UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Enantiosseletividade no metabolismo do
citalopram associado a inibidores do CYP:
estudos clínico e experimental**

ADRIANA ROCHA

Ribeirão Preto

2007

ADRIANA ROCHA

**Enantiosseletividade no metabolismo do citalopram associado a
inibidores do CYP: estudos clínico e experimental**

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

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

**Ribeirão Preto
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Adriana

Enantiosseletividade no metabolismo do citalopram associado a inibidores do CYP: estudos clínico e experimental. Ribeirão Preto, 2007.

131f.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia.

1. Citalopram. 2. Enantiômeros. 3. Farmacocinética. 4. Omeprazol.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Rocha
Toxicologia

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em
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: _____

RESUMO

ROCHA, A. **Enantiosseletividade no metabolismo do citalopram associado a inibidores do CYP: estudos clínico e experimental.** 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O citalopram (CITA), inibidor seletivo da recaptação da serotonina, é disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(S) e (-)-(R) ou como enantiômero puro (+)-(S)-CITA. O CITA é metabolizado pelo CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A ao desmetilcitalopram (DCITA) e pelo CYP2D6 ao didesmetilcitalopram. O estudo investiga a influência de inibidores enzimáticos no metabolismo enantiosseletivo do CITA em ratos e em voluntários sadios. Os ratos machos Wistar (n=6 para cada grupo) foram tratados com dose única de 20 mg/Kg de CITA (grupo controle) ou pré-tratados com 80 mg/Kg de quinidina (grupo quinidina), 10 mg/Kg de fluvoxamina (grupo fluvoxamina) ou 50 mg/Kg de cetoconazol (grupo cetoconazol). As amostras de sangue foram colhidas dos ratos até 20 h após a administração do CITA. Os voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos (EM) do CYP2C19 (omeprazol como fármaco marcador), EM do CYP2D6 (debrisoquina como fármaco marcador) e com atividade normal do CYP3A (midazolam como fármaco marcador) receberam dose única p.o. de 20 mg de CITA racêmico associado ou não ao omeprazol (20 mg/dia durante 18 dias). Os enantiômeros do CITA e do DCITA foram analisados no sistema LC-MS/MS, com a coluna quiral Chiralcel[®] OD-R e fase móvel constituída por acetonitrila:metanol:água (30:30:40 v/v/v) contendo 0,05 % de dietilamina. O método foi linear no intervalo de concentrações de 0,1 – 20 ng de cada enantiômero do CITA e DCITA/mL de plasma humano e de 0,1 – 500 ng de cada enantiômero do CITA e DCITA/mL de plasma de rato. Os coeficientes de variação obtidos nos estudos da precisão e a inexatidão foram inferiores a 15 % para plasma humano e

plasma de ratos. A disposição cinética do CITA é enantiosseletiva nos ratos dos grupos controle (razão de $AUC_{S/R}$ de 0,4), quinidina (razão de $AUC_{S/R}$ de 0,5) e cetoconazol (razão de $AUC_{S/R}$ de 0,8). A inibição do CYP2D pela quinidina resultou em inibição do metabolismo do CITA e do DCITA de maneira não enantiosseletiva. A inibição do CYP2C pela fluvoxamina e do CYP3A pelo cetoconazol resultou em inibição somente do metabolismo do (+)-(S)-CITA. A disposição cinética do CITA em voluntários sadios é enantiosseletiva na ausência de tratamento com o omeprazol com observação de maior proporção plasmática do enantiômero (-)-(R)-CITA. A razão de $AUC_{S/R}$ obtida para o CITA foi de 0,56 e para o metabólito DCITA foi de 1,06. A administração de CITA racêmico a voluntários sadios em tratamento com o omeprazol exibe perda da enantiosseletividade na farmacocinética do CITA. A razão de $AUC_{S/R}$ foi de 0,96 para o CITA e de 0,92 para o DCITA. A administração de omeprazol em doses múltiplas a voluntários sadios inibe de maneira enantiosseletiva o metabolismo do eutômero (+)-(S)-CITA com aumento das concentrações plasmáticas em aproximadamente 140%.

Palavras-chave: citalopram, enantiômeros, farmacocinética, omeprazol.

ABSTRACT

ROCHA, A. **Enantioselectivity in the metabolism of citalopram combined with CYP inhibitors: clinical and experimental studies**. 2007. 131 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Citalopram (CITA), a selective serotonin reuptake inhibitor, is available for clinical use as a racemic mixture of the (+)-(S) and (-)-(R) enantiomers or as the pure (+)-(S)-CITA enantiomer. CITA is metabolized by CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A to demethylcitalopram (DCITA) and by CYP2D6 to didemethylcitalopram. The present study investigated the influence of enzyme inhibitors on the enantioselective metabolism of CITA in rats and healthy volunteers. Male Wistar rats (n=6 for each group) received a single dose of 20 mg/kg CITA (control group) or were pretreated with 80 mg/kg quinidine (quinidine group), 10 mg/kg fluvoxamine (fluvoxamine group), or 50 mg/kg ketoconazole (ketoconazole group). Blood samples were collected from the animals up to 20 h after the administration of CITA. Healthy volunteers phenotyped as extensive metabolizers of CYP2C19 (omeprazole as marker drug) and of CYP2D6 (debrisoquine as marker drug) and those with normal CYP3A activity (midazolam as marker drug) received a single oral dose of 20 mg racemic CITA combined or not with omeprazole (20 mg/day for 18 days). The CITA and DCITA enantiomers were analyzed by LC-MS/MS using a Chiralcel[®] OD-R chiral column and a mobile phase of acetonitrile:methanol:water (30:30:40, v/v/v) containing 0.05% diethylamine. The method was linear in the concentration range of 0.1-20 ng of each CITA and DCITA enantiomer/mL human plasma and of 0.1-500 ng of each CITA and DCITA enantiomer/mL rat plasma. Accuracy and precision were below the acceptance limits of 15% for human and rat plasma. The kinetic disposition of CITA was enantioselective in rats of the control ($AUC_{S/R}$ ratio = 0.4), quinidine ($AUC_{S/R}$ ratio = 0.5) and ketoconazole ($AUC_{S/R}$ ratio = 0.8) groups.

The inhibition of CYP2D by quinidine resulted in the non-enantioselective inhibition of the metabolism of CITA and DCITA. The inhibition of CYP2C by fluvoxamine and of CYP3A by ketoconazole only inhibited the metabolism of (+)-(S)-CITA. The kinetic disposition of CITA in healthy volunteers was enantioselective in the absence of treatment with omeprazole, with the observation of a higher plasma proportion of the (-)-(R)-CITA enantiomer. The $AUC_{S/R}$ ratio was 0.56 for CITA and 1.06 for the DCITA metabolite. The administration of racemic CITA to healthy volunteers treated with omeprazole showed a loss of enantioselectivity in the pharmacokinetics of CITA. The $AUC_{S/R}$ ratio was 0.96 for CITA and 0.92 for DCITA. The administration of multiple doses of omeprazole to healthy volunteers enantioselectively inhibited the metabolism of the (+)-(S)-CITA enantiomer, with an approximately 140% increase of plasma concentrations.

Keywords: citalopram, enantiomers, pharmacokinetic, omeprazole.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	=serotonina
CITA	desmetilcitalopram
CYP	= citocromo P450
DAD	= detector por arranjo de diiodo
DCITA	= desmetilcitalopram
DDCITA	= didesmetilcitalopram
DMR	= razão metabólica da debrisoquina
DNA	= ácido desoxirribunucleico
DRR	= razão de recuperação da debrisoquina
ESI	=interface de <i>electrospray</i>
EM	= metabolizador rápido
HPLC	= cromatografia líquida de alta eficiência
IC 95%	= intervalo de confiança 95%
IMC	=índice de massa corpórea
IV	= intravenoso
LC-MS/MS	=cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
MAO	= monoamina oxidase
MDZ	=midazolam
MS/MS	=massa/massa
MRM	<i>Multiple reaction Monitoring</i>
OH-OME	=hidroxiomeprazol
OME	=omeprazol
OME-S	=sulfona de omeprazol
PCR	=reação em cadeia da polimerase
<i>p.o.</i>	= <i>per oral</i>
PM	= metabolizador lento
RFLP-PCR	= <i>Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimerase Chain Reaction</i>
UM	= metabolizador ultra-rápido
UV	= ultravioleta
<i>vs</i>	= <i>versus</i>
v/v	= volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

A_e = quantidade excretada na urina

AUC = área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

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

β = constante de velocidade de eliminação

Cl/f = *clearance* total aparente

$C_{\max}$ = concentração plasmática máxima

CV = coeficiente de variação

f = biodisponibilidade

h = horas

K_a = constante de velocidade de absorção

K_{el} = constante de velocidade de eliminação total

t = tempo

$t_{1/2}$ = meia-vida

$t_{1/2 a}$ = meia-vida de absorção

$t_{1/2 \beta}$ = meia-vida de eliminação

$t_{\max}$ = tempo necessário para atingir a $C_{\max}$

V_d/f = volume aparente de distribuição

λ = comprimento de onda

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Introdução.....	1
Capítulo 1.....	5
1 Introdução.....	6
2 Objetivos.....	8
3 Casuística e métodos.....	8
3.1 Soluções padrão e reagentes.....	8
3.2 Análise cromatográfica.....	9
3.3 Método de preparo das amostras.....	10
3.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do CITA e do DCITA.....	10
3.5 Validação.....	11
3.6 Protocolo clínico e experimental.....	12
3.7 Análise farmacocinética e estatística.....	13
4 Resultados.....	14
5 Discussão.....	23
Capítulo 2.....	27
1 Introdução.....	28
2 Objetivos.....	32
3 Material e métodos.....	32
3.1 Protocolo experimental.....	32
3.1.1 Grupo controle.....	32
3.1.2 Grupo quinidina.....	32
3.1.3 Grupo fluvoxamina.....	33
3.1.4 Grupo cetoconazol.....	33
3.2 Métodos.....	33
3.2.1 Análise enantiosseletiva do CITA e do DCITA.....	33
3.3 Análise farmacocinética e estatística.....	34
4 Resultados.....	35
4.1 Grupo controle.....	35
4.2 Grupo quinidina.....	37

4.3 Grupo fluvoxamina.....	39
4.4 Grupo cetoconazol.....	41
4.5 Avaliação do efeito inibitório da quinidina, fluvoxamina e do cetoconazol no metabolismo enantiosseletivo do CITA em ratos.....	43
5 Discussão.....	46
Capítulo 3.....	51
1 Introdução.....	52
2 Objetivos.....	61
3 Casuística e métodos.....	61
3.1 Casuística e protocolo clínico.....	61
3.2 Métodos.....	63
3.2.1 Análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma.....	63
3.2.1.1 Soluções padrão e reagentes.....	63
3.2.1.2 Análise cromatográfica.....	63
3.2.1.3 Método de preparo das amostras.....	64
3.2.1.4 Validação.....	65
3.2.2 Análise do midazolam em plasma.....	66
3.2.3 Análise da debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina em urina.....	67
3.3 Análise farmacocinética e estatística.....	68
4 Resultados.....	69
4.1 Análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma.....	69
4.2 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP2C19 utilizando o omeprazol como fármaco marcador.....	72
4.3 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP3A utilizando o omeprazol e o midazolam como fármacos marcadores.....	73
4.4 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do CYP2D6 utilizando a debrisoquina como fármaco marcador.....	75
5 Discussão.....	75
Capítulo 4.....	80
1 Introdução.....	81
2 Objetivos.....	86
3 Casuística e métodos.....	86
3.1 Casuística e protocolo clínico.....	86
3.2 Métodos.....	87
3.2.1 Análise enantiosseletiva do CITA e do DCITA.....	87

3.2.2 Análise farmacocinética e estatística.....	88
4 Resultados.....	89
4.1 Estudo clínico – Fase I.....	89
4.2 Estudo clínico – Fase II.....	92
4.2 Estudo clínico – Fase I <i>versus</i> Fase II.....	94
5 Discussão.....	101
Conclusões.....	107
Referências Bibliográficas.....	110
Anexos.....	126

Introdução

INTRODUÇÃO

A estereoquímica está presente em várias áreas da farmacoterapia com importância crescente no tratamento das doenças mentais, especialmente na depressão. Os antidepressivos estão disponíveis para uso clínico como misturas racêmicas (mirtazapina, mianserina, trimipramina), como enantiômeros puros (paroxetina, sertralina) ou como compostos não quirais metabolizados a produtos quirais (amitriptilina). O processo conhecido como *chiral switching* onde fármacos introduzidos na terapêutica como racematos são substituídos por enantiômeros puros é crescente na terapêutica de doenças psiquiátricas (BAUMANN et al., 2002).

A farmacocinética pode ser influenciada pela enantiosseletividade observada na interação do fármaco com macromoléculas biológicas quirais, tais como na absorção dependente de carreadores, na ligação às proteínas plasmáticas, nos processos de secreção biliar, excreção renal e no metabolismo. Do conhecimento até então existente, o metabolismo é o processo que apresenta maior grau de enantiosseletividade na disposição de fármacos quirais (KROEMER et al., 1996; NATION, 1994; TUCKER & LENNARD, 1990).

A identificação dos fatores responsáveis por concentrações plasmáticas com razões enantioméricas diferentes da unidade contribui na definição das origens de variabilidade individual na resposta aos fármacos empregados na terapêutica. A variabilidade interindividual no metabolismo de fármacos ocorre principalmente devido ao polimorfismo genético, estados fisiológicos, estados patológicos, fatores ambientais e na associação de fármacos com ênfase na indução ou inibição enzimática (BAUMANN et al., 2002; INGELMAN-SUNDBERG et al., 1999; EVANS et al., 1988).

Esse estudo avalia alterações no metabolismo do citalopram (CITA), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, utilizado no tratamento da depressão. O CITA apresenta um centro quiral e é comercializado na forma de mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(S) e (-)-(R)-CITA ou como enantiômero puro [(+)-

(S)-CITA]. O estudo foi dividido em quatro capítulos, os quais incluem métodos analíticos e o estudo clínico e experimental de interação dos enantiômeros do CITA com inibidores das principais enzimas envolvidas no seu metabolismo.

O Capítulo 1 apresenta o desenvolvimento do método para a análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA em plasma humano e de rato, utilizando o sistema LC-MS/MS. O método foi aplicado nos estudos de disposição cinética e metabolismo do CITA em um voluntário sadio e em ratos Wistar.

O Capítulo 2 apresenta o estudo experimental utilizando a quinidina, fluvoxamina e cetoconazol como inibidores, respectivamente, do CYP2D, CYP2C e do CYP3A. Nesse estudo, os animais foram divididos em quatro grupos. No grupo controle, os animais receberam por gavagem dose única de CITA, nos grupos quinidina, fluvoxamina e cetoconazol, os animais receberam doses únicas de cada inibidor por via intraperitoneal e posteriormente receberam por gavagem dose única de CITA. A disposição cinética do CITA foi determinada nos diferentes grupos com a finalidade de investigar alterações no metabolismo enantiosseletivo do CITA administrado a ratos na ausência e presença dos inibidores.

O Capítulo 3 avalia a atividade das principais enzimas envolvidas no metabolismo do CITA em humanos. A determinação do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina e tipo omeprazol foi avaliada para a determinação da atividade *in vivo*, respectivamente, do CYP2D6 e CYP2C19. A atividade *in vivo* do CYP3A foi avaliada utilizando o midazolam e o omeprazol como fármacos marcadores. A análise da debrisoquina e do metabólito 4-hidroxidebrisoquina em urina e a análise do midazolam em plasma foram realizadas por metodologias anteriormente desenvolvidas pelo grupo, enquanto a análise do omeprazol e dos seus metabólitos hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol foi realizada utilizando-se o sistema LC-MS/MS, cuja validação também está apresentada nesse capítulo.

O Capítulo 4 apresenta o estudo clínico de interação entre o omeprazol, um inibidor do CYP2C19, e os enantiômeros do CITA. Foram incluídos na investigação

voluntários sadios brasileiros, auto reportados como brancos, fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 e CYP2C19 e com atividade normal do CYP3A.

Capítulo 1

*Análise enantiosseletiva do citalopram e do
desmetilcitalopram em plasma humano e de rato
empregando LC-MS/MS*

1 INTRODUÇÃO

O citalopram (CITA) é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (5-HT), utilizado no tratamento da depressão. Possui pouca afinidade pelos receptores histaminérgicos, muscarínicos e adrenérgicos, resultando em menor incidência de efeitos anticolinérgicos em comparação aos antidepressivos convencionais. É comercializado na forma de mistura racêmica ou como enantiômero puro. A ação antidepressiva está relacionada ao enantiômero (+)-(S)-CITA e ao metabólito (+)-(S)-desmetilcitalopram (DCITA). O (-)-(R)-CITA e seu metabólito (-)-(R)-DCITA são relativamente fracos inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Estudos *in vitro* sugerem que o enantiômero (+)-(S) seja duas vezes mais potente que a mistura racêmica e 100 vezes mais potente que o antípoda (-)-(R)-CITA como inibidor da recaptação de 5-HT (BAUMANN et al., 2002; MOLTKE et al., 2001; ZHENG et al., 2000; OLESEN & LINNET, 1999).

A concentração plasmática máxima (C_{max}) do CITA ocorre entre 1-4 h após a administração de dose única de 40 mg a voluntários sadios. A biodisponibilidade oral é alta, com valores de aproximadamente 80 %. O volume de distribuição (V_d/F) é de 1,2-1,6 L e a ligação do CITA e dos seus metabólitos às proteínas plasmáticas é em torno de 50-80 %. O CYP2C19, o CYP2D6 e o CYP3A4 estão envolvidos na desmetilação do CITA com metabolismo preferencial do enantiômero (+)-(S)-CITA. Os principais metabólitos formados são o DCITA e o didesmetilcitalopram (DDCITA) (BAUMANN et al., 2002; SPIGSET et al., 2000).

Estudos em voluntários sadios, fenotipados como metabolizadores extensivos da esparteína e mefenitoína (substratos para o CYP2D6 e CYP2C19, respectivamente), tratados com dose única de 40 mg de CITA racêmico mostram que o enantiômero (+)-(S)-CITA e seus metabólitos [(+)-(S)-DCITA e (+)-(S)-DDCITA] são eliminados mais rapidamente que seus antípodas. As meias-vidas de eliminação ($t_{1/2\beta}$) do (+)-(S)-CITA, (+)-(S)-DCITA e (+)-(S)-DDCITA são de 31, 42 e 60 h, respectivamente, enquanto para o (-)-(R)-CITA, (-)-(R)-DCITA e (-)-(R)-

DDCITA são reportados valores de 47, 65 e 102 h. A razão enantiomérica S/R relativa à área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ($AUC^{0-\infty}$) para o CITA e seus metabólitos é menor que a unidade em voluntários sadios, com valores de 0,59; 0,74 e 0,48 para o CITA, o DCITA e o DDCITA, respectivamente. A maior razão para o DCITA pode indicar uma menor influência da estereosseletividade para este metabólito ou uma menor razão de desmetilação do (-)-(R)-CITA em relação ao (+)-(S)-CITA (SHIDU et al., 1997).

As razões S/R de concentrações plasmáticas de CITA e DCITA, na administração de CITA racêmico a ratos por meio de bomba osmótica (10 mg/Kg/dia durante 14 dias), foram de 0,94 e 0,36, respectivamente (WIKELL et al., 1999). Kugelberg et al. (2001) reportam que ratos tratados com doses múltiplas de 10, 20 e 100 mg/Kg/dia de CITA durante 10 dias, apresentaram razões S/R de concentrações plasmáticas de 0,94; 0,83 e 0,34 para o CITA e 0,85; 0,37 e 0,36 para o DCITA, respectivamente, sugerindo que o aumento da dose reduz as razões S/R do CITA e DCITA. Kugelberg et al. (2003) relatam enantiosseletividade no metabolismo do CITA na situação de administração de dose única de 20 e 100 mg/Kg por via sub-cutânea a ratos. Os autores referem razões S/R de concentrações plasmáticas de CITA de 0,7 após 10 h e de 0,6 após 20 h da administração do antidepressivo racêmico.

A análise enantiosseletiva do CITA e dos seus metabólitos em plasma tem sido reportada com o emprego de HPLC com detecção por UV ou fluorescência e por eletroforese capilar (ANDERSEN et al., 2003; MANDRIOLI et al., 2003; ZHENG et al., 2000; KOSEL et al., 1998; HAUP, 1996; ROCHAT et al., 1995a e 1995b). Os sistemas LC-MS e LC-MS/MS têm sido descritos para a análise do CITA e/ou dos seus metabólitos em plasma e urina somente como mistura enantiomérica ou em situação de administração do CITA como enantiômero puro (PISTOS et al., 2004; SINGH et al., 2004; IDBORG et al., 2004; IDBORG-BJÖRKMAN et al., 2003; DALGAARD & LARSEN, 1999).

O presente estudo reporta pela primeira vez a análise enantiosseletiva do CITA e do seu metabólito DCITA em plasma de ratos e de voluntários sadios tratados com dose única de CITA racêmico empregando LC-MS/MS com coluna de fase quiral.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar método de análise enantiosseletiva do CITA e do DCITA em plasma humano e de ratos com aplicação em estudos de farmacocinética.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Soluções padrão e reagentes

As soluções estoque de CITA (bromidrato de citalopram, Tocris, Ellisville, EUA) e DCITA (cloridrato de desmetilcitalopram, H. Lundbeck A/S, Dinamarca) racêmicos foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. Posteriormente, cada solução foi diluída para obtenção das concentrações de 8; 80; 320; 800; 1600 e 4000 ng/mL de metanol para a análise em plasma de rato e nas concentrações de 8; 20; 40; 80 e 200 ng/mL de metanol para a análise em plasma humano.

A solução de pindolol (padrão interno - PI, Novartis, Suíça) foi preparada na concentração de 5 µg/mL de metanol.

Os solventes utilizados no preparo das soluções, processo de extração do CITA e DCITA e os constituintes da fase móvel do sistema HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) como grau cromatografia. A água passou pelo processo de purificação através do sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2 Análise Cromatográfica

O sistema HPLC foi constituído por cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por bomba modelo LC-10 AD e forno modelo CTO-10 AS. Os enantiômeros do CITA e do DCITA foram resolvidos na coluna quiral Chiralcel[®] OD-R, partículas de 10 µm, 250 x 4,6 mm (Chiral Technologies Inc, Exton, PA, EUA) com pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-8, partículas de 5 µm, 4 x 4 mm (Merck, Damstadt, Alemanha). A eluição dos enantiômeros na coluna Chiralcel[®] OD-R foi obtida com fase móvel constituída por acetonitrila, metanol e água (30:30:40 v/v/v) contendo 0,05 % de dietilamina com vazão de 0,5 mL/min. A coluna foi mantida na temperatura de 24 ± 1°C.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS) utilizado na análise do CITA e DCITA foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface de *electrospray* (ESI). As análises foram executadas no modo positivo.

A voltagem do capilar no ESI foi de 3 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120°C e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 365 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2,1 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 30 V para o CITA e para o PI e 35 V para o DCITA. A energia de colisão foi de 25 eV para o CITA e DCITA e 15 eV para o PI.

As condições de optimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções-padrão (10 µg/mL de metanol) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 20 µL/min. As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons-produtos foram monitorados nas transições: 325,3 > 310,9 para o CITA, 311,4 > 108,7 para o DCITA e 249,1 > 172,2 para o PI. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx, versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.3 Método de preparo das amostras

As amostras de plasma branco de voluntários sadios (não tratados com CITA) foram obtidas do Hemocentro do HCFMRP-USP e as amostras de plasma branco de ratos foram obtidas por decaptação dos animais não tratados com CITA (Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto).

Na análise do CITA e do DCITA, aliquotas de 1 mL de plasma humano ou de ratos foram adicionadas de 25 µL da solução de PI, 100 µL de hidróxido de sódio 1M, 200 mg de cloreto de sódio e 5 mL de tolueno: álcool isoamílico (9:1, v/v). As amostras foram extraídas em agitador horizontal (agitador de mesa reciprocante modelo MA 139/ CFT da Marconi) durante 30 min e centrifugadas a 2000 g durante 10 min (centrífuga refrigerada Beckman modelo TJ-6, 6000g). As fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo (RCT90 e modo RC10.22) da Jouan AS (St. Herblain, França), à temperatura de 25°C. Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel e 100 µL de hexano, agitados por 30 s (agitador de tubos Phoenix modelo AP-56), centrifugados por 1 min e 60 µL da fase aquosa foram injetados na coluna cromatográfica. O processo de injeção das amostras foi realizado no injetor automático modelo SIL-10AD VP da Shimadzu (Kyoto, Japão) com temperatura mantida a 5°C. Todos os procedimentos analíticos foram realizados sob luz amarela devido a fotossensibilidade do CITA e do DCITA relatada pelo fabricante (H. Lundbeck A/S).

