que significa aproveitar a veia do seu braço pega por um(a) enfermeiro(a). Você só será picado uma única vez no braço para colocação de um tubinho de plástico que será utilizado para realizar as coletas de sangue rotineiras e em alguns horários, após você ter recebido o remédio.

Mesmo apresentando risco mínimo, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização.

Não é esperado nenhum benefício imediato a você, pela sua participação no estudo, mas há coisas boas que podem acontecer, como ajudar a entender como a daunorrubicina age no corpo humano e combate a leucemia, e isso pode ser que ajude futuros pacientes que precisarão

usar o mesmo remédio que você. Além disso, pode ser que a sua colaboração também ajude a reduzir o número de coletas de sangue em crianças com o mesmo problema de saúde que o seu.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Quando terminarmos a pesquisa, os resultados serão apresentados em revistas de cientistas, mas sem identificar as crianças que participaram. Em caso de dúvida ou se acontecer algo errado, você pode me procurar pelo telefone (16) 3602-4195.

Você pode me fazer as perguntas que quiser, que eu vou te explicar quantas vezes quiser.

Eu _____ aceito participar da pesquisa "Farmacocinética populacional da daunorrubicina e seu metabólito daunorrubicinol em pacientes adultos e pediátricos portadores de leucemias agudas".

Entendi as coisas boas e ruins que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir que ninguém vai ficar chateado nem serei prejudicado em nada. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Declaro que concordei voluntariamente em participar do projeto de pesquisa acima descrito e que fui devidamente informado(a) de todos os detalhes.

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Sujeito da pesquisa (Nome completo)	Assinatura

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Pesquisadora responsável (Nome completo)	Assinatura

Testemunha não ligada à pesquisa

Ribeirão Preto, ... de.....de 201.....

Nome completo	Assinatura