3.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do CITA e do DCITA

Uma alíquota de 25 µL de solução de CITA e DCITA (4 µg/mL de metanol) foi evaporada a secura em temperatura ambiente. O resíduo foi retomado com 100 µL da fase móvel constituída por acetonitrila, metanol e água (30:30:40 v/v/v) contendo 0,05 % de dietilamina, dos quais 20 µL foram submetidos à análise cromatográfica em coluna Chiralcel® OD-R e detecção UV em 240 nm. Foram coletadas frações do eluato correspondentes aos enantiômeros separados que, posteriormente, foram

extraídos de acordo com o método descrito no preparo das amostras. Após a secagem, os resíduos foram submetidos à análise cromatográfica descrita por Kosel et al. (1998), utilizando a coluna Chirobiotic® V, e fase móvel composta por metanol, ácido acético e trietilamina (99,9:0,055:0,06 v/v/v).

3.5 Validação

Os métodos desenvolvidos para a análise enantiosseletiva do CITA e do DCITA em plasma humano e de rato foram validados de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução nº 899, 2003, acesso em 16/09/2004) para a análise em fluidos biológicos.

As curvas de calibração foram realizadas em duplicatas utilizando alíquotas de 1 mL de plasma humano ou de rato enriquecidas com 25 µL da solução padrão de CITA e DCITA e 25 µL da solução de PI, sendo submetidas aos processos de extração especificados anteriormente. As curvas de calibração foram construídas no intervalo de 0,1 a 20,0 ng de cada enantiômero do CITA e DCITA por mL de plasma humano e 0,1 a 500,0 ng de cada enantiômero do CITA e DCITA por mL de plasma de rato. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das áreas dos picos plotadas em função das respectivas concentrações.

A recuperação do CITA e do DCITA foi avaliada, em triplicata, nas concentrações de 0,5; 2 e 10 ng de cada enantiômero por mL de plasma humano e 5; 50 e 500 ng de cada enantiômero por mL de plasma de rato, seguindo o protocolo descrito no preparo das amostras. As concentrações dessas amostras foram determinadas a partir das áreas dos picos das soluções padrão não submetidas aos processos de extração, preparadas em duplicata para cada concentração.

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração quantificada de cada enantiômero com precisão e exatidão igual ou inferior a 20 %. Foram avaliadas quintuplicatas de amostras de plasma enriquecidas com CITA e DCITA na concentração de 0,1 ng de cada enantiômero por mL de plasma.

A linearidade foi definida como a maior concentração plasmática que apresentou relação linear com a resposta do detector. Foram avaliadas amostras, em duplicata, enriquecidas com concentrações crescentes àquelas empregadas na curva de calibração.

A precisão e a exatidão foram avaliadas nas concentrações de 1 e 10 ng de cada enantiômero por mL de plasma humano e de 5 e 500 ng de cada enantiômero por mL de plasma de rato. As soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20°C e sob a proteção da luz até a análise.

Para a avaliação da precisão intra-ensaio foram analisadas 10 alíquotas de cada amostra através de uma única curva de calibração e na avaliação da precisão interensaios foram analisadas alíquotas, em duplicata, das amostras durante 5 dias consecutivos.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, amostras de plasma enriquecidas (1 e 10 ng/mL de plasma humano e 5 e 500 ng por mL de plasma de rato), em triplicata, foram congeladas a -20°C e após 24 h foram descongeladas e novamente congeladas por 24 h. Este ciclo foi repetido por mais duas vezes, analisando-se os fármacos após o término do terceiro ciclo. A estabilidade das amostras de plasma enriquecidas também foi determinada após a manutenção durante 12 h em temperatura ambiente de 25°C . Os resultados dos testes de estabilidade foram comparados com os resultados de amostras recém preparadas e analisados pelo teste t de Student, $P < 0,05$.

3.6 Protocolo Clínico e Experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo A). O voluntário recebeu explicação detalhada dos procedimentos e foi incluído no estudo após a obtenção por escrito do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). O voluntário, em jejum de 12 h, recebeu dose única de 20

mg de CITA racêmico (Cipramil[®], Schering-Plough, Brasil) com 200 mL de água. Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue, a partir de um cateter inserido na veia antecubital e mantido com heparina, nos tempos zero, 1; 1,5; 2,5; 4; 6; 8; 12; 48; 72; 96; 120; 144; 168; 192; 216 e 240 h após a administração do fármaco.

O estudo realizado com animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto-USP (Anexo C). Foram utilizados ratos machos Wistar pesando 200 ± 20 g. Os animais provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto foram adaptados no Biotério Institucional em sala com temperatura (21-23 °C) e umidade (40-60 %) controladas e ciclo claro-escuro de 12 h durante três dias antes do início do experimento. Os animais permaneceram com livre acesso à ração e água.

Os animais em jejum de 12 h (n = 6 por tempo de colheita) receberam por via oral (gavagem) CITA racêmico dissolvido em água na dose de 20 mg/Kg. As amostras de sangue (5 mL) foram colhidas por decaptação dos animais nos tempos zero, 15; 30; 45 e 60 min e 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 20 h após a administração do CITA.

Em todas as amostras, a heparina (Liquemine[®] 5000 UI, Roche) foi empregada como anticoagulante e os plasmas obtidos após a centrifugação foram armazenados a -70 °C até a análise.

3.7 Análise farmacocinética e estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática dos enantiômeros *versus* tempo. Foi empregado o programa WinNonlin, versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA). Os cálculos foram realizados empregando cinética de primeira ordem, modelo monocompartimental e sem *lag time*.

Os testes estatísticos para a análise dos dados experimentais foram realizados com auxílio do software Graphpad Instat[®] para obtenção da média, mediana e

intervalo de confiança (IC) de 95%. Foi utilizado teste não paramétrico para dados pareados (comparação entre os enantiômeros) com nível de significância estabelecido para $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

A Figura 1.1 apresenta os cromatogramas referentes a separação dos enantiômeros do CITA e do DCITA em plasma humano e de ratos, utilizando a coluna Chiralcel[®] OD-R e a Figura 1.2 apresenta o cromatograma referente a separação dos enantiômeros do CITA e do DCITA utilizando a coluna Chirobiotic[®] V.

Figura 1.2: Cromatogramas referentes ao CITA e DCITA - Coluna Chirobiotic V e Fase móvel constituída por metanol: ácido acético: trietilamina (99,9:0,055:0,06 v/v/v). Picos: (1) Pindolol, (2) (-)-(R)-DCITA, (3) (-)-(R)-CITA, (4) (+)-(S)-CITA, (5) (+)-(S)-DCITA.

As Tabelas 1.1 e 1.2 apresentam os limites de confiança dos métodos de análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA em plasma humano e de rato, respectivamente.

Tabela 1.1: Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA em plasma humano.

	(-)-R-CITA	(+)-S-CITA	(-)-R-DCITA	(+)-S-DCITA
Recuperação (%)				
1 ng/mL	94,0	86,0	96,0	93,0
5 ng/mL	87,5	88,0	73,1	72,9
10 ng/mL	102,0	100,7	84,8	82,8
Linearidade (ng/mL)	0,1 - 20	0,1 - 20	0,1 - 20	0,1 - 20
r	0,99245	0,99049	0,99631	0,99481
Limite de quantificação (ng/mL)	0,1	0,1	0,1	0,1
Precisão (n = 5, CV %)	7,47	6,43	10,71	8,83
Exatidão (% inexatidão)	12,00	10,00	4,00	7,00
Precisão Interensaios (n = 5, CV %)				
1 ng/mL	9,43	6,59	10,81	10,17
10 ng/mL	8,81	14,39	8,51	9,43
Precisão Intra-ensaio (CV %)				
1 ng/mL (n = 10)	10,47	9,90	10,91	10,48
10 ng/mL (n = 10)	8,07	9,41	3,50	5,55
Exatidão Interensaios (% inexatidão)				
1 ng/mL (n = 5)	-2,90	3,20	3,00	2,00
10 ng/mL (n = 5)	-1,70	-5,70	-2,90	0,10
Exatidão Intra-ensaio (% inexatidão)				
1 ng/mL (n = 10)	-4,40	-1,40	5,20	0,50
10 ng/mL (n = 10)	4,50	-2,00	6,34	7,76
Estabilidade (P*)				
3 Ciclos de descongelamento (-20 a 25°C)				
1 ng/mL	0,2575	0,9825	0,0775	0,0711
10 ng/mL	0,0725	0,1291	0,4712	0,1671
Temperatura ambiente (12 h)				
1 ng/mL	0,3275	0,6039	0,7318	0,3624
10 ng/mL	0,2497	0,0950	0,0712	0,0967

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

Tabela 1.2: Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA em plasma de rato.

	R-(-)-CITA	S-(+)-CITA	R-(-)-DCITA	S-(+)-DCITA
Recuperação (%)				
5 ng/mL	89,4	86,6	99,1	85,4
50 ng/mL	78,1	87,1	88,3	80,0
500 ng/mL	101,5	95,8	93,9	71,6
Linearidade (ng/mL)	0,1 - 500	0,1 - 500	0,1 - 500	0,1 - 500
r	0,99996	0,99845	0,99400	0,99313
Limite de Quantificação (ng/mL)	0,1	0,1	0,1	0,1
Precisão (n = 5, CV %)	7,5	15,8	15,8	4,0
Exatidão (% inexatidão)	12,0	0,1	0,1	12,0
Precisão Interensaios (n = 5, CV %)				
5 ng/mL	11,1	11,3	5,9	5,4
500 ng/mL	11,9	10,9	9,0	10,1
Precisão Intra-ensaio (CV %)				
5 ng/mL (n = 10)	12,7	12,7	3,8	5,2
500 ng/mL (n = 10)	10,3	10,0	7,8	7,0
Exatidão Interensaio (% inexatidão)				
5 ng/mL (n = 5)	2,3	0,7	7,1	7,3
500 ng/mL (n = 5)	-1,1	-3,1	-6,5	-8,2
Exatidão Intra-ensaio (% inexatidão)				
5 ng/mL (n = 10)	1,2	4,3	7,6	9,9
500 ng/mL (n = 10)	-1,0	-2,2	-10,9	-16,8
Estabilidade (P*)				
3 Ciclos de descongelamento (-20 a 25°C)				
5 ng/mL	0,2238	0,5565	0,3273	0,8445
500 ng/mL	0,1765	0,9702	0,0971	0,0841
Temperatura ambiente (12 h)				
5 ng/mL	0,2872	0,9792	0,0754	0,2605
500 ng/mL	0,9177	0,4228	0,0901	0,0775

*Teste t de Student, P < 0,05

A Figura 1.3 apresenta as curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros do CITA e do DCITA em um voluntário sadio após administração oral de dose única de 20 mg de CITA racêmico.

Figura 1.3: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros do CITA e do DCITA após administração oral de 20 mg de CITA racêmico em um voluntário sadio.

As Tabelas 1.3 e 1.4 apresentam, respectivamente, a disposição cinética dos enantiômeros do CITA e do DCITA em um voluntário sadio após administração de CITA racêmico.

Tabela 1.3: Disposição cinética enantiosseletiva do CITA em um voluntário sadio após administração oral de 20 mg de *rac*-CITA.

Parâmetro	(-)-R-CITA	(+)-S-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	6,81	4,89
$t_{\max}$ (h)	5,36	3,88
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,30	1,58
K_a (h^{-1})	0,53	0,44
$t_{1/2\beta}$ (h)	18,47	5,15
β (h^{-1})	0,04	0,13
Vd/f (L/Kg)	20,35	20,58
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	222,04	61,24
Cl/f (L/h/Kg)	0,76	2,77
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,28	

Tabela 1.4: Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA em um voluntário sadio após administração oral de 20 mg de *rac*-CITA.

Parâmetro	(+)-(S)-DCITA	(-)-R-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	1,85	1,11
$t_{\max}$ (h)	8,25	16,05
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	98,95	95,02
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	1,04	

A Figura 1.4 apresenta as curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros do CITA e do DCITA em ratos após administração oral de dose única de 20 mg/Kg de CITA racêmico.

Figura 1.4: Curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos enantiômeros do CITA e do DCITA após administração oral de 20 mg/Kg de CITA racêmico em ratos. Dados apresentados como mediana (n = 6/tempo de colheita).

As Tabelas 1.5 e 1.6 apresentam, respectivamente, a disposição cinética dos enantiômeros do CITA e do DCITA em ratos após administração de CITA racêmico.

Tabela 1.5: Disposição cinética enantiosseletiva do CITA em ratos tratados com *rac*-CITA. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %).

Parâmetro	(-)-R-CITA	(+)-S-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	152,11* 157,65 (88,90 – 226,39)	62,33 70,75 (47,52 – 93,99)
$t_{\max}$ (h)	1,06 0,93 (0,29 – 1,56)	0,78 0,73 (0,17 – 1,29)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,37 0,35 (0,03 – 0,67)	0,20 0,22 (0,003 – 0,44)
K_a (h^{-1})	2,48 9,15 (5,02 – 23,31)	4,93 15,46 (4,61 – 35,53)
$t_{1/2\beta}$ (h)	2,09 2,43 (1,39 – 3,47)	2,38 2,32 (2,07 – 2,58)
β (h^{-1})	0,34 0,32 (0,22 – 0,41)	0,29 0,30 (0,27 – 0,33)
Vd/f (L/Kg)	49,75* 56,11 (23,13 – 89,09)	119,90 118,41 (96,48 – 140,35)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	601,91* 611,75 (420,97 – 808,03)	255,13 290,01 (228,51 – 351,51)
Cl/f (L/h/Kg)	16,94* 17,07 (12,38 – 23,75)	39,15 35,47 (29,25 – 41,69)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,40 0,40 (0,24 – 0,59)	

*P < 0,05, teste de Wilcoxon

Tabela 1.6: Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA em ratos tratados com *rac*-CITA. Dados apresentados como mediana, média e IC 95 %.

Parâmetro	(-)-R-DCITA	(+)-S-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	59,66* 88,61 (27,12 – 150,09)	35,97 47,38 (8,50 – 92,10)
$t_{\max}$ (h)	2,28 2,01 (1,05 – 2,96)	1,27 1,48 (0,61 – 2,36)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	505,77* 696,47 (179,91 – 1213,00)	260,87 294,55 (126,32 – 462,78)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,48 0,45 (0,36 – 0,54)	

*P < 0,05, teste de Wilcoxon

5 DISCUSSÃO

A resolução dos enantiômeros do CITA e do DCITA foi avaliada em diferentes colunas de fases quirais (Chiralcel[®] OD-R 250 x 4,6 mm, OB-H 150 x 4,6 mm e OD-H 250 x 4,6 mm, Chiralpak[®] AS e AD 250 x 4,6 mm, Phenomenex[®] Chirex 3005 250 x 4,6 mm e Chiral-AGP[®] 150 x 4,0 mm). A separação direta dos enantiômeros do CITA e dos enantiômeros do metabólito DCITA foi obtida nas colunas Chiralcel[®] OD-R e Chirobiotic[®] V. Os enantiômeros foram eluídos da coluna Chiralcel[®] OD-R com fase móvel constituída por acetonitrila, metanol e água (30:30:40 v/v/v) contendo 0,05 % de dietilamina em uma corrida de aproximadamente 38 min (Figura 1.1). Por outro lado, os enantiômeros mostraram melhor resolução e menor tempo de análise (12 min) na coluna Chirobiotic[®] V com fase móvel constituída por metanol, ácido acético e trietilamina (99,9:0,06:0,055) (KOSEL et al., 1998) (Figura 1.2). No entanto, a análise dos íons monitorados no detector MS/MS apresentou sensibilidade compatível com a aplicação em farmacocinética somente nas condições determinadas com a coluna Chiralcel[®] OD-R. Os resultados sugerem que a presença de trietilamina na fase móvel da coluna Chirobiotic[®] V resulta em perda significativa da sensibilidade no detector MS/MS.

A análise do plasma branco de voluntários sadios e do plasma branco de ratos não evidencia interferências dos componentes endógenos com os enantiômeros do CITA e do DCITA (Figura 1.1 A e D). O estudo da recuperação (Tabelas 1.1 e 1.2) mostra valores maiores que 70 % e independentes das concentrações para os enantiômeros do CITA e do DCITA extraídos do plasma em pH 9,0 com a mistura tolueno:álcool isoamílico (9:1). Os valores de recuperação são equivalentes àqueles observados nos estudos de Rochat et al. (1995 a/b), Zheng et al. (2000) e Kosel et al. (1998) que relatam valores entre 63 e 98 %, utilizando a mistura heptano:álcool isoamílico e no estudo de Carlsson et al. (2001) com valores de 87 a 110 % utilizando extração em fase sólida.

A análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA foi realizada no sistema LC-MS/MS no modo MRM, onde os íons protonados e os seus respectivos íons-produto foram monitorados nas transições $325,3 > 310,9$ para o CITA, $311,4 > 108,7$ para o DCITA e $249,1 > 172,2$ para o PI. Esses dados são compatíveis com os estudos encontrados na literatura relacionados à análise da mistura enantiomérica ou a análise do escitalopram (PISTOS et al., 2004; SINGH et al., 2004; IDBORG et al., 2004; IDBORG-BJÖRKMAN et al., 2003; DALGAARD & LARSEN, 1999).

O teste de racemização realizado anteriormente a validação do método analítico não demonstra inversão quiral. O teste foi realizado após a coleta dos enantiômeros individuais e extração de amostras de plasma branco enriquecidas.

O método desenvolvido no sistema LC-MS/MS permitiu a obtenção de LQ de 0,1 ng de cada enantiômero do CITA e DCITA por mL de plasma humano e de rato, permitindo inferir o método como mais sensível que aqueles reportados na literatura, cujos valores do LQ variam de 0,5 a 15 e 0,62 a 11 ng/mL de plasma para cada enantiômero do CITA e do DCITA, respectivamente (PISTOS et al., 2004; ANDERSEN et al., 2003; CARLSSON et al., 2001; ZHENG et al., 2000; KOSEL et al., 1998; HAUP, 1996; ROCHAT et al., 1995a e 1995b). Deve-se ressaltar que no estudo clínico foram encontradas concentrações de 0,2 ng/mL de plasma do (-)-(R)-CITA e de 0,1 ng/mL de plasma dos enantiômeros do DCITA após, respectivamente, 144 h e 216 h da administração do fármaco (Figura 1.3).

Os estudos de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e % de inexatidão menores que 15 %, indicando o método como preciso e exato. A avaliação da estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento e estocagem à temperatura ambiente apresentou valores de P maiores que 0,05 (teste t de Student), garantindo a estabilidade das amostras armazenadas a -20°C (Tabelas 1.1 e 1.2).

O método desenvolvido e validado foi empregado na investigação da enantiosseletividade na disposição cinética do CITA administrado na forma de mistura racêmica, em dose única a um voluntário sadio e a ratos Wistar ($n = 6$ para cada tempo de colheita).

No estudo clínico pode-se observar enantiosseletividade na farmacocinética do CITA com observação de maior proporção plasmática do enantiômero (-)-(R) (Figura 1.3). A razão de $AUC_{S/R}$ obtida para o CITA foi de 0,28 (Tabela 1.3), sendo esse dado compatível aos dados observados por Carlsson et al. (2001) e por Herrlin et al. (2003) que relatam, respectivamente, razões S/R de 0,59 e 0,61 para o CITA. A razão de $AUC_{S/R}$ obtida para o metabólito DCITA foi de aproximadamente 1, com sugestão de ausência de enantiosseletividade (Figura 1.3 e Tabela 1.4). Carlsson et al. (2001) e Herrlin et al. (2003) relatam razões da $AUC_{S/R}$ de 0,82 e 0,89, respectivamente, para o metabólito DCITA.

Os parâmetros farmacocinéticos do CITA obtidos para os ratos Wistar ($n = 6$ por tempo de colheita) evidenciam maior proporção plasmática do enantiômero (-)-(R) do que seu antípoda (+)-(S) (Figura 1.4), apresentando diferenças significativas nos parâmetros C_{max} , $AUC^{0-\infty}$, Cl/f e Vd/f (Tabela 1.5). Ressalta-se que no estudo clínico também foi observado maior proporção plasmática do distômero (-)-(R)-CITA. A razão $AUC_{S/R}$ para o CITA em ratos foi de 0,40. Esse acúmulo plasmático também foi evidenciado nos estudos de Wikell et al. (1999) e Kugelberg et al. (2001) que relatam razões S/R de concentrações plasmáticas do CITA administrado a ratos em dose múltipla de 10, 20 ou 100 mg/Kg/dia durante 10 dias de 0,94; 0,83 e 0,34, respectivamente. Ressalta-se que em ambos os estudos, o CITA foi administrado através de bomba osmótica, portanto, com processo de absorção destituído de eliminação pré-sistêmica. Kugelberg et al. (2003) observaram enantiosseletividade no metabolismo do CITA na situação de administração de dose única de 20 e de 100 mg/Kg por via subcutânea a ratos. Os autores referem razões S/R de concentrações plasmáticas do CITA de aproximadamente 0,6 após 20 h da

administração do fármaco. A razão S/R de concentrações plasmáticas do DCITA em ratos foi de 0,48 (Tabela 1.6), indicando formação preferencial do (-)-R (Figura 1.4). A mesma observação foi relatada por Kugelberg et al. (2001) e Wikell et al. (1999) com observação de razões S/R do DCITA de 0,37 e 0,31, respectivamente.

Concluindo, os limites de confiança do método de análise dos enantiômeros (-)-(R)-CITA, (+)-(S)-CITA, (-)-(R)-DCITA e (+)-(R)-DCITA em plasma humano e plasma de rato são concordantes com a aplicação em estudo clínico de disposição cinética de dose única. Os estudos clínico e experimental demonstram enantiosseletividade na disposição cinética do CITA com maior proporção plasmática do distômero (-)-(R)-CITA.

Capítulo 2

*Influência da quinidina, fluvoxamina e cetoconazol
na farmacocinética enantiosseletiva do citalopram
administrado a ratos*

1 INTRODUÇÃO

O citalopram (CITA) é um fármaco de larga margem de segurança e com metabolismo dependente do CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A e das monoamina oxidases (MAO) e aldeído oxidases (BRØSEN & NARANJO, 2001). Os principais metabólitos formados a partir do CYP no homem e em animais de experimentação são o desmetilcitalopram (DCITA) e o didesmetilcitalopram (DDCITA) (OLESEN & LINNET, 1999; CACCIA, 1998; OVERO, 1982). Consequentemente, o CITA poderia apresentar baixo potencial de interação de relevância clínica com fármacos inibidores do metabolismo. No entanto, a ação antidepressiva do CITA está relacionada ao enantiômero (+)-(S)- e ao seu metabólito ativo (+)-(S)-DCITA (BAUMANN et al., 2002; MOLTKE et al., 2001; HYTTEL et al., 1992). Sánchez et al. (2003) relatam ainda que o enantiômero (-)-(R)-CITA inibe o efeito ansiolítico do (+)-(S)-CITA em ratos. O metabolismo do CITA é enantiosseletivo em ratos e em voluntários sadios, o enantiômero (+)-(S)-CITA e seus metabólitos [(+)-(S)-DCITA e (+)-(S)-DDCITA] são eliminados mais rapidamente que seus antípodas (SHIDU et al., 1997; KUGELBERG et al., 2003). Esses dados sugerem que inibidores do CYP poderiam aumentar preferencialmente as concentrações plasmáticas do eutômero (+)-(S)-CITA com possível relevância clínica.

O CITA é eliminado mais rapidamente em macacos, cães, camundongos e ratos que em humanos, com meias-vidas de eliminação de 3; 3,5 a 8; 1,5; 3 e 33 h, respectivamente. Os valores de *clearance* total do CITA, relatados para os animais citados anteriormente, são respectivamente, de 105; 118; 150 e 173 mL/min/Kg, enquanto humanos apresentam *clearance* de 5 mL/min/Kg. Essas diferenças provavelmente ocorrem devido às variações na atividade metabólica entre as espécies avaliadas (OVERO, 1982).

Os valores de volume de distribuição (Vd/f) do CITA são de 10, 11, 13 e 21 L/Kg, respectivamente para macacos, cães, camundongos e ratos (OVERO, 1982). Melzacka et al. (1984) relatam que a administração prolongada de CITA em ratos resulta no aumento das concentrações plasmáticas no soro, no líquido e no cérebro com evidência de redução na velocidade de eliminação do CITA de todos os tecidos investigados. Kugelberg et al. (2004) reportam que após a morte ocorre aumento das concentrações dos enantiômeros do CITA, DCITA e do DDCITA no sangue presente na cavidade cardíaca de ratos tratados com CITA racêmico. Os animais apresentaram valores semelhantes de razões S/R de concentrações plasmáticas do CITA e dos metabólitos antes e após a morte, sugerindo redistribuição não enantiosseletiva.

Estudos realizados em ratos sugerem que o (+)-(S)-CITA é metabolizado e eliminado mais rapidamente que o (-)-(R)-CITA, porém os autores relatam apenas as concentrações plasmáticas encontradas para cada enantiômero do CITA e dos metabólitos DCITA e DDCITA e as respectivas razões S/R. Kugelberg et al. (2003) reportam razões S/R do CITA de 0,91; 0,90 e 0,89 após, respectivamente 1; 3 e 10 h da administração de 10 mg/Kg de CITA racêmico pela via subcutânea, enquanto doses de 20 e 100 mg/Kg resultaram em razões S/R de 0,94 e 0,93; 0,91 e 0,87; 0,77 e 0,74; 0,60 e 0,59 respectivamente, após 1; 3; 10 e 20 h da administração do fármaco.

Wikell et al. (1999) reportam razões S/R de 0,94 e 0,36 para o CITA e o DCITA, respectivamente, após doses múltiplas de 10 mg/Kg/dia de CITA racêmico administrado através de bomba osmótica. Apelqvist et al. (2000) relatam razões S/R de 0,89 e 0,91; 0,34 e 0,47; 0,33 e 0,39, respectivamente para o CITA, DCITA e DDCITA em ratos portadores ou não de encefalopatia hepática, após tratamento com CITA racêmico na dose de 10 mg/Kg/dia. No estudo realizado por Kugelberg et al. (2001) utilizando doses múltiplas de 10, 20 ou 100 mg/Kg/dia de CITA racêmico

foram observadas razões S/R, respectivamente, de 0,94; 0,83 e 0,34 para o CITA, 0,85; 0,37 e 0,36 para o DCITA e 0,41 e 0,31 para o DDCITA.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a quinidina inibe de forma seletiva o CYP2D. Chow et al. (1999) utilizaram a quinidina como inibidor do CYP2D durante a avaliação de alterações na atividade catalítica e na expressão do CYP2D em microsomas hepáticos de rato, enquanto Kraemer et al. (2004), Di Marco et al. (2003) e Niwa et al. (2000) utilizaram a quinidina durante a avaliação *in vitro* do metabolismo do femproporex, dextrometorfano e do antiarrítmico cibenzolina, respectivamente. Law et al. (2000), no estudo para avaliar a ação do CYP2D no metabolismo da anfetamina em ratos, utilizaram quinidina na dose de 80 mg/Kg pela via intraperitoneal, 4 h antes da administração do substrato. Gram et al. (1993) relatam que a levoprometazina, outro potente inibidor do CYP2D6, não altera a farmacocinética do CITA, porém causa aumento da concentração plasmática do metabólito DCITA.

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* reportam que a fluvoxamina é um potente inibidor do CYP2C e do CYP1A em ratos e em humanos. O estudo de Hartter et al. (1995) indica que a fluvoxamina inibe a N-desmetilação, parcialmente realizada pelo CYP2C, da clomipramina em microsomas hepáticos de ratos e em pacientes tratados simultaneamente com ambos os fármacos. Daniel et al. (2001 e 1999) relatam que a fluvoxamina inibe a atividade do CYP1A em ratos machos Wistar utilizando dose de 10 mg/Kg pela via intraperitoneal. Rasmussen et al. (1998) relatam que a fluvoxamina inibe a atividade CYP2C19 em microsomas de fígado humano, enquanto o estudo de revisão realizado por Brøsen & Naranjo (2001) indica que a fluvoxamina inibe efetivamente o CYP2C19 e o CYP1A2. Esses dados são confirmados por Yao et al. (2003) a partir de estudos realizados *in vitro* com microsomas de fígado humano e estudos *in vivo* realizados em voluntários sadios. Bondolfi et al. (1996) reportam que a fluvoxamina inibe de forma enantiosseletiva o metabolismo do CITA em humanos, com observação de aumento da razão S/R de

0,48 para 0,84. Os autores sugerem que a fluvoxamina inibe mais efetivamente o metabolismo do enantiômero (+)-(S)-CITA do que o (-)-(R)-CITA. Yasui-Furukori et al. (2004) reportam que a associação da fluvoxamina com o omeprazol resulta em aumento da AUC do omeprazol somente em voluntários metabolizadores extensivos do CYP2C19, sugerindo que a fluvoxamina inibe efetivamente esta enzima.

Os estudos realizados em ratos indicam que o cetoconazol inibe o CYP3A de forma potente e seletiva. Xu et al. (2006) utilizaram o cetoconazol como inibidor do CYP3A durante a avaliação do metabolismo *in vitro* do imrecoxibe. Yuan et al. (1997) relatam esta inibição a partir da administração de cetoconazol na dose de 50 mg/Kg pela via intraperitoneal, Zhang et al. (1998) utilizaram uma dose de 30 mg/Kg pela via oral, enquanto Kageyama et al. (2005) relatam inibição efetiva do CYP3A em ratos após administração de doses de 10, 15 e 20 mg/Kg pela via endovenosa. Kanazu et al. (2005) relatam inibição do metabolismo hepático do midazolam em ratas tratadas com doses múltiplas de dexametasona, após a administração oral de dose única de 5 mg/Kg de cetoconazol. Diversos estudos relatam que o CYP3A4 participa da biotransformação do CITA, porém, Gutierrez & Abramowitz (2001) reportam que o cetoconazol não altera a farmacocinética do CITA em humanos. Gutierrez et al. (2003) também relatam que não houve interação durante a associação de CITA com o ritonavir, outro potente inibidor do CYP3A, em humanos.

Bonnabry et al. (2001) ressaltam que a meia-vida de eliminação do inibidor é um importante parâmetro. Quando o inibidor tem uma meia-vida prolongada, o potencial de inibição se manterá relativamente inalterado. A dose deste inibidor também é importante, sendo responsável pela magnitude da interação, em casos de inibição reversível, o impacto clínico está diretamente relacionado a este fator. Nestes casos, a dose máxima planejada ou a dose máxima aprovada deve ser usada em estudos clínicos, exceto em determinadas condições de segurança onde a dose é contra-indicada.

O presente estudo investiga em ratos a enantiosseletividade na disposição cinética e no metabolismo do CITA associado aos inibidores reversíveis do CYP fluvoxamina, quinidina ou cetoconazol.

2 OBJETIVOS

Avaliar a influência de inibidores reversíveis de isoformas do CYP (quinidina, fluvoxamina e cetoconazol) na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do CITA administrado a ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto – USP (CEUA – Protocolo nº 05.1.492.53.8 – Anexo C).

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando 200 ± 20 g. Os animais provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto foram adaptados no Biotério Institucional em sala com temperatura (21-23 °C) e umidade (40-60 %) controladas e ciclo claro-escuro de 12 h durante três dias antes do início do experimento. Os animais permaneceram com livre acesso à ração e água.

3.1.1 Grupo controle

Os animais em jejum de 12 h (n = 6 por tempo de colheita) receberam por via oral (gavagem) CITA racêmico dissolvido em água na dose de 20 mg/Kg (KUGELBERG et al., 2001). As amostras de sangue (5 mL) foram colhidas por decaptação dos animais nos tempos zero, 15; 30; 45 e 60 min e 1,5; 2; 4; 6; 8 e 10; 12; 16 e 20 h após a administração do CITA. A heparina (Liquemine® 5000 UI,

Roche) foi empregada como anticoagulante. As amostras de plasma obtidas após a centrifugação, foram armazenadas a -70 °C até a análise.

3.1.2 Grupo quinidina

Os animais em jejum de 12 h (n = 6 por tempo de colheita) receberam por via intraperitoneal quinidina dissolvida em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico 5 % (v/v) com pH final 4,0 na dose de 80 mg/Kg (LAW et al, 2000). Após 4 h da administração da quinidina, os animais receberam por gavagem CITA racêmico dissolvido em água na dose de 20 mg/Kg. As amostras de sangue (5 mL) foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

3.1.3 Grupo fluvoxamina

Os animais em jejum de 12 h (n = 6 por tempo de colheita) receberam por via intraperitoneal fluvoxamina dissolvida em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico 5 % (v/v) com pH final 4,0 na dose de 10 mg/Kg (DANIEL et al, 1999). Após 2 h da administração da fluvoxamina, os animais receberam por gavagem CITA racêmico dissolvido em água na dose de 20 mg/Kg. As amostras de sangue (5 mL) foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

3.1.4 Grupo cetoconazol

Os animais em jejum de 12 h (n = 6 por tempo de colheita) receberam por via intraperitoneal cetoconazol dissolvido em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico 5 % (v/v) com pH final 4,0 na dose de 50 mg/Kg (YUAN et al, 1997). Após 1 h da administração do cetoconazol, os animais receberam por gavagem CITA racêmico dissolvido em água na dose de 20 mg/Kg. As amostras de sangue (5 mL) foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise enantiosseletiva do CITA e do DCITA

A análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA foi realizada no sistema LC-MS/MS como descrito no Capítulo 1. A separação dos enantiômeros foi obtida na coluna quiral Chiralcel[®] OD-R com fase móvel constituída por acetonitrila:metanol:água (30:30:40 v/v/v) contendo 0,05 % de dietilamina. Para o preparo das amostras, alíquotas de 1mL de plasma foram alcalinizadas e adicionadas de 200 mg de cloreto de sódio e 5 mL da mistura tolueno:álcool isoamílico (9:1, v/v). Após 30 min de agitação e 10 min de centrifugação, as fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo. Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel e 100 µL de hexano e, após a centrifugação, 60 µL da fase aquosa foram submetidos a análise cromatográfica. O método foi linear no intervalo de concentrações de 0,1 – 500,0 ng de cada enantiômero do CITA e DCITA por mL de plasma. Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão e a inexatidão foram inferiores a 15 %.

3.3 Análise farmacocinética e estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática dos enantiômeros *versus* tempo. Foi empregado o programa WinNonlin, versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA), empregando cinética de primeira ordem, modelo monocompartimental e sem inclusão de *lag time*.

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software Graphpad Instat[®] para obtenção da média, mediana e IC 95%. Foi utilizado o teste de Wilcoxon, com nível de significância estabelecido para $P < 0,05$, para a comparação entre os enantiômeros do CITA e do DCITA dentro de cada grupo e o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para a comparação dos enantiômeros de CITA e do DCITA entre os diferentes grupos.

4 RESULTADOS

4.1 Grupo Controle

A Figura 2.1 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita.

Figura 2.1: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA e do DCITA *versus* tempo. Grupo controle (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do CITA e do DCITA nos animais do grupo controle tratados com CITA racêmico estão apresentados nas Tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente.

Tabela 2.1: Disposição cinética enantiosseletiva do CITA nos animais do grupo controle. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA	(+)-(S)-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	152,11* 157,65 (88,90 – 226,39)	62,33 70,75 (47,52 – 93,99)
$t_{\max}$ (h)	1,06 0,93 (0,29 – 1,56)	0,78 0,73 (0,17 – 1,29)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,37 0,35 (0,03 – 0,67)	0,20 0,22 (0,003 – 0,44)
K_a (h^{-1})	2,48 9,15 (5,02 – 23,31)	4,93 15,46 (4,61 – 35,53)
$t_{1/2\beta}$ (h)	2,09 2,43 (1,39 – 3,47)	2,38 2,32 (2,07 – 2,58)
β (h^{-1})	0,34 0,32 (0,22 – 0,41)	0,29 0,30 (0,27 – 0,33)
Vd/f (L/Kg)	49,75* 56,11 (23,13 – 89,09)	119,90 118,41 (96,48 – 140,35)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	601,91* 611,75 (420,97 – 808,03)	255,13 290,01 (228,51 – 351,51)
Cl/f (L/h/Kg)	16,94* 17,07 (12,38 – 23,75)	39,15 35,47 (29,25 – 41,69)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,40 0,40 (0,24 – 0,59)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

Tabela 2.2: Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA nos animais do grupo controle. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA	(+)-(S)-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	59,66* 88,61 (27,12 – 150,09)	35,97 47,38 (8,50 – 92,10)
$t_{\max}$ (h)	2,01 (1,05 – 2,96)	1,27

$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	505,77*	1,48 (0,61 – 2,36)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	696,47 (179,91 – 1213,00)	260,87
	0,48	294,55 (126,32 – 462,78)
	0,40 (0,34 – 0,54)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

4.2 Grupo Quinidina

A Figura 2.2 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita.

Figura 2.2: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA e do DCITA *versus* tempo. Grupo quinidina (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do CITA e do DCITA nos animais do grupo quinidina tratados com CITA estão apresentados nas Tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente.

Tabela 2.3: Disposição cinética enantiosseletiva do CITA nos animais do grupo quinidina. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA	(+)-(S)-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	207,60* 226,60 (183,15 – 270,05)	146,37 148,04 (114,60 – 181,49)
$t_{\max}$ (h)	1,16 1,18 (0,60 – 1,75)	0,80 0,81 (0,53 – 1,08)
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	0,36 0,43 (0,09 – 0,77)	0,20 0,20 (0,12 – 0,27)
K_a (h^{-1})	2,26 2,97 (0,16 – 5,77)	3,47 4,03 (1,98 – 6,08)
$t_{1/2 \beta}$ (h)	2,78 2,63 (2,06 – 3,19)	2,16 2,26 (2,01 – 2,52)
β (h^{-1})	0,25 0,28 (0,20 – 0,35)	0,33 0,31 (0,28 – 0,34)
Vd/f (L/Kg)	34,43* 35,71 (22,72 – 48,71)	60,12 63,59 (42,92 – 84,25)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	1055,30* 1125,70 (852,94 – 1398,50)	544,05 547,74 (396,43 – 699,05)
Cl/f (L/h/Kg)	9,48* 9,30 (7,00 – 11,59)	18,40 19,36 (13,87 – 24,85)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,52 0,49 (0,33 – 0,57)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

Tabela 2.4: Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA nos animais do grupo quinidina. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA	(+)-(S)-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	207,53* 189,13 (62,02 – 241,73)	125,25 121,06 (57,63 – 159,47)
$t_{\max}$ (h)	1,71 1,89 (1,05 – 2,73)	1,53 1,70 (0,86 – 2,55)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	1521,10* 1521,10*	911,73 911,73

	1587,99 (1045,10 – 2301,20)	864,92 (435,94 – 1146,30)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,49	
	0,52 (0,37 – 0,67)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

4.3 Grupo Fluvoxamina

A Figura 2.3 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita.

Figura 2.3: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA e do DCITA *versus* tempo. Grupo fluvoxamina (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do CITA e do DCITA nos animais do grupo fluvoxamina tratados com CITA estão apresentados nas Tabelas 2.5 e 2.6, respectivamente.

Tabela 2.5: Disposição cinética dos enantiômeros do CITA nos animais do grupo fluvoxamina. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n =6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA	(+)-(S)-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	174,76 173,75 (122,59 – 224,91)	129,21 135,67 (103,25 – 168,08)
$t_{\max}$ (h)	0,69 0,80 (0,38 – 1,21)	0,80 0,71 (0,42 – 1,00)
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	0,17 0,23 (0,07 – 0,39)	0,20 0,21 (0,09 – 0,33)
K_a (h^{-1})	3,78 4,87 (0,14 – 9,59)	3,57 4,94 (0,86 – 9,01)
$t_{1/2 \beta}$ (h)	1,96 2,20 (1,49 – 2,91)	1,85 2,01 (1,50 – 2,52)
β (h^{-1})	0,36 0,34 (0,25 – 0,42)	0,38 0,36 (0,28 – 0,45)
Vd/f (L/Kg)	47,96* 48,89 (29,21 – 68,57)	63,11 69,82 (32,36 – 107,27)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	639,48 673,32 (551,74 – 794,90)	522,62 533,79 (439,12 – 628,46)
Cl/f (L/h/Kg)	15,64 15,20 (12,60 – 17,80)	19,17 19,17 (15,58 – 22,76)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,70 0,68 (0,47 – 0,79)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

Tabela 2.6: Disposição cinética dos enantiômeros do DCITA nos animais do grupo fluvoxamina. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n =6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA	(+)-(S)-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	79,62 112,54 (42,73 – 182,34)	73,85 71,17 (51,07 – 91,26)
$t_{\max}$ (h)	1,32 1,34 (0,75 – 1,93)	1,67 1,45 (0,88 – 2,01)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	531,77 632,02 (236,29 – 1027,80)	383,60 355,26 (262,96 – 447,55)

$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$

0,61
0,69 (0,34 – 1,04)

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

4.4 Grupo Cetoconazol

A Figura 2.4 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita.

Figura 2.4: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA e do DCITA *versus* tempo. Grupo cetoconazol (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do CITA e do DCITA nos animais do grupo cetoconazol tratados com CITA estão apresentados nas Tabelas 2.7 e 2.8, respectivamente.

Tabela 2.7: Disposição cinética enantiosseletiva do CITA nos animais do grupo cetoconazol. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n =6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA	(+)-(S)-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	162,21* 191,00 (97,31 – 284,70)	126,96 133,55 (83,89 – 183,20)
$t_{\max}$ (h)	1,28* 1,26 (0,87 – 1,64)	1,04 0,98 (0,64 – 1,31)
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	0,51 0,58 (0,20 – 0,96)	0,29 0,32 (0,13 – 0,51)
K_a (h^{-1})	1,48* 1,91 (0,17 – 3,65)	2,70 3,12 (0,80 – 5,45)
$t_{1/2 \beta}$ (h)	1,96 1,91 (1,28 – 2,55)	2,41 2,43 (1,52 – 3,35)
β (h^{-1})	0,38 0,40 (0,26 – 0,54)	0,29 0,32 (0,21 – 0,42)
Vd/f (L/Kg)	40,85* 41,25 (13,94 – 68,55)	60,52 63,15 (32,25 – 94,06)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	714,88* 849,27 (445,32 – 1253,2)	613,37 605,33 (429,00 – 780,86)
Cl/f (L/h/Kg)	14,14* 13,67 (8,14 – 19,20)	16,32 17,79 (11,84 – 23,73)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,78 0,76 (0,53 – 0,93)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

Tabela 2.8: Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA nos animais do grupo cetoconazol. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 6/tempo de colheita.

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA	(+)-(S)-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	92,38* 119,32 (57,66 – 180,98)	48,84 60,89 (37,23 – 84,55)
$t_{\max}$ (h)	2,50 2,37 (1,73 – 3,00)	2,28 2,26 (1,45 – 3,06)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	763,39* 877,25 (503,89 – 1250,60)	401,23 445,07 (291,00 – 599,15)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,52 0,52 (0,44 – 0,61)	

*P < 0,05; teste de Wilcoxon

4.5 Avaliação do efeito inibitório da quinidina, fluvoxamina e do cetoconazol no metabolismo enantiosseletivo do CITA em ratos

As Figuras 2.5 e 2.6 apresentam, respectivamente, as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita nos animais dos grupos controle, quinidina, fluvoxamina e cetoconazol.

Figura 2.5: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA *versus* tempo nos grupos controle, quinidina, fluvoxamina e cetoconazol. Dados apresentados como mediana, n = 6/tempo de colheita.

Figura 2.6: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do DCITA *versus* tempo nos grupos controle, quinidina, fluvoxamina e cetoconazol, (n = 6/ tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.

A tabela 2.9 apresenta a disposição cinética dos enantiômeros do CITA e do DCITA nos grupos controle, quinidina, fluvoxamina e cetoconazol. Os parâmetros farmacocinéticos de cada enantiômero do CITA e do DCITA relativos aos grupos quinidina, fluvoxamina e cetoconazol foram comparados com aqueles do grupo controle empregando teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$).

Tabela 2.9. Avaliação da quinidina, fluvoxamina e cetoconazol como inibidores do metabolismo do CITA.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA				(+)-(S)-CITA			
	Controle	Quinidina	Fluvoxamina	Cetoconazol	Controle	Quinidina	Fluvoxamina	Cetoconazol
$C_{\max}$ (ng/mL)	152,11 (88,90 – 226,39)	207,60 (183,15-270,05)	174,76 (122,59-224,91)	162,21 (97,31-284,70)	62,33 (47,52 – 93,99)	146,37* (114,60-181,49)	129,21* (103,25-168,08)	126,96* (83,89-183,2)
$t_{\max}$ (h)	1,06 (0,29 – 1,56)	1,16 (0,60 – 1,75)	0,69 (0,38 – 1,21)	1,28 (0,87 – 1,64)	0,78 (0,17 – 1,29)	0,80 (0,53 – 1,08)	0,80 (0,42 – 1,00)	1,04 (0,64 – 1,31)
$t_{1/2}$ a (h)	0,37 (0,03 – 0,67)	0,36 (0,09 – 0,77)	0,17 (0,07 – 0,39)	0,51 (0,20 – 0,96)	0,20 (0,003 – 0,44)	0,20 (0,12 – 0,27)	0,20 (0,09 – 0,33)	0,29 (0,13 – 0,51)
K_a (h^{-1})	2,48 (5,02 – 23,31)	2,26 (0,16 – 5,77)	3,78 (0,14 – 9,59)	1,48 (0,17 – 3,65)	4,93 (4,61 – 35,53)	3,47 (1,98 – 6,08)	3,57 (0,86 – 9,01)	2,70 (0,80 – 5,45)
$t_{1/2} \beta$ (h)	2,09 (1,39 – 3,47)	2,78 (2,06 – 3,19)	1,96 (1,49 – 2,91)	1,96 (1,28 – 2,55)	2,38 (2,07 – 2,58)	2,16 (2,01 – 2,52)	1,85 (1,50 – 2,52)	2,41 (1,52 – 3,35)
β (h^{-1})	0,34 (0,22 – 0,41)	0,25 (0,20 – 0,35)	0,36 (0,25 – 0,42)	0,38 (0,26 – 0,54)	0,29 (0,27 – 0,33)	0,33 (0,28 – 0,34)	0,38 (0,28 – 0,45)	0,29 (0,21 – 0,42)
Vd/f (L/Kg)	49,75 (23,13 -89,09)	34,43 (22,72 – 48,71)	47,96 (29,21-68,57)	40,85 (13,94 – 68,55)	119,90 (96,48-140,35)	60,12 (42,92 – 84,25)	63,11 (32,36-107,27)	60,52 (32,25-94,06)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	601,91 (420,97 – 808,03)	1055,30* (852,94-1398,5)	639,48 (551,74-794,9)	714,88 (445,32-1253,2)	255,13 (228,51-351,51)	544,05* (396,43 – 699,05)	522,62* (439,12-628,46)	613,37* (429,0-780,86)
Cl/f (L/h/Kg)	16,94 (12,38 – 23,75)	9,48* (7,00 – 11,59)	15,64 (12,60-17,80)	14,14 (8,14 – 19,20)	39,15 (29,25-41,69)	18,40* (13,87- 24,85)	19,17* (15,58-22,76)	16,32* (11,84-23,73)
$AUC_{S/R}$	Controle 0,40 (0,24 – 0,59)	Quinidina 0,52 (0,33 – 0,57)	Fluvoxamina 0,70* (0,47 – 0,79)	Cetoconazol 0,78* (0,53 – 0,93)				

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA				(+)-(S)-DCITA			
	Controle	Quinidina	Fluvoxamina	Cetoconazol	Controle	Quinidina	Fluvoxamina	Cetoconazol
$C_{\max}$ (ng/mL)	59,66 (27,12 – 150,09)	207,53* (62,02-241,73)	79,62 (42,73-182,34)	92,38 (57,66-180,98)	35,97 (8,50 – 92,10)	125,25* (57,63-159,47)	73,85 (51,07 – 91,26)	48,84 (37,23-84,55)
$t_{\max}$ (h)	2,28 (1,05 – 2,96)	1,71 (1,05 – 2,73)	1,32 (0,75 – 1,93)	2,50 (1,73 – 3,00)	1,27 (0,61 – 2,36)	1,53 (0,86 – 2,55)	1,67 (0,88 – 2,01)	2,28 (1,45 – 3,06)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	505,77 (179,91 – 1213,0)	1521,1* (1045,1-2301,2)	531,77 (236,29-1027,8)	763,39 (503,89-1250,6)	260,87 (126,32-462,78)	911,73* (435,94-1146,3)	383,60 (262,96-447,55)	401,23 (291,0-599,15)
$AUC_{S/R}$	Controle 0,48 (0,34 – 0,54)	Quinidina 0,49 (0,37 – 0,67)	Fluvoxamina 0,61 (0,34 – 1,04)	Cetoconazol 0,52 (0,44 – 0,61)				

Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, *P < 0,05. Dados apresentados como mediana (IC 95 %), n = 6 por tempo de colheita.

5 DISCUSSÃO

O estudo investiga a influência dos inibidores quinidina, fluvoxamina e cetoconazol na farmacocinética enantiosseletiva do CITA em ratos machos Wistar. Os animais do grupo controle receberam dose única *p.o.* de 20 mg/Kg de CITA administrado sob a forma de mistura racêmica, enquanto os animais dos grupos quinidina, fluvoxamina e cetoconazol receberam dose intraperitoneal de cada inibidor e após 4, 2 e 1 h, respectivamente, receberam por via *p.o.* dose única de 20 mg/Kg de CITA racêmico. Não há na literatura dados relativos a estudos enantiosseletivos ou como mistura enantiomérica da interação do CITA com quinidina, fluvoxamina ou cetoconazol em ratos. Os dados até então disponíveis são relativos a interação dos enantiômeros do CITA com fluvoxamina em pacientes com depressão ou do CITA como mistura enantiomérica com cetoconazol em voluntários sadios.

A disposição cinética do CITA é enantiosseletiva na ausência dos inibidores (grupo controle) com observação de maior proporção plasmática dos enantiômeros (-)-(R)-CITA e (-)-(R)-DCITA; Figura 2.1. As razões de $AUC_{S/R}$ obtidas para o CITA e o DCITA foram 0,40 e 0,48, respectivamente (Tabelas 2.1 e 2.2). Os dados apresentados na Tabela 2.1 exibem maiores valores ($P < 0,05$) de C_{max} (152,11 vs 62,33 ng/mL) e AUC (601,91 vs 225,13 ng.h/mL) e menores valores ($P < 0,05$) de *clearance* (16,94 vs 39,15 L/h/Kg) para o enantiômero (-)-(R)-CITA. Na Tabela 2.2 verifica-se também maiores valores de C_{max} (59,66 vs 35,97 ng/mL) e AUC (505,77 vs 260,87 ng.h/mL) para o metabólito (-)-(R)-DCITA.

A razão de $AUC_{S/R}$ obtida para o CITA de 0,40 (Tabela 2.1) nos experimentos com os animais do grupo controle tratados com dose única (gavagem) de 20 mg/Kg de CITA racêmico encontra-se dentro do intervalo de razões de concentrações plasmáticas de 0,34 a 0,94 reportadas por Wikell et al. (1999), Apelqvist et al. (2000), Kugelberg et al. (2001) e Kugelberg et al. (2003) em experimentos com ratos tratados com dose única ou doses múltiplas de 10 a 100

mg/Kg/dia de CITA racêmico administrado por via subcutânea. A razão de $AUC_{S/R}$ obtida para o metabólito DCITA de 0,48 (Tabela 2.2) na investigação dos ratos do grupo controle encontra-se também dentro do intervalo de razões de concentrações plasmáticas de 0,36-0,85 reportadas por Wikell et al. (1999), Apelqvist et al. (2000) e Kugelberg et al. (2001).

A administração de quinidina, um clássico inibidor do CYP2D, não altera a enantiosseletividade no metabolismo do CITA, sendo observadas à semelhança do grupo controle, maiores proporções plasmáticas do (-)-(R)-CITA e do metabólito (-)-(R)-DCITA (Figura 2.2). A Tabela 2.3 apresenta os dados da disposição cinética do CITA em ratos tratados com quinidina, evidenciando o acúmulo do enantiômero (-)-(R)-CITA com maiores valores ($P < 0,05$) de C_{max} (207,60 vs 146,37 ng/mL) e AUC (1055,30 vs 544,05 ng.h/mL) e menores valores ($P < 0,05$) de *clearance* (9,48 vs 18,40 L/h/Kg). No grupo quinidina também foi verificado acúmulo do metabólito (-)-(R)-DCITA com maiores valores ($P < 0,05$) de C_{max} (207,53 vs 125,50 ng/mL) e AUC (1521,10 vs 911,73 ng.h/mL); Tabela 2.4. Os valores das razões de $AUC_{S/R}$ para os animais do grupo quinidina foram 0,52 para o CITA e 0,49 para o DCITA; Tabelas 2.3 e 2.4. Os animais do grupo quinidina apresentaram maiores valores de C_{max} e AUC para ambos os enantiômeros do CITA e do DCITA em relação aos animais do grupo controle (Tabela 2.9, Figuras 2.5 e 2.6). Concluindo, a quinidina administrada em dose única de 80 mg/Kg inibe o metabolismo do CITA e do DCITA de maneira não enantiosseletiva. Não há dados na literatura relativos a interação do CITA com quinidina em ratos, porém a quinidina inibe a atividade *in vitro* e *in vivo* do CYP2D (KRAEMER et al., 2004; NIWA et al., 2000; LAW et al., 2000). Law et al. (2000) relatam que a administração de quinidina na dose de 80 mg/Kg pela via intraperitoneal 4 h antes da administração de anfetamina resulta em redução da formação do metabólito 4-hidroxianfetamina, indicando inibição do CYP2D.

No grupo tratado com fluvoxamina, inibidor do CYP2C e do CYP1A, foi observada perda da enantiosseletividade no metabolismo do CITA (Figura 2.3). Os parâmetros farmacocinéticos do CITA (Tabela 2.5) e do DCITA (Tabela 2.6) não indicam diferenças significantes entre os enantiômeros ($P \geq 0,05$) nos animais do grupo fluvoxamina. No entanto, os animais do grupo fluvoxamina quando comparados ao grupo controle apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) de $C_{\max}$ (62,33 vs 129,21 ng/mL) e AUC (255,13 vs 522,62 ng.h/mL) para o (+)-(S)-CITA (Tabela 2.9, Figuras 2.5 e 2.6). Os dados apresentados inferem que a fluvoxamina administrada a ratos na dose de 10 mg/Kg inibe o metabolismo somente do eutômero (+)-(S)-CITA. Herrlin et al. (2003) investigaram a farmacocinética do CITA racêmico administrado a voluntários sadios com diferentes genótipos do CYP2C19 e sugerem que o CYP2C19 metaboliza o (+)-(S)-CITA, mas não o (-)-(R)-CITA. Não há dados relativos a associação da fluvoxamina com o CITA em ratos, no entanto, Olesen & Linnet (2000) relatam que a fluvoxamina é um potente inibidor do CYP2C19 e do CYP1A2 em microsomas de fígado humano. Christensen et al. (2002) reportam que a administração *p.o.* de dose única de 25 ou 50 mg ou doses múltiplas de 10 ou 20 mg de fluvoxamina inibe o metabolismo da cafeína e do omeprazol em voluntários sadios. Bondolfi et al. (1996) reportam que doses de 50 ou 100 mg de fluvoxamina administradas durante 7 ou 21 dias em pacientes metabolizadores extensivos da mefenitoína (marcador do CYP2C19) e do dextrometorfano (marcador do CYP2D6) resulta em inibição enantiosseletiva do metabolismo do CITA, com aumento da razão S/R de 0,48 para 0,84. Os dados obtidos na presente investigação permitem inferir que o CYP2C participa de maneira preponderante do metabolismo do (+)-(S)-CITA, mas não do (-)-(R)-CITA na administração do fármaco racêmico a ratos.

O grupo de ratos tratados com cetoconazol, inibidor do CYP3A, à semelhança dos dados observados nos grupos controle e quinidina, apresentou enantiosseletividade no metabolismo do CITA, com maior proporção plasmática do (-)-(R)-CITA e do metabólito (-)-(R)-DCITA; Figura 2.4. O enantiômero (-)-(R)-

CITA apresentou maiores valores ($P < 0,05$) de $C_{\max}$ (162,21 vs 126,96 ng/mL) e AUC (714,88 vs 613,37 ng.h/mL) e menores valores ($P < 0,05$) de *clearance* (14,14 vs 16,32 L/h/Kg); Tabela 2.7. Os valores de $C_{\max}$ (92,38 vs 48,84 ng/mL) e AUC (763,39 vs 401,23 ng.h/mL) também foram maiores ($P < 0,05$) para o metabólito (-)-(R)-DCITA; Tabela 2.8. As razões de $AUC_{S/R}$ foram 0,78 e 0,52 para o CITA e o DCITA, respectivamente (Tabelas 2.7 e 2.8). No entanto, os animais do grupo cetoconazol tratados com dose de 50 mg/Kg quando comparados ao grupo controle apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) de $C_{\max}$ (62,33 vs 126,96 ng/mL) e AUC (255,13 vs 613,37 ng.h/mL) somente para o enantiômero (+)-(S)-CITA (Tabela 2.9, Figuras 2.5 e 2.6). Os dados apresentados sugerem que tanto a fluvoxamina quanto o cetoconazol inibem o metabolismo somente do eutômero (+)-(S)-CITA e que, portanto, o CYP2C e o CYP3A estão envolvidos no metabolismo do (+)-(S)-CITA, mas não do (-)-(R)-CITA na administração do fármaco racêmico a ratos.

Não há dados na literatura referentes a associação do cetoconazol com o CITA em ratos. No entanto, o cetoconazol inibe o metabolismo de diversos substratos do CYP3A em ratos. Yuan et al. (1997) relatam inibição da bioativação da nitroglicerina após a administração de cetoconazol na dose de 50 mg/Kg pela via intraperitoneal 1 h antes da administração de nitroglicerina pela via endovenosa. Merino et al. (2003) reportam aumento de 29 % na AUC do albendazol após a administração simultânea com o cetoconazol na dose de 3 mg/Kg pela via oral. Kageyama et al. (2005) relatam aumento da AUC do nelfinavir e da eritromicina após a administração de doses únicas (5 a 20 mg/Kg) de cetoconazol pela via endovenosa. Barakat et al. (2005) relatam aumento de 50 % na concentração plasmática do tacrolimus durante o tratamento associado com doses múltiplas de 200 mg/dia de cetoconazol administrado pela via oral. Kanazu et al. (2005) relatam aumento de 7 para 23 % da biodisponibilidade do midazolam em ratas tratadas com dexametasona após dose única de 5 mg/Kg de cetoconazol administrado via oral 1 h antes do tratamento com midazolam. Gharavi et al. (2007) reportam que o cetoconazol administrado via oral a ratos na dose de 17,1 mg/Kg, 0,5 h antes e 6 h

após o tratamento com halofantrina racêmica, inibe o metabolismo de ambos os enantiômeros da halofantrina.

Em resumo, a disposição cinética do CITA é enantiosseletiva nos animais dos grupos controle, quinidina e cetoconazol. Os animais do grupo quinidina apresentaram acúmulo plasmático de ambos os enantiômeros do CITA e do DCITA quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais dos grupos fluvoxamina e cetoconazol, quando comparados ao grupo controle, apresentaram acúmulo plasmático somente do eutômero (+)-(S)-CITA. Os dados apresentados exibem a importância do emprego de métodos enantiosseletivos na investigação de inibidores do metabolismo do CITA com ênfase nos inibidores do CYP2C e CYP3A.

Capítulo 3

*Investigação da atividade in vivo do CYP2C19,
CYP3A e CYP2D6 em voluntários sadios*

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 56 % dos fármacos em uso na clínica são primariamente metabolizados pelo sistema citocromo P450 (CYP). Algumas isoformas do CYP, especialmente as famílias 1, 2 e 3, apresentam polimorfismo genético e são de grande interesse para a terapêutica em termos da individualização dos regimes de dosagem. A existência dos variantes alélicos para uma determinada isoforma do CYP pode implicar em aumento, redução ou ausência da atividade enzimática, enquanto a amplificação na expressão gênica de uma isoforma pode implicar em aumento da atividade enzimática. Baseando-se na capacidade de metabolização de fármacos, a população pode ser dividida em metabolizadores lentos (PM), extensivos (EM) e ultra-rápidos (UM) (INGELMAN-SUNDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005; BRØSEN & NARANJO, 2001; INGELMAN-SUNDBERG et al, 1999; KROEMER et al, 1996).

A importância funcional e a frequência de distribuição dos variantes alélicos em diferentes grupos étnicos são extremamente variadas (INGELMAN-SUNDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005; HASLER et al., 1999). A população brasileira pode ser considerada como uma das mais heterogêneas do mundo em função do alto grau de miscigenação de ameríndios, africanos e europeus (ROSSINI et al., 2006; SUAREZ-KURTZ, 2005; CARVALHO-SILVA et al., 2001). As principais isoformas do CYP que apresentam polimorfismo genético são os CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6 e 2E1, sendo as isoformas 2C9, 2C19 e 2D6 responsáveis pelo metabolismo de 40 – 45 % de todos os fármacos disponíveis na clínica (INGELMAN-SUNDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005; HASLER et al., 1999). Os dados até então disponíveis para a população brasileira são relativos ao CYP2C9, CYP2A6 e CYP2E1 (ROSSINI et al., 2006; SUAREZ-KURTZ, 2005).

O CYP2C19 está envolvido na metabolização de vários fármacos como proguanil, imipramina, moclobemida, diazepam e omeprazol. Com base na

capacidade do CYP2C19 de metabolizar a mefenitoína e outros substratos, os indivíduos podem ser classificados como EM ou PM. Foram identificados vinte e um variantes alélicos para esta isoforma (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>, acesso em 01/03/2007) (CYP2C19*2 ao CYP19*21, Tabela 3.1) e a distribuição dos mesmos está relacionada a diferenças étnicas. A frequência de PM sofre intensa variação interpopulacional. Assim, dados mostram que em média há 17 % de PM na população asiática, 4 % na população africana, 3,1 % na afro-americana, 2,6 % em brancos europeus e 2,4 % em brancos norte-americanos. Os fatores não genéticos como indução ou inibição enzimática, idade e presença de doença hepática avançada também podem modular a atividade do CYP2C19 (OZAWA et al., 2004; MIZUTANI, 2003; DESTA et al, 2002; BRØSEN & NARANJO, 2001).

Tabela 3.1: Principais variantes polimórficos para o CYP2C19 (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>)

Alelo CYP2C19	Alteração descrita	Atividade Enzimática
CYP 2C19*1	Tipo selvagem	Normal
CYP 2C19*2	G681A - defeito de <i>splicing</i> exon 5	Nenhuma
CYP 2C19*3	G636A - Stop Codon	Nenhuma
CYP 2C19*4	A ₁ → G - Mutação no codon de iniciação	Nenhuma
CYP 2C19*5	C1297T - Troca de Arg433→Trp	Muito reduzida
CYP 2C19*6	G395A - Troca de Arg132→Gln	Nenhuma
CYP 2C19*7	T→ A sítio de <i>splicing</i> 5' intron 5	Nenhuma
CYP 2C19*8	T358C - Troca de Trp120→Arg	Reduzida
CYP 2C19*9	G431 > A	Reduzida
CYP 2C19*10	C680 > T	Reduzida
CYP 2C19*11	A991 > G	Não estudada
CYP 2C19*12	A991 > G	Instável
CYP 2C19*13	C1228 > T	Não estudada
CYP 2C19*14	A991 > G	Não estudada
CYP 2C19*15	A991 > G	Não estudada
CYP 2C19*16	C1324 > T	Não estudada
CYP 2C19*17	A991 > G	Não estudada
CYP 2C19*18	A991 > G	Não estudada
CYP 2C19*19	A991 > G	Não estudada
CYP 2C19*20	G693A – Stop Códon	Nenhuma
CYP 2C19*21	G681A - Defeito de <i>Splicing</i>	Nenhuma

Vários estudos relatam que a hidroxilação do omeprazol correlaciona-se com a hidroxilação da mefenitoína e também com o genótipo do CYP2C19, sugerindo a utilização do omeprazol como fármaco marcador da atividade *in vitro* e *in vivo* do CYP2C19 (SHU et al., 2000; HERRLIN et al., 1998; KORTUNAY et al., 1997; MARINAC et al., 1996). O metabolismo do omeprazol é dependente das isoformas CYP2C19 e CYP3A4 com formação do 5-hidroxiomeprazol e da sulfona de omeprazol, respectivamente (Figura 3.1) (GONZALEZ et al., 2003; KANAZAWA, 2003; GONZALEZ et al., 2002).

Figura 3.1: Estrutura química do omeprazol e dos metabólitos hidroximeprazol e sulfona de omeprazol (GONZÁLEZ et al., 2002).

O fenótipo do CYP2C19 pode ser determinado através da razão AUC omeprazol/AUC hidroximeprazol, através da razão da concentração plasmática omeprazol/hidroximeprazol ou do índice de hidroxilação (log omeprazol/hidroximeprazol) determinados entre 2 a 4 h após a administração oral

de doses entre 20 e 40 mg de omeprazol (YIN et al., 2004b; GONZÁLEZ et al., 2003).

Marinac et al. (1996) relatam que o índice de hidroxilação do omeprazol (log omeprazol/hidroxiomeprazol) é em média de -0,215 em americanos negros genotipados como CYP2C19*1*1 e em média de -0,110 na população genotipada como CYP2C19*1*2. González et al. (2003) sugerem que voluntários sadios mexicanos com índice de hidroxilação $< 0,6$ sejam classificados como EM e indivíduos com índice de hidroxilação $> 0,6$ como PM. Porém, Yu et al. (2003) classificam como EM voluntários sadios chineses que apresentam índice de hidroxilação < 1 e PM indivíduos que apresentam índice de hidroxilação ≥ 1 .

Kim et al. (2004) reportam que indivíduos caucasianos genotipados como CYP2C19*1*1 apresentam razão de hidroxilação (omeprazol/hidroxiomeprazol) entre 0,42 e 1,81, enquanto indivíduos genotipados como CYP2C19*1*2 apresentam razão de hidroxilação variando entre 2,24 e 4,13. Rosemary et al. (2005) relatam que voluntários indianos genotipados como CYP2C19*1*1, CYP2C19*1*2 e CYP2C19*2*2 ou CYP2C19*3*3 apresentam razão de hidroxilação de 2,4; 5,3 e 22,5, respectivamente. No entanto, Yang et al. (2004) classificam como EM do CYP2C19 os indivíduos (voluntários da Malásia, China e Índia) com razão de hidroxilação $< 6,0$ e como PM os indivíduos com razão de hidroxilação $> 6,0$.

A relevância clínica do polimorfismo genético do CYP2C19 na eficácia e segurança de medicamentos tem recebido grande atenção nos últimos anos. Assim, como exemplo, podemos citar o aumento da eficácia dos inibidores da bomba de prótons e o maior risco de toxicidade para a fenitoína e para os antidepressivos tricíclicos em pacientes PM do CYP2C19. Os indivíduos PM do CYP2C19 apresentam maiores concentrações plasmáticas do diazepam e do seu metabólito desmetildiazepam em comparação com os indivíduos EM (DESTA et al, 2002; GOLDSTEIN, 2001). Esses dados sugerem que a genotipagem para o CYP2C19

pode ser útil na detecção precoce de ausência de eficácia, toxicidade e maior risco de interações medicamentosas no uso de fármacos metabolizados por essa enzima.

O CYP3A é a maior subfamília de enzimas hepáticas e intestinais responsáveis pelo metabolismo oxidativo. O CYP3A é responsável pelo metabolismo de fase I de mais de 50 % dos fármacos disponíveis na clínica. Dentro da subfamília do CYP3A, as principais isoformas são o CYP3A4, CYP3A5 e o CYP3A7. Estudos histoquímicos indicam que o CYP3A4 é a isoforma presente em maior quantidade no fígado, jejuno, cólon e pâncreas, destacando-se a importância clínica do metabolismo de primeira passagem mediado pelo CYP3A. O CYP3A5 e o CYP3A7 apresentam, respectivamente, similaridade de 85 e 90 % ao CYP3A4. O CYP3A5 é a principal isoforma presente nos rins, pulmões, estômago, esôfago e encontra-se em menor quantidade no fígado. O CYP3A7 é principalmente encontrado no tecido hepático de fetos humanos, representando 32 % do total das isoformas do CYP, porém, após o nascimento a atividade do CYP3A7 é reduzida enquanto a atividade do CYP3A4 é aumentada (WILDT et al., 1999).

O CYP3A4 é a enzima mais abundante e de maior importância no metabolismo de fármacos antiarrítmicos, antifúngicos, bloqueadores do canal de cálcio, quimioterápicos (paclitaxel, vincristina e vimblastina), imunossupressores (ciclosporina, tacrolimus e rifampicina) e antiretrovirais (saquinavir, indinavir, ritonavir e nelfinavir) (BRØSEN & NARANJO, 2001; INGELMAN-SUNDBERG et al, 1999).

O CYP3A5 apresenta especificidade similar ao CYP3A4 para muitos substratos, porém a razão de metabolização parece diferir entre as duas isoformas. Estudos *in vitro* utilizando o midazolam como substrato sugerem maior atividade catalítica do CYP3A5 em relação ao CYP3A4 na formação do metabólito 1-hidroximidazolam. A hidroxilação do alprazolam também parece diferir entre as duas isoformas com formação 2 vezes maior do metabólito 1-hidroxialprazolam pelo CYP3A5 em comparação com o CYP3A4. No entanto, a formação do metabólito

10,11-epóxido carbamazepina pelo CYP3A5 é de aproximadamente 33 % da formação observada com o CYP3A4 (WOJNOWSKI, 2004; WILDT et al., 1999).

O CYP3A5 e o CYP3A7 apresentam polimorfismo genético. São reportados 10 variantes alélicos do CYP3A5, sendo o CYP3A5*1 e o CYP3A5*3 os variantes de maior frequência, e 5 variantes do CYP3A7 com maior frequência do CYP3A7*1C (Tabela 3.2) (DALY, 2006).

Tabela 3.2: Principais variantes alélicas para o CYP3A5 e CYP3A7 (DALY, 2006).

Alelo	Alteração descrita	Atividade Enzimática
CYP3A5*1	Alelo de referência	Normal
CYP3A5*2	27289C > A	Não conhecida
CYP3A5*3	6986A > G	Muito reduzida
CYP3A5*4	14665A > G	Não conhecida
CYP3A5*5	12952T > C	Não conhecida
CYP3A5*6	14690G > A	Nenhuma
CYP3A5*7	27131-32insT	Não conhecida
CYP3A5*8	3699C > T	Reduzida
CYP3A5*9	19386 G > A	Reduzida
CYP3A5*10	6986A > G; 29753T > C; 31611C > T	Reduzida
CYP3A7*1A	Alelo de referência	Normal
CYP3A7*1B	-314C > T	Reduzida
CYP3A7*1C	-291G > T; -284T > A; -282 T > C; -281A > T; -270T > G; -262T > A; -232A > C	Reduzida
CYP3A7*1D	-91G > A	Não conhecida
CYP3A7*1E	-49G > A	Não conhecida

O midazolam é um fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP3A. Após a administração intravenosa (IV) ou oral há formação predominante do metabólito 1-hidroximidazolam com recuperação urinária de aproximadamente 70 % da dose como conjugado glicuronídeo. A determinação do *clearance* total do midazolam pode ser utilizada como um indicativo da atividade *in vivo* do CYP3A, com possibilidade de marcação da atividade do CYP3A hepático (administração IV) ou do CYP3A hepático e intestinal (administração oral) (ROGERS et al, 2003; TATEISHI et al., 2001; INGELMAN-SUNDBERG et al, 1999).

O omeprazol também pode ser utilizado como fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP3A a partir da determinação da razão metabólica AUC omeprazol/AUC sulfona de omeprazol ou do logaritmo da razão da concentração plasmática omeprazol/sulfona de omeprazol determinada após 2–4 h da administração do omeprazol (BÖTTIGER, 2006; GONZÁLEZ et al., 2003).

Foram identificadas mais de 75 variantes alélicas do CYP2D6, porém os variantes de maior frequência na população são os CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*9, CYP2D6*10 e CYP2D6*17 (Tabela 3.3). A frequência de UM do CYP2D6 é de 0 a 10 % em caucasianos, 0 a 29 % em africanos e 0 a 21 % em asiáticos. Para o fenótipo PM, são reportados valores de 1,5 a 10 % em caucasianos, 0 a 19 % em africanos, 0 a 4,8 % em asiáticos e 2,2 a 6,6 % em hispânicos da América Latina (BERNARD et al., 2006; INGELMAN-SUNDBERG, 2005; MIZUTANI, 2003; HASLER et al., 1999).

Tabela 3.3: Principais variantes alélicas para o CYP2D6 (INGELMAN-SUNDBERG, 2005).

Alelo CYP2D6	Alteração descrita	Atividade Enzimática
CYP 2D6*1	Tipo selvagem	Normal
CYP 2D6*2	<i>exon</i> 6, C → T <i>exon</i> 9, G → T	Normal
(CYP 2D6*2) _{n > 1}	<i>exon</i> 6, C → T <i>exon</i> 9, G → T	Aumentada
CYP 2D6*9	<i>exon</i> 5, A, G, A deletados	Reduzida
CYP 2D6*10	<i>exon</i> 1, C → T	Reduzida
CYP 2D6*17	<i>exon</i> 2 ou 6, C → T <i>exon</i> 9, G → C	Reduzida
CYP 2D6*3	<i>exon</i> 5, A deletado	Nenhuma
CYP 2D6*4	<i>intron</i> 3/ <i>exon</i> 4, G → A	Nenhuma
CYP 2D6*5	gene deletado	Nenhuma

A atividade *in vivo* do CYP2D6 pode ser determinada utilizando a debrisoquina como fármaco marcador. A debrisoquina é eliminada principalmente por metabolismo oxidativo, resultando na formação de 4-hidroxidebrisoquina (Figura 3.2) e dos metabólitos fenólicos 5-, 6-, 7- e 8-hidroxidebrisoquina. O metabolismo pré-sistêmico da debrisoquina é mediado principalmente pelo CYP2D6 hepático, com pequena contribuição do CYP1A1 intestinal (GRANVIL et al., 2002). A atividade do CYP2D6 *in vivo* pode ser estimada pela razão de recuperação da debrisoquina ($DRR = 4\text{-hidroxidebrisoquina} / \text{debrisoquina} + 4\text{-hidroxidebrisoquina}$) ou pela razão metabólica ($DMR = \text{debrisoquina} / 4\text{-hidroxidebrisoquina}$) na urina coletada 6-8 h após a administração de uma única dose *p.o.* de debrisoquina. A razão metabólica varia na população de $\cong 0,01$ a >100 , sendo os indivíduos que expressam $DMR < 12,6$ classificados como EM, os que expressam $DMR > 12,6$ classificados

como PM enquanto os indivíduos com $DMR < 0,1$ são classificados como UM. Uma razão de recuperação (DRR) maior que 0,12 também expressa o fenótipo EM da debrisoquina (ISMAIL et al., 2000; KUNICKI et al., 1995; TUCKER et al., 1977).

Figura 3.2: Estrutura química da debrisoquina e do seu metabólito 4-hidroxydebrisoquina (CERQUEIRA et al., 2000).

O CYP2D6 apresenta importância clínica na oxidação (principalmente hidroxilação e N-desalquilação) de vários fármacos e é a principal enzima que catalisa o metabolismo de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina (especialmente paroxetina e fluoxetina), alguns antipsicóticos, antiarrítmicos, β -bloqueadores, antieméticos e opiáceos. Vários estudos reportam maior incidência de reações adversas ou redução da ação farmacológica utilizando doses convencionais de medicamentos, por exemplo, ausência do efeito analgésico da codeína em PM e redução do efeito de antidepressivos em UM do CYP2D6 (ZANGER et al., 2004; BERTILSSON et al., 2002; DORNE et al., 2002; HASLER et al., 1999).

A eficácia dos antieméticos ondansetrona e tropisetrona foi reduzida em pacientes UM do CYP2D6 em tratamento quimioterápico em comparação com pacientes EM e PM. Pacientes PM do CYP2D6 apresentam redução do efeito terapêutico do tamoxifeno devido a redução da formação do metabólito ativo

endoxifeno. O tratamento da esquizofrenia com doses convencionais de haloperidol ou tioridazina resulta em aumento da incidência de efeitos adversos, como sedação e sintomas parkinsonianos em pacientes PM do CYP2D6 (BERNARD et al., 2006; INGELMAN-SUNDBERG, 2005; CASCORBI et al., 2003).

2 OBJETIVOS

Avaliar a atividade *in vivo* do CYP2D6, CYP2C19 e CYP3A em voluntários sadios utilizando a debrisoquina, o omeprazol e o midazolam como fármacos marcadores.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística e Protocolo clínico

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 11566/2003 – Anexo A). Foram investigados 9 voluntários sadios, adultos (18-45 anos) e de ambos os sexos (Tabela 3.4). Os voluntários receberam explicação detalhada dos procedimentos e foram incluídos no estudo após a obtenção por escrito do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Foram coletados 5 mL de sangue para a investigação do genótipo do CYP2C19. O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi isolado dos linfócitos periféricos utilizando a técnica de *salting out* de acordo com o procedimento descrito por Miller et al. (1988). Para identificar o polimorfismo do CYP2C19*2 e CYP2C19*3 foram amplificados fragmentos de DNA genômico utilizando a técnica de RFLP-PCR [*Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction* (Reação da Cadeia pela Polimerase - PCR)], seguida de digestão por enzimas de restrição SMA I (CYP2C19*2) e Bam HI (CYP2C19*3) e submetidas à eletroforese em gel

de agarose a 2 %. O alelo selvagem CYP2C19*1 e as variantes alélicas CYP2C19*2 e CYP2C19*3 foram identificados a partir do perfil das bandas reveladas.

Tabela 3.4: Voluntários sadios incluídos na investigação.

Voluntário	Gênero	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)
1	M	29	70	1,73	23,39
2	F	23	61	1,64	22,68
3	F	31	58	1,68	20,55
4	M	24	70	1,70	24,22
6	M	27	85	1,82	25,66
7	M	25	81	1,83	24,19
8	F	33	95	1,69	33,66
9	F	36	53	1,55	22,06
10	F	27	72	1,66	26,13

Para a investigação do fenótipo oxidativo do CYP2C19 e do CYP2D6 e da atividade *in vivo* do CYP3A, os voluntários em jejum de 12 h e após esvaziar a bexiga, receberam por via *p.o.* 20 mg de omeprazol (Peprazol[®], Libbs, São Paulo, SP, Brasil) e 10 mg de sulfato de debrisoquina (Debrisoquine[®], Cambridge Laboratories, Newcastle-Upon-Tyne, Inglaterra). Foi coletada uma amostra de sangue (5 mL) após 3,5 h da administração dos fármacos. A amostra foi centrifugada por 10 min e o plasma obtido foi alcalinizado com 100 µL de hidróxido de sódio 1 M e armazenado a - 70°C. A urina foi colhida durante 8 h após a administração dos fármacos, o volume foi medido e uma alíquota de 10 mL foi armazenada a - 70°C.

A atividade *in vivo* do CYP3A também foi avaliada utilizando o midazolam como fármaco marcador. Os voluntários em jejum receberam por via *p.o.* 15 mg de maleato de midazolam (Dormonid[®], Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com 200 mL de água. Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue, a partir de um cateter

inserido na veia antecubital e mantido com heparina, nos tempos zero, 15, 30 min e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a administração do fármaco. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g por 10 min e os plasmas separados e armazenados a - 70°C até a análise.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma

3.2.1.1 Soluções padrão e reagentes

As soluções estoque de omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol (AstraZeneca, Molndal, Suíça) foram preparadas em metanol na concentração de 0,2 mg/mL. Posteriormente, cada solução foi diluída para obtenção das concentrações de 20; 8; 4; 2; 1; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,02 µg/mL de metanol alcalinizado com dietilamina 0,1 % (ORLANDO et al., 2003). A solução de antipirina (padrão interno - PI, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 250 µg/mL de metanol.

Os solventes utilizados no preparo das soluções, no processo de extração do omeprazol e metabólitos e como constituintes da fase móvel do sistema HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) como grau cromatografia. A água passou pelo processo de purificação através do sistema Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2.1.2 Análise Cromatográfica

O sistema HPLC foi constituído por cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por bomba modelo LC-10 AD e forno modelo CTO-10 AS. O omeprazol e os metabólitos foram analisados na coluna RP-Select B, partículas de 5 µm, 250 x 4,6 mm com pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-8 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel que eluiu pelo sistema na vazão de 1 mL/min foi constituída por acetonitrila e água contendo 0,1 % de ácido fórmico (27:73 v/v). A coluna foi mantida na temperatura de 24 ± 1°C.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado na análise do omeprazol e metabólitos foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface de *electrospray* (ESI). As análises foram executadas no modo positivo.

A voltagem do capilar no ESI foi de 3,0 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120°C e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 365 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2,1 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 15 V para o omeprazol e para o PI e 20 V para o hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol. A energia de colisão foi de 10 eV para o omeprazol e hidroxioimeprazol, 25 eV para a sulfona de omeprazol e 30 eV para o PI.

As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão (10 µg/mL) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 20 µL/min. As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons-produtos foram monitorados nas transições: 346 > 198 para o omeprazol, 362 > 214 para o hidroxioimeprazol, 362 > 150 para a sulfona de omeprazol e 189 > 104 para o PI. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx, versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.1.3 Método de preparo das amostras

As amostras de plasma branco de voluntários sadios (não tratados com omeprazol) foram obtidas do Hemocentro do HCFMRP-USP.

Na análise do omeprazol e metabólitos, alíquotas de 0,5 mL de plasma foram adicionadas de 25 µL da solução de PI, 0,5 mL de fosfato de sódio 1 M (pH = 9,0), 100 mg de cloreto de sódio e 5 mL de diclorometano:éter etílico (95:5, v/v). As amostras foram extraídas em agitador horizontal (agitador de mesa recíprocante

modelo MA 139/ CFT da Marconi) durante 30 min e centrifugadas a 2000 g durante 10 min (centrífuga refrigerada Beckman modelo TJ-6, 6000g). As fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo (RCT90 e modo RC10.22) da Jouan AS (St. Herblain, França), à temperatura de 25°C. Os resíduos foram retomados em 100 µL de solução acetonitrila: fosfato de sódio 0,03 M (27:73) dos quais 60 µL foram submetidos a análise cromatográfica. O processo de injeção das amostras foi realizado no injetor automático modelo SIL-10AD VP da Shimadzu (Kyoto, Japão) com temperatura mantida a 5°C. Todos os procedimentos analíticos foram realizados sob luz amarela devido a fotossensibilidade do omeprazol e metabólitos (WANG et al., 2005).

3.2.1.4 Validação

O método desenvolvido para a análise do omeprazol e dos metabólitos hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução n° 899, 2003, acesso em 16/09/2004) para a análise em fluidos biológicos.

Para a construção das curvas de calibração, alíquotas de 0,5 mL de plasma branco foram enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol e 25 µL da solução do PI (antipirina), sendo submetidas aos processos de extração líquido-líquido e análise cromatográfica anteriormente descritos. As curvas de calibração foram construídas no intervalo de 1 a 1000 ng de cada fármaco por mL de plasma e foram determinadas as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação.

As recuperações do omeprazol e metabólitos foram avaliadas, em triplicata, nas concentrações de 5, 50 e 400 ng/mL de plasma, seguindo o protocolo descrito no preparo das amostras. As concentrações dessas amostras foram determinadas a partir das áreas dos picos das soluções padrão não submetidas aos processos de extração, preparadas em duplicata para cada concentração.

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração quantificada de cada fármaco com precisão e exatidão igual ou inferior a 20 %. Foram avaliadas quintuplicatas de amostras de plasma enriquecidas com omeprazol e metabólitos na concentração de 1 ng/mL de plasma.

A linearidade foi definida como a maior concentração plasmática de cada fármaco que apresentou relação linear com a resposta do detector. Foram avaliadas amostras, em triplicata, enriquecidas com concentrações crescentes àquelas empregadas nas curvas de calibração.

A precisão e a exatidão foram avaliadas nas concentrações de 5, 50 e 400 ng de cada fármaco por mL de plasma. As amostras de plasma enriquecidas foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20°C e sob a proteção da luz até a análise.

Para a avaliação da precisão intra-ensaio foram analisadas 10 alíquotas de cada amostra de plasma enriquecida através de uma única curva de calibração e na avaliação da precisão interensaios foram analisadas alíquotas, em duplicata, das amostras durante 5 dias consecutivos.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras de plasma enriquecidas (5, 50 e 400 ng/mL de plasma), em triplicata, foram congeladas a -20°C e após 24 h foram descongeladas e novamente congeladas por 24 h. Este ciclo foi repetido por mais duas vezes, analisando-se os fármacos após o término do terceiro ciclo. A estabilidade das amostras de plasma enriquecidas também foi determinada após a manutenção durante 4 h em temperatura ambiente de 25°C . Os resultados dos testes de estabilidade foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas e analisados pelo teste t de Student, $P < 0,05$.

3.2.2 *Análise do midazolam em plasma*

A análise do midazolam foi realizada por LC-MS/MS de acordo com o método descrito por Jabor et al. (2005). Em resumo, a separação cromatográfica foi

obtida em coluna Purospher® RP-18e e pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18e (Merck, Darmstadt, Alemanha) com fase móvel constituída por acetonitrila:acetato de amônio 10 mmol/L (50:50 v/v). Para o preparo das amostras, alíquotas de 1 mL de plasma foram acrescidas de 25 µL de clobazam (0,1 µL/mL de metanol), 100 µL de hidróxido de sódio 0,1 M e 4 mL da mistura tolueno:álcool isoamílico (100:1, v/v). Após a extração por 30 min e centrifugação a 2000 g por 10 min, as fases orgânicas (3,5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo. Os resíduos obtidos foram retomados em 50 µL de fase móvel, dos quais 20 µL foram cromatografados. A detecção foi realizada no espectrômetro de massas Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface *electrospray*, no modo de ionização positivo. Os íons protonados e seus respectivos íons-produtos foram monitorados nas transições: 301 > 259 para o midazolam e 326 > 291 para o clobazam (PI). A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx, versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido). O método foi linear no intervalo de concentrações de 0,1 – 100 ng/mL de plasma. Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão e a inexatidão foram inferiores a 15 %.

3.2.3 *Análise da debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina em urina*

A análise da debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o método descrito por Cerqueira et al. (2000). Em resumo, a separação cromatográfica foi obtida em coluna RP-Select-B Lichrospher® 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha) com fase móvel constituída por tampão acetato 0,25 M, pH = 5:acetonitrila (9:1, v/v). Para o preparo das amostras, alíquotas de 1 mL de urina foram alcalinizadas e adicionadas de 200 mg de cloreto de sódio e 6 mL da mistura diclorometano:isopropanol (6:4, v/v). A extração da debrisoquina e de seu metabólito (4-hidroxidebrisoquina) foi realizada mediante agitação mecânica por 3 min, seguida de centrifugação a 2000 g

por 10 min. As fases orgânicas (5,5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo. Os resíduos obtidos foram retomados em 100 μ L de fase móvel, dos quais 20 μ L foram cromatografados. Os fármacos foram detectados por fluorescência com $\lambda_{\text{excitação}}$ e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 210 e 290 nm, respectivamente. A linearidade do método foi de 0,2 – 20 e 0,3 – 15 μ g/mL de urina e o LQ foi de 25 e 18,75 ng/mL para a debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina, respectivamente. Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão e a inexatidão foram inferiores a 15 %.

3.3 Análise farmacocinética e estatística

A análise do fenótipo oxidativo tipo omeprazol (CYP2C19 e CYP3A4) foi determinada empregando as concentrações de omeprazol inalterado, hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol no plasma coletado após 3,5 h da administração do omeprazol. Para avaliar a atividade *in vivo* do CYP2C19, a razão de hidroxilação foi calculada dividindo-se a concentração plasmática do omeprazol inalterado pela concentração plasmática do hidroxioimeprazol. O índice de hidroxilação do omeprazol foi calculado a partir do log da razão da concentração plasmática do omeprazol inalterado pela concentração plasmática do hidroxioimeprazol. Para avaliar a atividade *in vivo* do CYP3A, foi calculada a razão metabólica a partir do log da concentração plasmática do omeprazol inalterado pela concentração plasmática da sulfona de omeprazol (GONZALEZ, 2003).

O *clearance* oral do midazolam empregado na avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A foi calculado com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo. Foi empregado o programa WinNonlin, versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA).

A análise do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina (CYP2D6) foi determinada pela quantidade (A_e) de debrisoquina inalterada e de 4-hidroxidebrisoquina excretada na urina no intervalo de 0-8 h. A razão metabólica foi calculada dividindo-se a quantidade de debrisoquina inalterada pela quantidade de 4-hidroxidebrisoquina

excretada no intervalo de 0-8 h ($DMR = Ae \text{ debrisoquina} / Ae \text{ 4-hidroxidebrisoquina}$). A razão de recuperação foi calculada dividindo-se a quantidade de 4-hidroxidebrisoquina pela somatória da quantidade de debrisoquina inalterada e 4-hidroxidebrisoquina no intervalo de 0-8 h [$DRR = Ae \text{ 4-hidroxidebrisoquina} / (Ae \text{ debrisoquina} + Ae \text{ 4-hidroxidebrisoquina})$] (TUCKER et al., 1977).

4 RESULTADOS

4.1 Análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma

A Figura 3.3 apresenta os cromatogramas obtidos na análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma humano.

Figura 3.3: Cromatogramas referentes a (A) – Plasma branco; (B) - Plasma enriquecido com solução padrão de omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol; (C) – Plasma de um voluntário coletado após 3,5 h da administração de dose única de omeprazol. Picos (1) – antipirina (PI), (2) – hidroxiomeprazol, (3) – omeprazol, (4) – sulfona de omeprazol.

Os limites de confiança do método de análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Limites de confiança do método de análise do omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma.

	OME	OH-OME	OME-S
Recuperação (%)			
5 ng/mL	92	76	85
50 ng/mL	85	73	90
400 ng/mL	83	70	86
Linearidade (ng/mL)	1 – 1000	1 – 1000	1 – 1000
r	0,9884	0,9829	0,9952
Limite de Quantificação (ng/mL)	1	1	1
Precisão (CV %, n = 5)	11,69	12,76	7,48
Inexatidão (%)	- 4,69	- 0,20	7,60
Precisão interensaios (n=5, CV %)			
5 ng/mL	11,52	10,42	8,33
50 ng/mL	12,14	9,96	9,27
400 ng/mL	11,67	14,12	9,73
Precisão intra ensaio (CV %)			
5 ng/mL (n = 10)	12,86	14,48	6,44
50 ng/mL (n = 10)	9,50	8,05	6,75
400 ng/mL (n = 10)	11,96	13,59	8,05
Inexatidão interensaios (%)			
5 ng/mL (n = 5)	- 3,01	4,29	5,36
50 ng/mL (n = 5)	- 0,69	6,38	7,06
400 ng/mL (n = 5)	- 3,43	-2,68	1,95
Inexatidão intra ensaio (%)			
5 ng/mL (n = 10)	2,88	8,04	-3,76
50 ng/mL (n = 10)	11,79	8,96	1,68
10 ng/mL (n = 10)	- 4,69	0,85	-8,99
Estabilidade (P*)			
3 Ciclos descongelamento (-20 a 25°C)			
5 ng/mL	0,1807	0,9207	0,1850
50 ng/mL	0,5988	0,2087	0,2891
400 ng/mL	0,2606	0,7127	0,5754
Temperatura ambiente (4 h)			
5 ng/mL	0,7822	0,8979	0,4838
50 ng/mL	0,1115	0,1302	0,9628
400 ng/mL	0,5420	0,5317	0,7634
Pós-processamento			
5 ng/mL	0,4303	0,1176	0,3533
50 ng/mL	0,1986	0,3877	0,1096
400 ng/mL	0,5873	0,9450	0,7012

*Teste t de Student, $P < 0,05$; OME – omeprazol; OH-OME – hidroxiomeprazol; OME-S – sulfona de omeprazol.

4.2 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP2C19 utilizando o omeprazol como fármaco marcador

A Tabela 3.6 apresenta os resultados do genótipo do CYP2C19 e do fenótipo oxidativo tipo omeprazol (avaliação da atividade do CYP2C19).

Tabela 3.6: Investigação do genótipo do CYP2C19 e do fenótipo oxidativo tipo omeprazol (avaliação da atividade do CYP2C19).

Voluntário	Razão OME/OH-OME	log OME/OH-OME	Fenótipo CYP2C19	Genótipo
1	0,28	-0,55	EM	CYP2C19*1*1
2	1,91	0,28	EM	CYP2C19*1*1
3	0,20	-0,69	EM	CYP2C19*1*1
4	3,02	0,48	EM	CYP2C19*1*1
6	0,93	-0,03	EM	CYP2C19*1*1
7	1,23	0,09	EM	CYP2C19*1*1
8	3,55	0,55	EM	-
9	1,78	0,25	EM	CYP2C19*1*1
10	1,35	0,13	EM	-
Mediana	1,35	0,13		
Média	1,58	0,06		
IC 95 %	0,71 – 2,46	-0,27 – 0,40		

OME: omeprazol

OH-OME: hidroxiomeprazol

EM: metabolizador extensivo

4.3 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A utilizando o omeprazol e o midazolam como fármacos marcadores

A Tabela 3.7 apresenta os resultados da avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A, utilizando o omeprazol e o midazolam como fármacos marcadores.

Tabela 3.7: Investigação da atividade *in vivo* do CYP3A.

Voluntário	Clearance do MDZ (mL/min/Kg)	log OME/OME-S
1	89,50	0,12
2	17,89	0,05
3	90,70	-0,30
4	16,06	0,20
6	12,13	0,21
7	10,90	0,16
8	15,90	0,21
9	23,27	0,10
10	149,30	-0,16
Mediana	17,89	0,12
Média	47,35	0,07
IC 95 %	8,92 – 85,79	-0,07 – 0,20

MDZ: midazolam

OME: omeprazol

OME-S: sulfona de omeprazol

A Figura 3.4 apresenta a regressão ortogonal entre o *clearance* oral do midazolam e o log da razão de concentração plasmática omeprazol/sulfona de omeprazol.

Figura 3.4: Regressão ortogonal entre o *clearance* do midazolam e o log da razão da concentração plasmática (3,5 h) do omeprazol/sulfona de omeprazol.

OME: omeprazol

OME-S: sulfona de omeprazol

4.4 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP2D6 utilizando a debrisoquina como fármaco marcador

A Tabela 3.8 apresenta os resultados do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina.

Tabela 3.8: Investigação do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina (avaliação da atividade do CYP2D6).

Voluntário	Ae DEB/4-OHDEB (Razão metabólica)	Ae DEB/(DEB + 4-OHDEB) (Razão de recuperação)	Fenótipo
1	0,84	0,46	EM
2	0,50	0,33	EM
3	2,02	0,66	EM
4	0,15	0,13	EM
6	0,16	0,14	EM
7	0,22	0,18	EM
8	0,30	0,23	EM
9	0,29	0,23	EM
10	1,04	0,49	EM
Mediana	0,30	0,23	
Média	0,61	0,32	
IC 95 %	0,14 – 1,08	0,18 – 0,46	

Ae DEB/4-OHDEB: quantidade excretada debrisoquina/4-hidroxidebrisoquinada; Ae DEB/(DEB + 4-OHDEB): quantidade excretada debrisoquina/(debrisoquina + 4-hidroxidebrisoquina); EM: metabolizador extensivo.

5 DISCUSSÃO

A avaliação da atividade *in vivo* do CYP2D6, CYP2C19 e CYP3A exige a disponibilidade de métodos analíticos validados para a análise dos fármacos marcadores e seus metabólitos em plasma ou urina.

O método de análise sequencial do omeprazol e dos metabólitos hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol em plasma foi desenvolvido e validado utilizando o sistema LC-MS/MS.

Diversos estudos relatam a análise do omeprazol, hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol no plasma, utilizando HPLC com detecção por UV, DAD, LC-MS e LC-MS/MS (REZK et al., 2006; SHIMIZU et al., 2006; SONG & NAIDONG, 2006; FRERICHS et al., 2005; WANG et al., 2005; HOFMANN et al., 2006; YIN et al., 2004a; GONZÁLEZ et al., 2002; KANAZAWA et al., 2003 e 2002; DUBUC et al., 2001).

A separação do omeprazol, hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol foi obtida na coluna Select B[®] com a fase móvel constituída por mistura de acetonitrila e ácido acético 0,1 %, em aproximadamente 20 min. A análise do plasma branco de voluntários sadios não evidencia interferências de componentes endógenos com os fármacos analisados (Figura 3.3). No sistema LC-MS/MS os íons protonados foram monitorados nas transições 346 > 198 para o omeprazol, 362 > 214 para o hidroxioimeprazol, 362 > 150 para a sulfona de omeprazol e 189 > 104 para o PI (antipirina).

O estudo da recuperação (Tabela 3.5) mostra valores acima de 70 % e independentes da concentração para o omeprazol, hidroxioimeprazol e sulfona de omeprazol, analisados por procedimento de extração líquido-líquido utilizando a mistura diclorometano:éter etílico (95:5, v/v) como solvente extrator. Os valores de recuperação são equivalentes aos dados da literatura que relatam valores de 81 a 99 % para o omeprazol, 64 a 80 % para o hidroxioimeprazol e 81 a 99 % para a sulfona de omeprazol utilizando extração líquido-líquido ou extração em fase sólida (REZK et al., 2006; HOFMANN et al., 2006; SHIMIZU et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2002; DUBUC et al., 2001).

Os estudos de precisão apresentaram coeficientes de variação e % de inexatidão menores que 15 % (Tabela 3.5), indicando o método como preciso e

exato. O LQ foi de 1 ng/mL de plasma para o omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol. Estudos utilizando detecção por UV reportam valores de LQ de 2,5 a 60,0 ng/mL para o omeprazol, 3 a 60 ng/mL para o hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol (SHIMIZU et al., 2006; ORLANDO et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2002; YUEN et al., 2001) enquanto a detecção por DAD apresenta valores de 2 a 10 ng/mL para os três fármacos (REZK et al., 2006; DUBUC et al., 2001). No sistema LC-MS o LQ para o omeprazol, hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol foi de 2,7 a 10, 5 e 10 ng/mL, respectivamente (HOFMANN et al., 2006; KANAZAWA et al., 2003 e 2002). No LC-MS/MS os valores reportados são de 0,4 a 5 ng/mL para o omeprazol e hidroxiomeprazol e 0,5 ng/mL para a sulfona de omeprazol (SONG & NAIDONG, 2006; FRERICHS et al., 2005; WANG et al., 2005; YIN et al., 2004a; BLACK et al., <http://www.advion.com>, acesso em 15/01/07).

A avaliação da estabilidade em ciclos de descongelamento, estocagem por 4 h à temperatura ambiente e pós-processamento apresentou valores de P maiores que 0,05 (teste t de Student), garantindo a estabilidade das amostras (Tabela 3.5). Deve-se destacar que o omeprazol e o hidroxiomeprazol são instáveis em pH < 8,0 e fotossensíveis (WANG et al., 2005; FRERICHS et al., 2005; YUEN et al., 2001). Assim, no preparo das amostras, o plasma branco foi alcalinizado com hidróxido de sódio imediatamente após a adição das soluções padrão. Ressalta-se que tanto as soluções padrão quanto as amostras de plasma dos voluntários também foram alcalinizadas antes de serem armazenadas a -70 °C.

A investigação da atividade *in vivo* do CYP2C19 utilizando o omeprazol como fármaco marcador (Tabela 3.6) mostra que 7 voluntários genotipados como CYP2C19*1*1 apresentaram índice de hidroxilação (log omeprazol/hidroxiomeprazol) inferior a 0,5 (mediana = 0,13) e razão de hidroxilação (omeprazol/hidroxiomeprazol) inferior a 3,5 (mediana = 1,35). Dentre os 9 voluntários investigados, 2 não tiveram o genótipo determinado e apresentaram

índices de hidroxilação de 0,55 e 0,13 e razões de hidroxilação de 3,55 e 1,35. González et al. (2003) e Yu et al. (2003) reportam, respectivamente, em mexicanos e chineses índices de hidroxilação $< 0,6$ e $< 1,0$ para EM do CYP2C19. Yang et al. (2004) classificam como EM e PM indivíduos com razões de hidroxilação $< 6,0$ e $> 6,0$, respectivamente, enquanto Kim et al. (2004) relatam razões de hidroxilação variando entre 0,42 e 1,81 para indivíduos caucasianos genotipados como CYP2C19*1*1 e de 2,24 a 4,13 para indivíduos genotipados como CYP2C19*1*2. De acordo com os dados reportados, pode-se inferir que todos os voluntários investigados são EM do CYP2C19 (Tabela 3.6).

González et al. (2003) reportam que indivíduos mexicanos com atividade reduzida do CYP3A apresentam log da razão omeprazol/sulfona de omeprazol $> 0,6$, enquanto valores $< 0,6$ indicam atividade normal da enzima e valores $< -0,3$ indicam indução da enzima. Os voluntários incluídos na presente investigação apresentaram log da razão omeprazol/sulfona de omeprazol variando de $-0,3$ a $0,21$ (mediana = $0,12$; Tabela 3.7), indicando que todos os voluntários apresentaram atividade normal do CYP3A.

A análise da atividade *in vivo* do CYP3A também foi avaliada utilizando o midazolam como fármaco marcador (Tabela 3.7). Os voluntários investigados apresentaram *clearance* oral do midazolam entre 10,9 e 149,3 mL/min/Kg, com uma variação na ordem de 14 vezes. Lamba et al. (2002) observaram que 84 % de 148 voluntários sadios, predominantemente caucasianos, investigados apresentaram *clearance* oral do midazolam variando entre 10,0 e 40,0 mL/min/Kg, porém os autores relatam uma variação de 48 vezes no *clearance* oral do midazolam. Boralli et al. (2006) investigaram a atividade *in vivo* do CYP3A em 15 voluntários brasileiros, auto reportados como brancos, utilizando o midazolam como fármaco marcador, obtendo uma variação de 15 a 150 mL/min/Kg, com aproximadamente 73 % dos valores dentro do intervalo relatado por Lamba et al. (2002). No presente

estudo, 67 % dos voluntários investigados apresentaram valores de *clearance* oral do midazolam dentro do intervalo reportado por Lamba et al. (2002).

A Figura 3.4 apresenta a regressão ortogonal entre o *clearance* do midazolam e o log omeprazol/sulfona de omeprazol, com $r = - 0,7544$, sugerindo uma correlação significativa entre as duas variáveis investigadas. Esse dado permite inferir que o log omeprazol/sulfona de omeprazol também pode ser utilizado como marcador da atividade *in vivo* do CYP3A.

A análise da atividade *in vivo* do CYP2D6 (Tabela 3.8) indica que todos os voluntários investigados são EM, pois apresentaram razões metabólicas debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina (DMR) inferiores a 12,6 (mediana = 0,30) e razões de recuperação da debrisoquina superiores a 0,12 (mediana = 0,23). Ismail et al. (2000) reportam valores de DMR para EM variando de 0,08 a 6,68. Cerqueira et al. (2005) investigaram o fenótipo do CYP2D6 em 8 pacientes hipertensos brasileiros, auto reportados como brancos, utilizando a debrisoquina como fármaco marcador, obtendo uma variação de 0,22 a 0,62 para os EM, sendo 1 voluntário denominado como PM (DMR > 200). Pode-se observar que os valores de DMR obtidos na presente investigação estão de acordo com os dados relatados na literatura, com variação de 0,15 a 2,02.

Concluindo, os voluntários sadios ($n = 9$) brasileiros, auto reportados como brancos, foram fenotipados como EM do CYP2D6 e CYP2C19 e apresentaram atividade normal do CYP3A. A análise da regressão ortogonal entre o *clearance* do midazolam e o log da razão de concentrações plasmáticas omeprazol/sulfona de omeprazol sugere que tanto o midazolam quanto o omeprazol podem ser usados como marcadores da atividade do CYP3A na população brasileira auto reportada como branca.

Capítulo 4

*Influência do omeprazol na disposição cinética e no
metabolismo enantiosseletivos do citalopram em
voluntários sadios*

1 INTRODUÇÃO

O citalopram (CITA) é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (5-HT), utilizado no tratamento da depressão. O CITA apresenta pouca afinidade pelos receptores histaminérgicos, muscarínicos e adrenérgicos, resultando em menor incidência de efeitos anticolinérgicos em comparação aos antidepressivos convencionais. O CITA nas doses clinicamente recomendadas é tão efetivo quanto os antidepressivos tricíclicos, tetracíclicos ou outros inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (BAUMANN et al., 2002; ZHENG et al., 2000).

O CITA é disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(S) e (-)-(R)-CITA ou como o enantiômero puro escitalopram [(+)-(S)-CITA]. A ação antidepressiva está relacionada ao eutômero (+)-(S)-CITA e ao seu metabólito ativo (+)-(S)-desmetilcitalopram [(+)-(S)-DCITA]. O (-)-(R)-CITA e seu metabólito (-)-(R)-DCITA são relativamente fracos inibidores seletivos da recaptação de 5-HT. Estudos *in vitro* sugerem que o enantiômero (+)-(S) seja duas vezes mais potente que a mistura racêmica e 100 vezes mais potente que o antípoda (-)-(R)-CITA como inibidor da recaptação de 5-HT (BAUMANN et al., 2002; MOLTKE et al., 2001; ZHENG et al., 2000; OLESEN & LINNET, 1999).

A concentração plasmática máxima do CITA em voluntários sadios tratados com dose única oral de 40 mg ocorre entre 1-4 h após a administração. A biodisponibilidade oral é alta, com valores de aproximadamente 80 %. O volume aparente de distribuição é de 1,2-1,6 L e a ligação do CITA e dos seus metabólitos às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 50-80 %. A meia-vida de eliminação do CITA é de 31-49 h e do seu metabólito N-DCITA é de 78 h (SPIGSET et al., 2000; JOFFE et al., 1998). O CITA é parcialmente excretado na urina inalterado e parcialmente metabolizado no fígado. Estudos com microssomas de fígado humano indicam que o metabolismo do CITA é dependente do CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, monoamina oxidase (MAO) e aldeído oxidase. Aproximadamente 38 % da dose de CITA administrada é excretada na urina sob as formas inalterada ou

conjugada ao ácido glicurônico. Cerca de 19 % da dose é excretada como N-DCITA, 15 % como N-didesmetilcitalopram (DDCITA) ou DDCITA conjugado ao

Figura 4.1: Metabolismo do citalopram no homem (OLESEN & LINNET, 1999).

ácido glicurônico e 7 % como N-oxidocitalopram (CITA-NO). O CITA e os seus metabólitos podem ser desaminados e excretados como derivados do ácido propiônico (CITA-PROP) em quantidades aproximadas de 8 % da dose administrada. Dentre os metabólitos formados, o DCITA é o único que apresenta atividade inibitória sobre a recaptação da 5-HT (Figura 4.1) (ZHENG et al., 2000; OLESEN & LINNET, 1999; CACCIA, 1998).

O CYP3A4, o CYP2C19 e o CYP2D6 estão envolvidos na desmetilação do CITA com metabolismo preferencial do enantiômero (+)-(S)-CITA. A velocidade de formação do DCITA a partir do (+)-(S) é 1,5 vezes maior que a formação a partir do

(-)-(R). A segunda reação de desmetilação e a formação do metabólito CITA-NO são exclusivamente mediadas pela ação do CYP2D6, enquanto o metabólito CITA-PROP é dependente da MAO-A, MAO-B e da aldeído oxidase (BAUMANN et al., 2002; OLESEN & LINNET, 1999).

Estudos em voluntários sadios, fenotipados como metabolizadores extensivos da esparteína e mefenitoína (substratos, respectivamente, do CYP2D6 e CYP2C19) tratados com dose única de 40 mg de CITA racêmico mostram que o enantiômero (+)-(S)-CITA e seus metabólitos [(+)-(S)-DCITA e (+)-(S)-DDCITA] são eliminados mais rapidamente que seus antípodas. As meias-vidas de eliminação do (+)-(S)-CITA, (+)-(S)-DCITA e (+)-(S)-DDCITA são de 31, 42 e 60 h, respectivamente, enquanto para o (-)-(R)-CITA, (-)-(R)-DCITA e (-)-(R)-DDCITA são reportados valores de 47, 65 e 102 h, respectivamente (SHIDU et al., 1997).

A razão enantiomérica S/R relativa a área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) para o CITA e seus metabólitos é menor que a unidade em voluntários sadios, com valores de 0,59, 0,74 e 0,48 para o CITA, o DCITA e o DDCITA, respectivamente. O maior valor da razão S/R para o DCITA pode indicar uma menor influência da enantiosseletividade para este metabólito ou uma menor capacidade de desmetilação do (-)-(R)-CITA em relação ao (+)-(S)-CITA (SHIDU et al., 1997).

A relevância da quiralidade na farmacoterapia é definida principalmente em função do metabolismo, logo qualquer alteração na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo (indução e inibição) dos fármacos em uso na clínica pode modificar a ação farmacológica. Ambos os enantiômeros de um fármaco quiral podem ser metabolizados por uma mesma enzima em diferentes velocidades. A indução ou inibição destas enzimas poderá afetar o metabolismo de ambos os enantiômeros, mas provavelmente em diferentes extensões. Os enantiômeros de um fármaco quiral também podem ser metabolizados por diferentes enzimas e a enantiosseletividade na indução ou inibição é esperada se as enzimas envolvidas

diferirem na resposta aos indutores e inibidores. Os enantiômeros do verapamil são metabolizados pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades. O enantiômero (-)-(S)-verapamil é metabolizado preferencialmente, um processo que resulta em razões de concentrações plasmáticas R/S de aproximadamente 5. A cimetidina preferencialmente inibe o metabolismo do (-)-(S)-verapamil com consequente prolongamento do intervalo PR na associação de verapamil e cimetidina. A warfarina é um fármaco quiral com os enantiômeros metabolizados por diferentes enzimas. O enantiômero S-warfarina é metabolizado pelo CYP2C9 e o enantiômero R-warfarina pelo CYP3A4 e CYP1A2. A atividade farmacológica da warfarina reside no enantiômero S. A associação de warfarina e cimetidina reduz o *clearance* do enantiômero R, mas não influencia o *clearance* do eutômero S. Por outro lado, a sulfipirazona reduz o *clearance* do eutômero S e potencia o efeito da warfarina (MIKUS et al, 1990; TOON et al, 1987 e 1986).

Consequentemente, qualquer alteração na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo pode modificar de maneira enantiosseletiva a disposição cinética dos fármacos quirais. Estudos envolvendo indutores e inibidores do metabolismo de fármacos quirais cujos enantiômeros expressam diferentes atividades farmacológicas podem contribuir na elucidação dos mecanismos de interação de fármacos (KROEMER et al, 1996).

Estudos *in vivo* sugerem que o CITA possui baixo potencial de interação com substratos do CYP3A4. Gutierrez & Abramowitz (2001) relatam que a administração de dose única de 40 mg de CITA racêmico e de 200 mg de cetozonazol, um potente inibidor do CYP3A4, não altera a farmacocinética do CITA. Gutierrez et al. (2003) reportam que a associação de dose única de 20 mg de escitalopram e 600 mg de ritonavir, outro potente inibidor do CYP3A4, não resulta em alterações no perfil farmacocinético do escitalopram.

A participação do CYP2D6 no metabolismo de ambos os enantiômeros do DCITA foi relatada por Herrlin et al. (2003) na investigação de voluntários sadios

metabolizadores lentos (PM), os quais exibem maiores concentrações plasmáticas de (+)-(S)-DCITA e (-)-(R)-DCITA quando comparados com metabolizadores extensivos (EM).

Rudberg et al. (2006) relatam que o metabolismo do CITA racêmico e do escitalopram é reduzido em EM heterozigotos em relação aos EM homozigotos para o CYP2C19. Yin et al. (2006) e Yu et al. (2003) reportam diferenças na disposição cinética do CITA racêmico em voluntários sadios genotipados para o CYP2C19 como EM heterozigotos em relação aos EM homozigotos. Esses estudos demonstram uma relação significativa entre o polimorfismo do CYP2C19 e o metabolismo do CITA. Herrlin et al. (2003) reportam que a AUC do eutômero (+)-(S), mas não do (-)-(R)-CITA, é maior em PM do que em EM suecos do CYP2C19, um dado que sugere maior participação do CYP2C19 no metabolismo do eutômero (+)-(S)-CITA.

O omeprazol é um fármaco muito empregado no tratamento da úlcera péptica como inibidor da bomba de prótons e condições hipersecretórias relacionadas. O omeprazol é um potente inibidor do CYP2C19 com relato de interações farmacocinéticas com outros substratos do CYP2C19, tais como o diazepam e a fenitoína (LI et al., 2004; CARACO et al., 1996).

Yu et al. (2001) relatam que o metabolismo da moclobemida, um substrato do CYP2C19, é inibido pela administração de doses múltiplas de 40 mg de omeprazol em voluntários sadios EM do CYP2C19, resultando em valores semelhantes aos observados em PM. Mallin et al. (2005) reportam que a administração de doses múltiplas de 30 mg de omeprazol resulta em aumento da AUC do escitalopram.

Com base em estudos anteriores que relatam o envolvimento do CYP2C19 de maneira preponderante no metabolismo do eutômero (+)-(S)-CITA e considerando o omeprazol como inibidor do CYP2C19, o presente estudo visa avaliar a influência do omeprazol na disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-CITA e (-)-(R)-CITA em voluntários sadios EM homozigotos para o CYP2C19.

2 OBJETIVO

Avaliar a influência do omeprazol na farmacocinética enantiosseletiva do CITA em voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2C19 e CYP2D6 e com atividade normal do CYP3A.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística e Protocolo clínico

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 11566/2003 – Anexo A). Foram investigados 10 voluntários sadios, adultos (18-45 anos), de ambos os gêneros e auto reportados como brancos (Tabela 4.1). Os voluntários investigados foram fenotipados para o CYP2D6 e CYP2C19, genotipados para o CYP2C19 e caracterizados quanto a atividade *in vivo* do CYP3A. Os voluntários receberam explicação detalhada dos procedimentos e foram incluídos no estudo após a obtenção por escrito do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Tabela 4.1: Voluntários sadios incluídos na investigação.

Voluntário	Gênero	Idade (anos)	IMC (Kg/m ²)	Fenótipo DEBRI	Fenótipo OME	Razão log OME/OME-S	Cl/f MDZ (mL/min/Kg)	Genótipo CYP2C19
1	M	29	23,39	EM	EM	0,12	89,50	CYP2C19*1*1
2	F	23	22,68	EM	EM	0,05	17,89	CYP2C19*1*1
3	F	31	20,55	EM	EM	-0,30	90,70	CYP2C19*1*1
4	M	24	24,22	EM	EM	0,20	16,06	CYP2C19*1*1
5	F	25	20,42	-	-	-	-	CYP2C19*1*1
6	M	27	25,66	EM	EM	0,21	12,13	CYP2C19*1*1
7	M	25	24,19	EM	EM	0,16	10,90	CYP2C19*1*1
8	F	33	33,66	EM	EM	0,21	15,90	-
9	F	36	22,06	EM	EM	0,10	23,27	CYP2C19*1*1
10	F	27	26,13	EM	EM	-0,16	149,30	-

IMC - índice de massa corporal; DEBRI – debrisoquina; OME – omeprazol; OME-S – sulfona de omeprazol; Cl/f MDZ – *clearance* do midazolam; EM – metabolizador extensivo.

No estudo cruzado os voluntários receberam inicialmente dose única de CITA (Fase I) e após um período de *wash out* foram tratados com omeprazol em dose múltipla e CITA em dose única (Fase II).

Na **fase I** do estudo os voluntários em jejum de 12 h, receberam dose única de 20 mg de CITA racêmico (Cipramil[®], Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com 200 mL de água. Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue, a partir de um cateter inserido na veia antecubital e mantido com heparina, nos tempos zero, 1; 1,5; 2,5; 4; 6; 8; 12; 48; 72; 96; 120; 144; 168; 192; 216 e 240 h após a administração do fármaco. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos e os plasmas separados e armazenados a - 70°C até a análise.

A **fase II** da investigação foi realizada após um período de *wash out* de aproximadamente 40 dias da administração do CITA na **fase I**. Na **fase II**, os voluntários receberam durante 18 dias 20 mg de omeprazol (Peprazol[®], Libbs, São Paulo, SP, Brasil) e no oitavo dia também 20 mg de CITA (Cipramil[®], Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Foram coletadas do oitavo ao décimo oitavo dias, amostras de 5 mL de sangue nos tempos zero, 1; 1,5; 2,5; 4; 6; 8; 12; 48; 72; 96; 120; 144; 168; 192; 216 e 240 h após a administração do CITA. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g por 10 min e os plasmas separados e armazenados a - 70°C até a análise.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise enantiosseletiva do CITA e do DCITA

A análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA foi realizada no sistema LC-MS/MS como descrito no Capítulo 1. A separação dos enantiômeros foi obtida na coluna quiral Chiralcel[®] OD-R com fase móvel constituída por acetonitrila:metanol:água (30:30:40 v/v/v) contendo 0,05 % de dietilamina. Para o preparo das amostras, alíquotas de 1mL de plasma foram alcalinizadas e adicionadas de 200 mg de cloreto de sódio e 5 mL da mistura tolueno:álcool isoamílico (9:1 v/v).

Após 30 min de agitação e 10 min de centrifugação, as fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura pelo sistema de evaporação a vácuo. Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel e 100 µL de hexano e, após a centrifugação, 60 µL da fase aquosa foram submetidos a análise cromatográfica. O método foi linear no intervalo de concentração de 0,1 – 20,0 ng de cada enantiômero do CITA e do DCITA por mL de plasma. Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão e a inexatidão foram inferiores a 15 %.

3.2.2 Análise farmacocinética e estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática dos enantiômeros *versus* tempo empregando o programa WinNonlin, versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA). Os cálculos foram realizados com cinética de primeira ordem, modelo monocompartimental e sem inclusão de *lag time*.

Os testes estatísticos foram calculados com auxílio do *software* Graphpad Instat[®] para obtenção da média, mediana e IC 95 %. O teste de Wilcoxon ($P < 0,05$) foi empregado para avaliar as razões enantioméricas de concentrações plasmáticas de CITA e DCITA diferentes da unidade dentro de cada grupo e o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$) para avaliar a influência do omeprazol na farmacocinética enantiosseletiva do CITA.

Os estudos de correlação e as análises de regressão ortogonal foram realizados de acordo com as equações descritas no estudo de Schellens et al. (1988), com auxílio do *software* GMC (Geraldo Maia Campos, GMC – pesquisa biológica, versão 6,6).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo clínico - Fase I

A Figura 4.2 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita durante a fase I do estudo clínico.

Figura 4.2: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA e do DCITA *versus* tempo obtidas na fase I do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, n = 10.

As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam, respectivamente, a disposição cinética dos enantiômeros do CITA e do DCITA na fase I do estudo clínico.

Tabela 4.2: Fase I - Disposição cinética enantiosseletiva do CITA em voluntários sadios. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 10.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA	(+)-(S)-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	6,87* 6,99 (5,53 – 8,44)	6,29 6,18 (4,92 – 7,43)
$t_{\max}$ (h)	5,35* 6,10 (4,22 – 7,99)	4,07 5,19 (3,61 – 6,77)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,17 1,21 (0,75 – 1,67)	1,09 1,16 (0,81 – 1,52)
K_a (h^{-1})	0,60 0,72 (0,47 – 0,97)	0,65 0,71 (0,48 – 0,94)
$t_{1/2\beta}$ (h)	34,94* 39,84 (29,07 – 50,60)	21,41 25,84 (15,00 – 36,70)
β (h^{-1})	0,020* 0,020 (0,014 – 0,025)	0,032 0,040 (0,015 – 0,065)
Vd/f (L/Kg)	18,80* 19,51 (16,25 – 22,76)	19,83 20,60 (17,31 – 23,88)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	405,61* 437,11 (311,28 – 562,95)	225,89 261,27 (139,34 – 383,20)
Cl/f (L/h/Kg)	0,35* 0,39 (0,26 – 0,51)	0,55 0,84 (0,29 – 1,39)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$		0,56 0,56 (0,44 – 0,68)

*P < 0,05, teste de Wilcoxon

Tabela 4.3: Fase I - Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA em voluntários sadios. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 10.

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA	(+)-(S)-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	1,06 0,96 (0,71 – 1,21)	1,61 1,55 (1,15 – 1,95)
$t_{\max}$ (h)	12,79 13,44 (10,91 – 15,98)	10,16 10,91 (7,76 – 14,05)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	122,32 132,98 (79,92 – 186,84)	134,63 142,71 (90,84 – 194,58)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$		1,06 1,23 (0,79 – 1,67)

*P < 0,05, teste de Wilcoxon

As equações de regressão ortogonal e os coeficientes de correlação entre os *clearances* do (-)-(R) e (+)-(S)-CITA e os fenótipos oxidativos tipo debrisoquina e omeprazol e a avaliação *in vivo* do CYP3A estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Equações de regressão ortogonal e coeficientes de correlação entre os *clearances* dos enantiômeros do CITA (Fase I) e os fenótipos oxidativos tipo omeprazol e debrisoquina e avaliação *in vivo* da atividade do CYP3A.

	Cl/f (-)-(R)-CITA	Cl/f (+)-(S)-CITA
Ae DEB/4-OHDEB	$0,2414 + 0,2459 x$ $r = 0,7989^*$	$0,0323 + 1,3731 x$ $r = 0,8537^*$
Ae DEB/(DEB + 4-OHDEB)	$0,0764 + 0,9973 x$ $r = 0,7289^*$	$- 0,9180 + 5,6604 x$ $r = 0,7589^*$
log OME/OH-OME	$0,4158 - 0,3791 x$ $r = - 0,8623^*$	$1,0118 - 2,2067 x$ $r = - 0,7513^*$
log OME/OME-S	$0,4598 - 1,0308 x$ $r = - 0,6108$	$1,2717 - 6,0591 x$ $r = - 0,7223^*$
Cl/f Midazolam	$0,3238 + 0,0014 x$ $r = 0,3978$	$0,6189 + 0,0054 x$ $r = 0,3363$

Cl/f – *clearance*; DEB – debrisoquina; 4-OHDEB – 4-hidroxi-debrisoquina; OME – omeprazol; OH-OME – hidroxiomeprazol; OME-S – sulfona de omeprazol.

* Há correlação ao nível de significância de 5 % ($P < 0,05$)

4.2 Estudo clínico - Fase II

A Figura 4.3 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA e do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita obtidas na fase II do estudo clínico.

Figura 4.3: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA e do DCITA *versus* tempo obtidas na fase II do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, n = 10.

A disposição cinética dos enantiômeros do CITA e do DCITA obtida na fase II do estudo clínico está apresentada nas Tabelas 4.5 e 4.6, respectivamente.

Tabela 4.5: Fase II - Disposição cinética enantiosseletiva do CITA em voluntários sadios. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 10.

Parâmetro	(-)-(R)-CITA	(+)-(S)-CITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	7,50* 8,15 (6,00 – 10,30)	8,17 9,44 (6,65 – 12,23)
$t_{\max}$ (h)	4,82 4,86 (3,36 – 6,36)	5,22 5,32 (3,44 – 7,20)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,79 0,88 (0,54 – 1,22)	0,92 1,10 (0,56 – 1,63)
K_a (h^{-1})	0,89 1,15 (0,51 – 1,79)	0,78 1,07 (0,41 – 1,73)
$t_{1/2\beta}$ (h)	38,90* 41,19 (35,87 – 46,52)	32,83 32,00 (24,31 – 39,69)
β (h^{-1})	0,018* 0,017 (0,015 – 0,019)	0,021 0,025 (0,017 – 0,032)
Vd/f (L/Kg)	17,44* 18,49 (12,59 – 24,39)	13,46 16,27 (9,68 – 22,86)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	512,87 524,34 (386,67 – 662,01)	547,30 488,04 (329,17 – 646,91)
Cl/f (L/h/Kg)	0,28 0,32 (0,20 – 0,45)	0,29 0,39 (0,22 – 0,51)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,96 0,91 (0,74 – 1,08)	

*P < 0,05, teste de Wilcoxon

Tabela 4.6: Fase II - Disposição cinética enantiosseletiva do DCITA em voluntários sadios. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 10.

Parâmetro	(-)-(R)-DCITA	(+)-(S)-DCITA
$C_{\max}$ (ng/mL)	1,02 1,93 (0,46 – 3,39)	1,21 1,46 (1,00 – 1,92)
$t_{\max}$ (h)	7,70 10,56 (5,22 – 15,91)	9,97 13,76 (3,89 – 23,64)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	194,55 212,73 (83,58 – 341,89)	162,82 202,65 (111,42 – 293,88)
$AUC_{(S)}/AUC_{(R)}$	0,92 1,04 (0,49 – 1,60)	

*P < 0,05, teste de Wilcoxon

4.3 Estudo clínico - Fase I versus Fase II

As curvas de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do CITA em função dos diferentes tempos de colheita obtidas nas fases I e II do estudo clínico estão apresentadas na Figura 4.4.

Figura 4.4: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do CITA *versus* tempo obtidas nas fases I e II do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, n = 10.

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros (-)-(R)-CITA e (+)-(S)-CITA, obtidos nas fases I e II do estudo clínico, estão apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8, respectivamente.

Tabela 4.7: Disposição cinética do (-)-(R)-CITA obtida nas fases I e II do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %).

Parâmetro	Fase I	Fase II
$C_{\max}$ (ng/mL)	6,87 6,99 (5,53 – 8,44)	7,50 8,15 (6,00 – 10,30)
$t_{\max}$ (h)	5,35 6,10 (4,22 – 7,99)	4,82 4,86 (3,36 – 6,36)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,17 1,21 (0,75 – 1,67)	0,79 0,88 (0,54 – 1,22)
K_a (h^{-1})	0,60 0,72 (0,47 – 0,97)	0,89 1,15 (0,51 – 1,79)
$t_{1/2\beta}$ (h)	34,94 39,84 (29,07 – 50,60)	38,90 41,19 (35,87 – 46,52)
β (h^{-1})	0,020 0,020 (0,014 – 0,025)	0,018 0,017 (0,015 – 0,019)
V_d/f (L/Kg)	18,80 119,51 (16,25 – 22,76)	17,44 18,49 (12,59 – 24,39)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	405,61 437,11 (311,28 – 562,95)	512,87 524,34 (386,67 – 662,01)
Cl/f (L/h/Kg)	0,35 0,39 (0,26 – 0,51)	0,28 0,32 (0,20 – 0,45)
$AUC_{(Fase\ I)}/AUC_{(Fase\ II)}$	0,84 0,85 (0,73 – 0,97)	

*P < 0,05, teste de Mann-Whitney

Tabela 4.8: Disposição cinética do (+)-(S)-CITA obtida nas fases I e II do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %).

Parâmetro	Fase I	Fase II
$C_{\max}$ (ng/mL)	6,29 6,18 (4,92 – 7,43)	8,17* 9,44 (6,65 – 12,23)
$t_{\max}$ (h)	4,07 5,19 (3,61 – 6,77)	5,22 5,32 (3,44 – 7,20)
$t_{1/2\ \alpha}$ (h)	1,09 1,16 (0,81 – 1,52)	0,92 1,10 (0,56 – 1,63)
K_a (h^{-1})	0,65 0,71 (0,48 – 0,94)	0,78 1,07 (0,41 – 1,73)
$t_{1/2\ \beta}$ (h)	21,41 25,84 (15,00 – 36,70)	32,83 32,00 (24,31 – 39,69)
β (h^{-1})	0,032 0,040 (0,015 – 0,065)	0,021 0,025 (0,017 – 0,032)
Vd/f (L/Kg)	19,83 20,60 (17,31 – 23,88)	13,46 16,27 (9,68 – 22,86)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	225,89 261,27 (139,34 – 383,20)	547,30* 488,04 (329,17 – 646,91)
Cl/f (L/h/Kg)	0,55 0,84 (0,29 – 1,39)	0,29* 0,37 (0,22 – 0,51)
$AUC_{(Fase\ I)}/AUC_{(Fase\ II)}$	0,56 0,57 (0,37 – 0,77)	

*P < 0,05, teste de Mann-Whitney

As curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do DCITA em função dos diferentes tempos de colheita, obtidas nas fases I e II do estudo clínico, estão apresentadas na Figura 4.5.

Figura 4.5: Curvas de concentração plasmática dos enantiômeros do DCITA *versus* tempo obtidas nas fases I e II do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, n = 10.

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros (-)-(R) e (+)-(S)-DCITA obtidos nas fases I e II do estudo clínico estão apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10, respectivamente.

Tabela 4.9: Disposição cinética do (-)-(R)-DCITA obtida nas fases I e II do estudo clínico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 10.

Parâmetro	Fase I	Fase II
$C_{\max}$ (ng/mL)	1,06 0,96 (0,71 – 1,21)	1,02 1,93 (0,46 – 3,39)
$t_{\max}$ (h)	12,79 13,44 (10,91 – 15,98)	7,70 10,56 (5,22 – 15,91)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	122,32 132,98 (79,92 – 186,84)	194,55 212,73 (83,58 – 341,89)
$AUC_{(Fase I)}/AUC_{(Fase II)}$	0,81 1,14 (0,22 – 2,06)	

*P < 0,05, teste de Mann-Whitney

Tabela 4.10: Disposição cinética do (+)-(S)-DCITA obtida nas fases I e II. Dados apresentados como mediana, média (IC 95 %), n = 10.

Parâmetro	Fase I	Fase II
$C_{\max}$ (ng/mL)	1,61 1,55 (1,15 – 1,95)	1,21 1,46 (1,00 – 1,92)
$t_{\max}$ (h)	10,16 10,91 (7,76 – 14,05)	9,97 13,76 (3,89 – 23,64)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	134,63 142,71 (90,84 – 194,58)	162,82 202,65 (111,42 – 293,88)
$AUC_{(Fase I)}/AUC_{(Fase II)}$	0,82 0,72 (0,44 – 0,99)	

*P < 0,05, teste de Mann-Whitney

As razões da $AUC_{S/R}$ do CITA e do DCITA obtidas nas fases I e II do estudo clínico estão apresentadas na Figura 4.6.

Figura 4.6: Razões da $AUC_{S/R}$ do CITA e do DCITA obtidas nas fases I e II do estudo clínico.

* $P < 0,05$, teste de Mann-Whitney

As razões da AUC DCITA/CITA relativas aos enantiômeros (-)-(R) e (+)-(S), obtidas nas fases I e II do estudo clínico, estão apresentadas na Figura 4.7.

Figura 4.7: Razões de AUC DCITA/CITA relativas aos enantiômeros (-)-(R) e (+)-(S), obtidas nas fases I e II do estudo clínico.

*P < 0,05, teste de Mann-Whitney

5 DISCUSSÃO

O estudo investiga a influência do omeprazol na farmacocinética enantiosseletiva do CITA em voluntários sadios (n=10) fenotipados como EM para o CYP2C19 ($\log \text{ OME/OH-OME} < 0,6$), genotipados como homozigotos para o alelo CYP2C19*1/*1 e fenotipados como EM para o CYP2D6 (razão metabólica $\text{Ae DEB/4-OHDEB} < 12,6$) e com atividade do CYP3A caracterizada *in vivo* como normal com base no *clearance* oral do midazolam (10,90-149,30 mL/min/Kg) e da razão $\log \text{ OME/OME-S} < 0,6$ (Tabela 4.1).

No estudo cruzado, os voluntários sadios receberam inicialmente dose única de 20 mg de CITA racêmico (fase I) e após um período de *wash out* de pelo menos 40 dias, os voluntários foram tratados com doses diárias de 20 mg de omeprazol durante 18 dias, sendo que no oitavo dia do tratamento com o omeprazol também receberam dose única oral de 20 mg de CITA racêmico (fase II).

A disposição cinética do CITA é enantiosseletiva na ausência de tratamento com o omeprazol (fase I) com observação de maior proporção plasmática do enantiômero (-)-(R)-CITA; Figura 4.2. A razão de $\text{AUC}_{\text{S/R}}$ obtida para o CITA foi de 0,56 (Tabela 4.2), um valor próximo aos dados observados por Carlsson et al. (2001) e por Herrlin et al. (2003) que relatam, respectivamente, razões $\text{AUC}_{\text{S/R}}$ de 0,59 e 0,61. Os dados apresentados na Tabela 4.2 exibem maiores valores ($P < 0,05$) de C_{max} (6,87 vs 6,29 ng/mL) e AUC (405,61 vs 225,89 ng.h/mL) e menores valores ($P < 0,05$) de *clearance* (0,35 vs 0,55 L/h/Kg) para o enantiômero (-)-(R)-CITA. Sidhu et al. (1997) reportam valores de *clearance* oral do (-)-(R)-CITA de $0,26 \pm 0,06$ L/h/Kg em estudo de administração do CITA racêmico durante 21 dias a 10 voluntários sadios. A meia-vida de eliminação de 34,94 h (Tabela 4.2) obtida na presente investigação para o (-)-(R)-CITA também é próxima aos valores de $46,9 \pm 10,6$ h reportados por Sidhu et al. (1997) em estudo de dose múltipla. O volume aparente de distribuição do (-)-(R)-CITA é menor ($P < 0,05$) do que aquele obtido para o seu antípoda (+)-(S)-CITA (18,8 vs 19,83 L/Kg); Tabela 4.2. O menor

volume aparente de distribuição para o enantiômero (-)-(R)-CITA também foi observado na investigação relatada por Sidhu et al. (1997) em estudo de administração do CITA racêmico em dose múltipla ($16,4 \pm 4,5$ vs $18,3 \pm 4,7$ L/Kg).

A razão de $AUC_{S/R}$ obtida na fase I do estudo clínico para o metabólito DCITA foi de 1,06 indicando ausência de enantiosseletividade (Tabela 4.3). Os valores de AUC obtidos para o (-)-(R)-DCITA e (+)-(S)-DCITA ($122,32$ vs $134,63$ ng.h/mL) não diferem entre si provavelmente em função do DCITA ser um metabólito intermediário e portanto com concentrações plasmáticas dependentes do metabolismo do CITA a DCITA e do DCITA a DDCITA. Carlsson et al. (2001) e Herrlin et al. (2003) relatam razões de $AUC_{S/R}$ para o DCITA também próximas a unidade, com valores de 0,82 e 0,89, respectivamente.

O metabolismo do (+)-(S)-CITA a (+)-(S)-DCITA em microsomas de fígado humano é dependente do CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4, com contribuições, relativas no *clearance* intrínseco, após a normalização de abundância hepática, respectivamente, de 37 %, 28 % e 35 % (MOLTKE et al., 2001). A investigação da relação existente entre os *clearances* dos enantiômeros do CITA *versus* o fenótipo oxidativo tipo debrisoquina e omeprazol e a atividade *in vivo* do CYP3A exigiu a aplicação da análise de regressão ortogonal em razão de ambas as variáveis estarem sujeitas a erros (Tabela 4.4).

No entanto, os dados apresentados na Tabela 4.4 não indicam a existência de correlação ($P \geq 0,05$) apenas entre os *clearances* dos enantiômeros do CITA e os fármacos marcadores da atividade *in vivo* do CYP3A (midazolam e omeprazol). Os voluntários sadios incluídos na presente investigação apresentaram *clearance* oral do midazolam variando de 10,90 - 149,30 mL/min/Kg (Tabela 4.1), ou seja, com atividade *in vivo* do CYP3A variando em aproximadamente 15 vezes. A inexistência da correlação sugere que a atividade do CYP3A não influencia a farmacocinética dos enantiômeros do CITA. Yu et al. (2003) avaliaram a influência da atividade do CYP3A no metabolismo do CITA em voluntários sadios EM para o CYP2C19

administrando troleandomicina como inibidor do CYP3A. Os autores não observaram diferenças na farmacocinética do CITA como mistura enantiomérica nas situações de presença ou ausência do inibidor e concluíram que a participação *in vivo* do CYP3A no metabolismo do CITA não é significativa.

Moltke et al. (2001) relatam contribuição de 28 % do CYP2D6 no metabolismo do (+)-(S)-CITA a (+)-(S)-DCITA em microsomas de fígado humano, Os dados apresentados na Tabela 4.4 indicam a existência de correlação ($P < 0,05$) entre os *clearances* dos enantiômeros do CITA e as razões de recuperação e metabólica da debrisoquina. A existência da correlação infere a participação do CYP2D6 no metabolismo dos enantiômeros do CITA em voluntários sadios fenotipados como EM. Herrlin et al. (2003) não observaram diferenças na farmacocinética de ambos os enantiômeros do CITA entre voluntários sadios suecos fenotipados como EM e PM para o CYP2D6 (debrisoquina como fármaco marcador).

Aproximadamente 37 % do metabolismo do (+)-(S)-CITA a (+)-(S)-DCITA em microsomas de fígado humano é dependente do CYP2C19 (MOLTKE et al., 2001). Os dados apresentados na Tabela 4.4 indicam a existência de correlação ($P < 0,05$) entre os *clearances* dos enantiômeros do CITA e a razão metabólica do omeprazol, inferindo a participação do CYP2C19 no metabolismo de ambos os enantiômeros do CITA. Yin et al. (2006) reportam que voluntários sadios chineses PM para o CYP2C19 exibem redução de 42,95 % no *clearance* oral do CITA quando comparados com voluntários sadios chineses homozigotos EM para o CYP2C19.

A administração de CITA racêmico a voluntários sadios em tratamento com o omeprazol (fase II) exibe perda da enantiosseletividade na farmacocinética do CITA (Figura 4.3). A razão de $AUC_{S/R}$ foi de 0,96 para o CITA (Tabela 4.5) e de 0,92 para o DCITA (Tabela 4.6). Ressalta-se, no entanto, que não foram observadas diferenças entre as fases I e II do estudo para os parâmetros farmacocinéticos

referentes ao (-)-(R)-CITA; Tabela 4.7 e Figura 4.4. A perda da enantiosseletividade na fase II do estudo está relacionada a inibição do omeprazol somente no metabolismo do eutômero (+)-(S)-CITA. Os dados apresentados na Tabela 4.8 mostram que a administração de omeprazol em regime de dose múltipla resulta em redução do *clearance* oral do (+)-(S)-CITA de aproximadamente 50% (0,55 vs 0,29 L/h/Kg). No estudo experimental apresentado no Capítulo 2, o grupo de ratos tratados com fluvoxamina, inibidor do CYP2C1 e CYP1A, também mostrou inibição no metabolismo somente do enantiômero (+)-(S)-CITA. A inibição do omeprazol no *clearance* oral do escitalopram foi anteriormente relatada por Malling et al. (2005). Os autores reportam aumento de 51% nos valores de AUC quando voluntários sadios foram tratados com dose única de 20 mg de escitalopram [S-(+)-CITA] após a administração de omeprazol (30 mg/dia) durante 6 dias. A razão de $AUC_{S/R}$ foi significativamente maior na fase II do estudo (0,56 vs 0,96; Figura 4.6), indicando maior proporção plasmática do eutômero (+)-(S)-CITA.

Os valores de AUC obtidos para o (-)-(R)-DCITA e (+)-(S)-DCITA na fase II do estudo não apresentaram diferenças entre si (194,55 vs 162,82 ng.h/mL; Tabela 4.6). Ressalta-se que não foram observadas diferenças entre as fases I e II do estudo para os enantiômeros do DCITA (Tabelas 4.9 e 4.10). As razões de $AUC_{S/R}$ para o DCITA na fase II também não apresentam diferenças em relação aos valores obtidos na fase I (1,06 vs 0,92); Figura 4.6.

O omeprazol é considerado um potente inibidor competitivo do CYP2C19 e um fraco inibidor do CYP3A e do CYP2D6 em microssomas de fígado humano (KO et al., 1997). Logo, a inibição do CYP2C19 pelo omeprazol parece explicar a redução do *clearance* oral do eutômero (+)-(S)-CITA relatada na presente investigação. A inibição enantiosseletiva causada pelo omeprazol no metabolismo do CITA exemplifica a importância do emprego de métodos enantiosseletivos na avaliação da disposição cinética de fármacos quirais. Os dados apresentados na

Figura 4.7 mostram que o omeprazol reduz a razão de AUC DCITA/CITA somente para o enantiômero (+)-(S) (0,50 vs 0,39).

A inibição causada pelo omeprazol no metabolismo enantiosseletivo do CITA pode ser comparada com as diferenças observadas na farmacocinética do CITA entre voluntários sadios EM e PM para o CYP2C19. Herrlin et al. (2003) reportam que os valores de AUC do enantiômero (+)-(S)-CITA são 57 % maiores em voluntários sadios suecos fenotipados como PM para o CYP2C19 do que em EM para o CYP2C19. No entanto, os autores também relatam que em termos do enantiômero (-)-(R)-CITA não foram observadas diferenças entre EM e PM. Os autores sugerem maior participação do CYP2C19 no metabolismo do (+)-(S)-CITA quando comparado ao (-)-(R)-CITA. Esse dado pode explicar os resultados obtidos na presente investigação, ou seja, o omeprazol sendo um potente inibidor do CYP2C19, reduz o *clearance* somente do enantiômero (+)-(S)-CITA considerando que ambos os enantiômeros são metabolizados pelo CYP2C19 em diferentes velocidades. Rudberg et al. (2006) reportam maiores razões de concentrações plasmáticas CITA/DCITA e maiores razões concentração plasmática CITA/dose em pacientes heterozigotos do que em homozigotos EM para o CYP2C19, refletindo redução na capacidade de N-desmetilação em pacientes heterozigotos EM. Os autores ainda relatam maiores diferenças nas razões concentração plasmática CITA/dose para o enantiômero (+)-(S)-CITA (5,3 vs 2,6) do que para a mistura enantiomérica (8,0 vs 4,9) quando pacientes heterozigotos EM são comparados com pacientes homozigotos EM, sugerindo preponderância do CYP2C19 no metabolismo do (+)-(S)-CITA.

Concluindo, a administração de omeprazol em doses múltiplas a voluntários sadios inibe de maneira enantiosseletiva o metabolismo do eutômero (+)-(S)-CITA com aumento das concentrações plasmáticas em aproximadamente 140 %. Yu et al. (2003) comparam a farmacocinética do CITA em voluntários sadios chineses PM e EM para o CYP2C19 e relatam aumento da AUC em voluntários PM de 22,7 %. Os

autores ressaltam que um dos voluntários PM manifestou náuseas, vômitos e sonolência 1 h após a administração de 40 mg de CITA racêmico. Pacientes tratados com CITA racêmico em doses múltiplas de 20-60 mg/dia exibem concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio de (+)-(S)-CITA variando de 9,0-200,0 ng/mL e de (+)-(S)-DCITA de 4,0-38,0 ng/mL. No entanto, o intervalo de concentrações plasmáticas de CITA relacionado com o máximo de eficácia e o mínimo risco da manifestação de efeitos adversos ainda não se encontra estabelecido (RASMUSSEN & BROSEN, 2000; BLOCH et al., 2003). Estudos relacionando concentrações plasmáticas do (+)-(S)-CITA e (+)-(S)-DCITA com eficácia clínica são necessários na avaliação da relevância clínica relacionada ao aumento das concentrações plasmáticas de (+)-(S)-CITA na associação com omeprazol.

Conclusões

CONCLUSÕES

- Os limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do CITA e do DCITA em plasma humano e de rato são concordantes com a aplicação em estudo clínico e experimental de disposição cinética de dose única.
- A disposição cinética do CITA é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do distômero (-)-(R)-CITA em ratos Wistar tratados ou não com quinidina ou cetoconazol. Os ratos Wistar tratados com fluvoxamina exibem perda da enantiosseletividade na farmacocinética do CITA.
- Os ratos Wistar tratados com fluvoxamina ou cetoconazol, quando comparados ao grupo controle, exibem acúmulo plasmático somente do eutômero (+)-(S)-CITA.
- Os limites de confiança do método de análise do omeprazol e dos metabólitos hidroxiomeprazol e sulfona de omeprazol em plasma são concordantes com a aplicação em estudo clínico de avaliação da atividade *in vivo* do CYP2C19 e CYP3A.
- Os voluntários sadios incluídos na investigação foram fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2C19 (omeprazol como fármaco marcador), CYP2D6 (debrisoquina como fármaco marcador), genotipados como CYP2C19*1*1 e caracterizados como portadores de atividade normal do CYP3A (midazolam e omeprazol como fármacos marcadores).

- Os voluntários sadios, metabolizadores extensivos do CYP2C19 e do CYP2D6 e com atividade normal do CYP3A, apresentaram enantiosseletividade na disposição cinética do CITA com acúmulo plasmático do distômero (-)-(R)-CITA.

- O omeprazol inibiu de forma enantiosseletiva o metabolismo do CITA em voluntários sadios, metabolizadores extensivos do CYP2C19 e do CYP2D6 e com atividade normal do CYP3A, levando ao acúmulo do eutômero (+)-(S)-CITA.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial**, 30 de maio de 2003.
02. ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T.G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E.; TANUM, L.; REFSUM, H. Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v. 33, p. 263-73, 2003.
03. APELQVIST, G.; WIKELL, C.; CARLSSON, B.; HJORTH, S.; BERGQVIST, P.B.F.; AHLNER, J.; BENGTSSON, F. Dynamic and kinetic effects of chronic citalopram treatment in experimental hepatic encephalopathy. **Clin. Neuropharmacol.**, Philadelphia, v. 23, p. 304-317, 2000.
04. BARAKAT, N.; SABRY, A.; EL-AGROUDY, A.; HAWAS, S.; ABDEL-MABOUD, M.; EL-SHAIR, M.A.; GHONEIM, M.A. Co-administration of ketoconazole and tacrolimus therapy: a transplanted rat model. **Int. Urol. Nephrol.**, Budapest, v. 37, p. 633-639, 2005.
05. BAUMANN, P.; ZULLINO, D.F.; EAP, C.B. Enantiomers' potencial in psychopharmacology – a critical analisys with special emphasis on the antidepressant escitalopram. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, Amsterdam, v. 12, p. 433-444, 2002.
06. BERNARD, S.; NEVILLE, K.A.; NGUYEN, A.T.; FLOCKHART, D.A. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in U.S. population: clinical implications. **The Oncologist**, Durham, v. 11, p. 129-135, 2006.
07. BERTILSSON, L.; DAHL, M-L.; DALÉN, P.; AL-SHURBAJI, A. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 53, p. 111-122, 2002.
08. BLACK, R.S.; ORDWAY, T.J.; HAVEL, J.A.; BADENHORST, D.; PERKINS, J.R. The determination of omeprazole and metabolites using LC/MS/MS. **Advion Biosciences Inc.** Disponível em: <<http://www.advion.com>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2007.

09. BLOC'H, Y.L.; WOGGON, B.; WEISSENRIEDER, H.; BRAWAND-AMEY, M.; SPAGNOLI, J.; EAP, C.B.; BAUMANN, P. Routine therapeutic drug monitoring in patients treated with 10-360 mg/day citalopram. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 25, p. 600-608, 2003.
10. BONDOLFI, G.; CHAUTEMS, C.; ROCHAT, B.; BERTSCHY, G.; BAUMANN, P. Non-response to citalopram in depressive patients: pharmacokinetic and clinical consequences of a fluvoxamine augmentation. **Psychopharmacology (Berl.)**, Berlin, v. 128, p. 421-425, 1996.
11. BONNABRY, P.; SIERVING, J.; LEEMANN, T.; DAYER, P. Quantitative Drug Interactions Prediction System (Q-DIPS) A dynamic computer-based method to assist in the choice of clinically relevant *in vivo* studies. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 40, p. 631-640, 2001.
12. BORALLI, V.B. **Farmacocinética-Farmacodinâmica e Estereosseletividade no metabolismo do metoprolol: estudo experimental e investigação de voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes melito.** 2006. 161 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
13. BÖTTIGER, Y. Use of omeprazole sulfone in a single plasma sample as a probe for CYP3A4. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 62, p. 621-625, 2006.
14. BRØSEN, K.; NARANJO, C.A. Review of pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction studies with citalopram. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, Amsterdam, v. 11, p. 275-283, 2001.
15. CACCIA, S. Metabolism of the newer antidepressants. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 34, p. 281-302, 1998.
16. CARACO, Y.; WILKINSON, G. R.; WOOD, A.J.J. Differences white subjects and Chinese subjects in the *in vivo* inhibition of cytochrome P450s 2C19, 2D6, and 3A4 by omeprazole. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis v. 60, p. 396-404, 1996.
17. CARLSSON, B.; OLSSON, G.; REIS, M.; WALINDER, J.; NORDIN, C.; LUNDMARK, J.; SCORDO, M.G.; DAHL, M-L.; BENGTSSON, F.; AHLNER, J. Enantioselective analysis of citalopram and metabolites in adolescents. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 23, p. 658-664, 2001.

18. CARVALHO-SILVA, D.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D.J. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 68, p. 281-286, 2001.
19. CASCORBI, I. Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. **Eur. J. Clin. Investig.**, Berlin, v. 33, p. 17-22, 2003.
20. CERQUEIRA, P.M.; COELHO, E.B.; GELEILETE, T.J.M.; GOLDMAN, G.H.; LANCHOTE, V.L. Influence of chronic renal failure on stereoselective metoprolol metabolism in hypertensive patients. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v. 45, p. 1422-1433, 2005.
21. CERQUEIRA, P.M.; MATEUS, F.H.; CESARINO, E.J.; LANCHOTE, V.L. Enantioselectivity of debrisoquine 4-hydroxylation in Brazilian Caucasian hypertensive patients phenotyped as extensive metabolizers. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v. 749, p. 153-161, 2000.
22. CHOW, T.; IMAOKA, S.; HIROI, T.; FUNAE, Y. Developmental changes in the catalytic activity and expression of CYP2D isoforms in the rat liver. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 27, p. 188-192, 1999.
23. CHRISTENSEN, M.; TYBRING, G.; MIHARA, K.; YASUI-FUROKORI, N.; CARRILLO, J.A.; RAMOS, S.I.; ANDERSSON, K.; DAHL, M-L.; BERTILSSON, L. Low daily 10-mg and 20-mg doses of fluvoxamine inhibit the metabolism of both caffeine (cytochrome P4501A2) and omeprazole (cytochrome P4502C19). **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 71, p. 141-152, 2002.
24. DALGAARD, L.; LARSEN, C. Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acyl- and N-glucuronides. **Xenobiotica**, London, v. 29, p. 1033-1041, 1999.
25. DALY, A.K. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 45, p. 13-31, 2006.
26. DANIEL, W.A.; SYREK, M.; HADUCH, A.; WÓJCIKOWSKI, J. The effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on the pharmacokinetics and metabolism of perazine in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 53, p. 449-461, 2001.
27. DANIEL, W.A.; SYREK, M.; WÓJCIKOWSKI, J. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on the plasma and brain pharmacokinetics of the

- simplest phenothiazine neuroleptic promazine in the rat. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, Amsterdam, v. 9, p. 337-344, 1999.
28. DESTA, Z.; ZHAO, X.; SHIN, J-G.; FLOCKHART, D.A. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. **Clin. Pharmacokinet**, Auckland, v. 41, p. 913-958, 2002.
 29. DI MARCO, A.; YAO, D.; LAUFER, R. Demethylation of radiolabelled dextromethorphan in rat microsomes and intact hepatocytes. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 270, p. 3768-3777, 2003.
 30. DORNE, J.L.C.M.; WALTON, K.; SLOB, W.; RENWICK, A.G. Human variability in polymorphic CYP2D6 metabolism: is the kinetic default uncertainly factor adequate? **Food Chem. Toxicol.**, New York, v. 40, p. 1633-1656, 2002.
 31. DUBUC, M-C.; HAMEL, C.; CAUBET, M.S.; BRAZIER, J.L. A rapid HPLC-DAD method for separation and determination of omeprazole extracted from human plasma. **J. Liq. Chromatogr.**, New York, v. 24, p. 1161-1169, 2001.
 32. EVANS, A.M.; NATION, R.L.; SANSOM, L.N.; BOCHNER, F.; SOMOGYI, A.A. Stereoselective drug disposition: potential for misinterpretation of drug disposition data. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 26, p. 771-780, 1988.
 33. FRERICHS, V.A.; ZARANEK, C.; HAAS, C.E. Analysis of omeprazole, midazolam and hydroxy-metabolites in plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 824, p. 71-80, 2005.
 34. GHARAVI, N.; SATTARI, S.; SHAYEGANPOUR, A.; ELKADI, A.O.S.; BROCKS, D.R. The stereoselective metabolism of halofantrine to desbutylhalofantrine in the rat: evidence of tissue-specific enantioselectivity in microsomal metabolism. **Chirality**, New York, v. 19, p. 22-33, 2007.
 35. GOLDSTEIN, J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 52, p. 349-355, 2001.
 36. GONZÁLEZ, H.M.; ROMERO, E.M.; CHAVEZ, T.J.; PEREGRINA, A.A.; CHÁVEZ, T.J.; ESCOBAR-ISLAS, E.; LOZANO, F.; HOYO-VADILLO, C.

- CYP2C19 and CYP3A4-dependent omeprazole metabolism in west mexicans. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v. 43, p. 1211-1215, 2003.
37. GONZÁLEZ, H.M.; ROMERO, E.M.; CHAVEZ, T.J.; PEREGRINA, A.A.; QUEZADA, V.; HOYO-VADILLO, C. Phenotype of CYP2C19 and CYP3A4 by determination of omeprazole and its two main metabolites in plasma using liquid chromatography with liquid-liquid extraction. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v. 780, p. 459-465, 2002.
 38. GRAM, L.F.; HANSEN, M.G.; SINDRUP, S.H.; BROSEN, K.; POULSEN, J.H.; AAES-JORGENSEN, T.; OVERO, K.F. Citalopram: interaction studies with levoprometazine, imipramine, and lithium. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 15, p. 18-24, 1993.
 39. GRANVIL, C.P.; KRAUSZ, K.W.; GELBOIN, H.V.; IDLE, J.R.; GONZALEZ, F.J. 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP2D6 and its inhibition by quinidine and quinine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 301, p.1025-1032, 2002.
 40. GUTIERREZ, M.; ABRAMOWITZ, W. Lack of effect of a single dose of ketoconazole on the pharmacokinetics of citalopram. **Pharmacotherapy**, Boston, v. 21, p. 163-168, 2001.
 41. GUTIERREZ, M.M.; ROSENBERG, J.; ABRAMOWITZ, W. An evaluation of the potential pharmacokinetic interaction between escitalopram and the cytochrome P450 3A4 inhibitor ritonavir. **Clin. Ther.**, Belle Mead, v. 25, p. 1200-1209, 2003.
 42. HARTTER, S.; ARAND, M.; OESCH, F.; HIEMKE, C. Non-competitive inhibition of clomipramine N-demethylation by fluvoxamine. **Psychopharmacology (Berl.)**, Berlin, v. 117, p. 149-153, 1995.
 43. HASLER, J.A.; ESTABROOK, R.; MURRAY, M.; PIKULEVA, I.; WATERMAN, M.; CAPDEVILA, J.; HOLLA, V.; HELVIG, C.; FALCK, J.R.; FARREL, G.; KAMINSKY, L.S.; SPIROVACK, S.D.; BOITIER, E.; BEAUNE, P. Human cytochromes P450. **Mol. Aspects Med.**, Oxford, v. 20, p. 1-137, 1999.
 44. HAUPT, D. Determination of citalopram enantiomers in human plasma by liquid chromatographic separation on a chiral-AGP column. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.**, Amsterdam, v. 685, p. 299-305, 1996.

45. HERRLIN, K.; MASSELE, A.Y.; JANDE, M.; ALM, C.R.N.; TYBRING, G.; ABDI, Y.A.; WENNERHOLM, A.; JOHANSSON, I.; DAHL, M-L.; BERTILSSON, L.; GUSTAFSSON, L. Bantu Tanzanians have a decreased capacity to metabolize omeprazole and mephenytoin in relation to their CYP2C19 genotype. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 64, p. 391-401, 1998.
46. HERRLIN, K.; YASUI-FURUKORI, N.; TYBRING, G.; WIDÉN, J.; GUSTAFSSON, L.L.; BERTILSSON, L. Metabolism of citalopram enantiomers in CYP2C19/CYP2D6 phenotyped panels of healthy Swedes. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 56, p. 415-421, 2003.
47. HOFMANN, U.; SCHWAB, M.; TREIBER, G.; KLOTZ, U. Sensitive quantification of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 831, p. 85-90, 2006.
48. HOME PAGE of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Disponível em: <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>> Acesso em: 01 de Março de 2007.
49. HYTTEL, J.; BØGESØ, K.P.; PERREGAARD, J.; SÁNCHEZ, C. The pharmacological effect of citalopram resides in the (S)-(+)-enantiomer. **J. Neural. Transm. Gen. Sect.**, Wien, v. 88, p. 157-160, 1992.
50. IDBORG H.; EDLUND P.O.; JACOBSSON S.P. Multivariate approaches for efficient detection of potential metabolites from liquid chromatography/mass spectrometry data. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 18, p. 944-954, 2004.
51. IDBORG-BJÖRKMAN, H.; EDLUND, P.O.; KVALHEIM, O.M.; SCHUPPE-KOISTINEN, I.; JACOBSSON S.P. Screening of biomarker in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis. **Anal. Chem.**, Washington, v. 75, p. 4784-4792, 2003.
52. INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **Pharmacogenomics J.**, Avenet, v. 5, p. 6-13, 2005.
53. INGELMAN-SUNDBERG, M.; ORCARSON, M.; McLELLAN, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Tips**, Cambridge, v. 20, p. 342-349, 1999.

54. INGELMAN-SUNDBERG, M.; RODRIGUEZ-ANTONA, C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. **Phil. Trans. R. Soc. B**, London, v. 360, p. 1563-1570, 2005.
55. ISMAIL, R.; HUSSEIN, A.; TEH, L.K.; ISA, M.N. CYP2D6 phenotypes among malays in Malaysia. **J. Clin. Pharm. Ther.**, Oxford, v. 25, p. 379-383, 2000.
56. JABOR, V.A.P.; COELHO, E.B.; SANTOS, N.A.G.; BONATO, P.S.; LANCHOTE, V.L. A highly sensitive LC-MS-MS assay for analysis of midazolam and its major metabolite in human plasma: Applications to drug metabolism. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 822, p. 27-32, 2005.
57. JOFFE, P.; LARSEN, F.S.; PEDERSEN, V.; RING-LARSEN, H.; AES-JØRGENSEN, T.; SIDHU, J. Single-dose pharmacokinetics of citalopram in patients with moderate renal insufficiency or hepatic cirrhosis compared with healthy subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 54, p. 237-242, 1998.
58. KAGEYAMA, M.; NAMIKI, H.; FUKUSHIMA, H.; ITO, Y.; SHIBATA, N.; TAKADA, K. In vivo effects of cyclosporine A and ketoconazole on the pharmacokinetics of representative substrates for P-glycoprotein and cytochrome P450 (CYP) 3A in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 28, p. 316-322, 2005.
59. KANAZAWA, H.; OKADA, A.; HIGAKI, M.; YOKOTA, H.; MASHIGE, F.; NAKAHARA, K. Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype. **J. Pharmac. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 30, p. 1817-1824, 2003.
60. KANAZAWA, H.; OKADA, A.; MATSUSHIMA, Y.; YOKOTA, H.; OKUBO, S.; MASHIGE, F.; NAKAHARA, K. Determination of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 949, p. 1-9, 2002.
61. KANAZU, T.; OKAMURA, N.; YAMAGUCHI, Y.; BABA, T.; KOIKE, M. Assessment of the hepatic and intestinal first-pass metabolism of midazolam in a CYP3A drug-drug interaction model rats. **Xenobiotica**, London, v. 35, p. 305-317, 2005.
62. KIM, M-J.; NAFZIGER, A.N.; ZHANG, Y.; SELLERS, E.M.; GAEDIGK, A.; BERTINO JR, J.S. Lack of weight-based dose dependency and

- intraindividual variability of omeprazole for CYP2C19 phenotyping. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v. 44, p. 966-973, 2004.
63. KO, J-W.; SUKHOVA, N.; THACKER, D.; CHEN, P.; FLOCKHART, D.A. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 25, p. 853-862, 1997.
 64. KOSEL, M.; EAP, C.B.; AMEY, M.; BAUMANN, P. Analysis of enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites using chiral liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 719, p. 234-238, 1998.
 65. KORTUNAY, S.; BASCI, N.E.; BOZKURT, A.; ISIMER, A.; SAYAL, A.; KAYAALP, S.O. The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin and proguanil metabolism. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 53, p. 261-264, 1997.
 66. KRAEMER, T.; PFLUGMANN, T.; BOSSMANN, M.; KNELLER, N.M.; PETERS, F.T.; PAUL, L.D.; SPRINGER, D.; STAACK, R.F.; MAURER, H.H. Femproporex N-dealkylation to amphetamine-enantioselective in vivo studies in wistar and dark agout rats. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 68, p. 947-957, 2004.
 67. KROEMER, H.K.; FROMM, M.F.; EICHELBAUM, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action: effects of enzyme inhibition and induction. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 18, p. 388-392, 1996.
 68. KUGELBERG, F.C.; APELQVIST, G.; CARLSSON, B.; AHLNER, J.; BENGTSSON, F. *In vivo* steady-state pharmacokinetic outcome following clinical and toxic doses of racemic citalopram to rats. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 132, p. 1683-1690, 2001.
 69. KUGELBERG, F.C.; CARLSSON, B.; BENGTSSON, F. Stereoselective single-dose kinetics of citalopram and its metabolites in rats. **Chirality**, New York, v. 15, p. 622-629, 2003.
 70. KUGELBERG, F.C.; DRUID, H.; CARLSSON, B.; AHLNER, J.; BENGTSSON, F. Postmortem redistribution of the enantiomers of citalopram and its metabolites: an experimental study in rats. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 28, p. 631-637, 2004.
 71. KUNICKI, P.K.; SITKEWICZ, D.; PAWLIK, A.; BIELICKA-SULZYC, V.; BOROWIECKA, E.; GAWRONSKA-SZKLARZ, B.; STERNA, R.;

- MATSUMOTO, H.; RADZIOWON-ZALESKA, M. Debrisoquine hydroxylation in a polish population. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 47, p. 503-505, 1995.
72. LAMBA, J.K.; LIN, Y.S.; SCHUETZ, E.R.; THUMMEL, K.E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Adv. Drug. Deliv.**, Amsterdam, v. 54, p. 1271-1294, 2002.
73. LAW, M.Y.L.; SLAWSON, M. H.; MOODY, D.E. Selective involvement of cytochrome P450 2D subfamily in in vivo 4-hydroxylation of amphetamine in rat. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 28, p. 348-353, 2000.
74. LI, X-Q.; ANDERSSON, T.B.; AHLSTRÖM, M.; WEIDOLF, L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 32, p. 821-827, 2004.
75. MALLING, D.; POULSEN, M.N.; SØGAARD, B. The effect of cimetidine or omeprazole on the pharmacokinetics of escitalopram in healthy subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 60, p. 287-290, 2005.
76. MANDRIOLI, R.; FANALI, S.; PUCCI, V.; RAGGI, M.A. Enantiomeric separation of citalopram and its metabolites by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2608-16, 2003.
77. MARINAC, J.S.; BALIAN, J.; FOXWORTH, J.W.; WILLSIE, S.K.; DAUS, J.C.; OWEN, R.; FLOCKHART, D.A. Determination of CYP2C19 phenotype in black americans with omeprazole: correlation with genotype. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 60, p. 138-144, 1996.
78. MELZACKA, M.; RURAK, A.; ADAMUS, A.; DANIEL, W. Distribution of citalopram in the blood serum and in the central nervous system of rats after single and multiple dosage. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, Warszawa, v. 36, p. 675-682, 1984.
79. MERINO, G.; MOLINA, A.J.; GARCÍA, J.L.; PULIDO, M.M.; PRIETO, J.G.; ÁLVAREZ, A.I. Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 263, p. 123-132, 2003.

80. MIKUS, G.; EICHELBAUM, M.; FISCHER, C.; GUMULKA, S.; KLOTZ, U.; KROEMER, H.K. Interaction of verapamil and cimetidine: stereochemical aspects of drug metabolism, drug disposition and drug action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 253, p. 1042-1048, 1990.
81. MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 16, p. 1215, 1988.
82. MIZUTANI, T. PM frequencies of major CYPa in Asian and caucasians. **Drug Metabol. Rev.**, New York, v. 35, p. 99-106, 2003.
83. MOLTKE, L.L.V.; GREENBLATT, D.J.; GIANCARLO, G.M.; GRANDA, B.W.; HARMATZ, J.S.; SHADER, R.I. Escitalopram (S-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediating biotransformation, inhibitory effects, and comparison to R-citalopram. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 29, p. 1102-1109, 2001.
84. NATION, R.L. Chirality in new drug development. Clinical pharmacokinetic considerations. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v. 27, n. 4, p. 249-255, 1994.
85. NIWA, T.; SHIRATA, T.; MITANI, Y.; TERAOKAWA, M.; TOKUMA, Y.; KAGAYAMA, A. Stereoselective metabolism of cibenzoline, an antiarrhythmic drug, by human and rat liver microsomes: possible involvement of CYP2D and CYP3A. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 28, p. 1128-1134, 2000.
86. OLESEN, O.V.; LINNET, K. Fluvoxamine-clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism. **J. Clin. Psychopharmacol.**, Baltimore, v. 20, p. 35-42, 2000.
87. OLESEN, O.V.; LINNET, K. Studies on the stereoselective metabolism of citalopram by human liver microsomes and cDNA-expressed cytochrome P450 enzymes. **Pharmacology**, Basel, v. 59, p. 298-309, 1999.
88. ORLANDO, R.M.; BONATO, P.S. Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v. 795, p. 227-235, 2003.
89. OVERO, K.F. Kinetics of citalopram in test animals: drug exposure in safety studies. **Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.**, Oxford, v. 6, p. 297-309, 1982.

90. OZAWA, S.; SOYAMA, A.; SAEKI, M.; FURUSHIMA-UESAKA, H.; ITODA, M.; KOYANO, S.; SAI, K.; OHNO, Y.; SAITO, Y.; SAWADA, J.-I. Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1. **Drug Metab. Pharmacokin.**, Tokyo, v. 19, p. 83-95, 2004.
91. PISTOS, C.; PANDERI, I.; ATTA-POLITOU, J. Liquid chromatography-positive ion electrospray mass spectrometry method for the quantification of citalopram in human plasma. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 810, p. 235-244, 2004.
92. RASMUSSEN, B.B.; BRØSEN, K. Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors? **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 22, p. 143-154, 2000.
93. RASMUSSEN, B.B.; NIELSEN, T.L.; BRØSEN, K. Fluvoxamine inhibits the CYP2C19-catalysed metabolism of proguanil in vitro. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 54, p. 735-740, 1998.
94. REZK, N.L.; BROWN, K.C.; KASHUBA, A.D.M. A simple and sensitive bioanalytical assay for simultaneous determination of omeprazole and its three major metabolites in human blood plasma using RP-HPLC after a simple liquid-liquid extraction procedure. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 844, p. 314-321, 2006.
95. ROCHAT, B.; AMEY, M.; BAUMANN, P. Analysis of enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites in plasma of depressive patients using chiral reverse-phase liquid chromatography. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 17, p. 273-279, 1995a.
96. ROCHAT, B.; AMEY, M.; VAN GELDEREN, H.; TESTA, B.; BAUMANN, P. Determination of the enantiomers of citalopram, its demethylated and propionic acid metabolites in human plasma by chiral HPLC. **Chirality**, New York, v. 7, p. 389-395, 1995b.
97. ROGERS, J.F.; ROCCI, M.L.; HAUGHEY, D.B.; BERTINO, J.S. An evaluation of the suitability of intravenous midazolam as an in vivo marker for hepatic cytochrome P4503A activity. **Clin. Pharmacol. Therap.**, St. Louis, v. 73, p. 153-158, 2003.

98. ROSEMARY, J.; ADITHAN, C.; PADMAJA, N.; SHASHINDRAN, C.H.; GERARD, N.; KRISHNAMOORTHY, R. The effect of the CYP2C19 genotype on the hydroxylation index of omeprazole in south Indians. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 61, p. 19-23, 2005.
99. ROSSINI, A.; SOARES-LIMA, S.; RAPOZO, D.C.M.; FARIA, M.; ALBANO, R.M.; RIBEIRO PINTO, L.F. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in brazilian population living in Rio de Janeiro. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 39, p. 195-201, 2006.
100. RUDBERG, I.; HENDSET, M.; UTHUS, L.H.; MOLDEN, E.; REFSUM, H. Heterozygous mutation in CYP2C19 significantly increases the concentration/dose ratio of racemic citalopram and escitalopram (S-citalopram). **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 28, p. 102-105, 2006.
101. SÁNCHEZ, C.; GRUCA, P.; BIEN, E.; PAPP, M. R-citalopram counteracts the effect of escitalopram in a rat conditioned fear stress model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v. 75, p. 903-907, 2003.
102. SCHELLENS, J.H.; VAN DER WART, J.H.; DANHOF, M.; VAN DER VELDE, E.A.; BREIMER, D.D. Relationship between the metabolism of antipyrine, hexobarbitone and theophylline in man as assessed by a "cocktail" approach. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 26, p. 373-384, 1988.
103. SHIDU, J.; PRISKORN, M.; POULSEN, M.; SEGONZAC, A.; GROLLIER, G.; LARSEN, F. Steady-state pharmacokinetics of enantiomers of citalopram and its metabolites in humans. **Chirality**, New York, v. 9, p. 686-692, 1997.
104. SHIMIZU, M.; UNO, T.; NIIOKA, T.; YAU-FURUKORI, N.; TAKAHATA, T.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 832, p. 241-248, 2006.
105. SHU, Y.; WANG, L-S.; XIAO, W-M.; WANG, W.; HUANG, S-L.; ZHOU, H-H. Probing CYP2C19 and CYP3A4 activities in chinese liver microsomes by quantification of 5-hydroxyomeprazole and omeprazole sulphone. **Acta Pharmacol. Sin.**, Shanghai, v. 21, p. 753-758, 2000.

106. SINGH S.S.; SHAH H.; GUPTA S.; JAIN M.; SHARMA K.; THAKKAR P.; SHAH, R. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of escitalopram in human plasma and its application in bioequivalence study. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 811, p. 209-215, 2004.
107. SONG, Q.; NAIDONG, W. Analysis of omeprazole and 5-OH omeprazole in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS)-Eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well liquid/liquid extraction. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 830, p. 135-142, 2006.
108. SPIGSET, O.; HÄGG, S.; STEGMAYR, B.; DAHQVIST, R. Citalopram pharmacokinetics in patients with chronic renal failure and the effect of hemodialysis. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 56, p. 699-703, 2000.
109. SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics in admixed populations. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 26, p. 196-201, 2005.
110. TATEISHI, T.; WATANABE, M.; NAKURA, H.; ASOH, M.; SHIRAI, H.; MIZOROGI, Y.; KOBAYASHI, S.; THUMMEL, K.E.; WILKINSON, G.R. CYP3A activity in european american and japanese men using midazolam as an in vivo probe. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 69, p. 333-339, 2001.
111. TOON, S.; HOPKINS, K.J.; GARSTANG, F.M.; ROWLAND, M. Comparative effects of ranitidine and cimetidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in man. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 32, p. 165-172, 1987.
112. TOON, S.; LOW, L.K.; GIRALDI, M.; TRAGER, W.F.; O'REILLY, A.A.; MOTTEY, C.H.; GOULART, D.A. The warfarin-sulfinpyrazone interaction: stereochemical considerations. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 39, p. 15-24, 1986.
113. TUCKER, G.T.; LENNARD, M.S. Enantiomer specific pharmacokinetics. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.45, p. 309-329, 1990.
114. TUCKER, G.T.; SILAS, J.H.; IYUN, A.O.; LENNARD, M.S.; SMIOTH, A.J. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine. **Lancet**, London, v. 2, p. 718, 1977.

115. WANG, J.; WANG, Y.; FAWCETT, J.P.; WANG, Y.; GU, J. Determination of omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **J. Pharmac. Biomed. Anal.**, Oxford v. 39, p. 631-635, 2005.
116. WILDT, S.N.; KEARNS, G.L.; LEEDER, J.S.; ANKER, J.N. Cytochrome P450 3A. Ontogeny and drug disposition. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 37, p. 485-505, 1999.
117. WIKELL, C.; APELQVIST, G.; CARLSSON, B.; HJORTH, S.; BERGQVIST, P.B.F.; KUGELBERG, F.C.; AHLNER, J.; BENGTSSON, F. Pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to chronic administration of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram in rats. **Clin. Neuropharmacol.**, Philadelphia, v. 22, p. 327-336, 1999.
118. WOJNOWSKI, L. Genetics of the variable expression of CYP3A in humans. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 26, p. 192-199, 2004.
119. XU, H.Y.; XIE, Z.Y.; ZHANG, P.; SUN, J.; CHU, F.M.; GUO, Z.R.; ZHONG, D.F. Role of rat liver cytochrome P450 3A and 2D in metabolism of imrecoxib. **Acta Pharmacol. Sin.**, Shanghai, v. 27, p. 372-380, 2006.
120. YANG, Y.S.; WONG, L.P.; LEE, T.C.; MUSTAFA, A.M.; MOHAMED, Z.; LANG, C.C. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in healthy Malaysian subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 58, p. 332-335, 2004.
121. YAO, C.; KUNZE, K.L.; TRAGER, W.F.; KHARASCH, E.D.; LEVY, R.H. Comparison of in vitro and in vivo inhibition potencies of fluvoxamine toward CYP2C19. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 31, p. 565-571, 2003.
122. YASUI-FURUKORI, N.; TAKAHATA, T.; NAKAGAMI, T.; YOSHIYA, G.; INOUE, Y.; KANEKO, S.; TATEISHI, T. Different inhibitory effect of fluvoxamine on omeprazole metabolism between CYP2C19 genotypes. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London v. 57, p. 487-494, 2004.
123. YIN, O.Q.P.; LAM, S.S.L.; LO, C.M.Y.; CHOW, M.S.S. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 18, p. 2921-2933, 2004a.

124. YIN, O.Q.P.; TOMLINSON, B.; CHOW, A.H.L.; WAYE, M.M.; CHOW, M.S.S. Omeprazole as a CYP2C19 marker in chinese subjects: assessment of its gene-dose effect and intrasubject variability. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v. 44, p. 582-589, 2004b.
125. YIN, O.Q.P.; WING, Y-K.; CHEUNG, Y.; WANG, Z-J.; LAM, S-L.; CHIU, H.F.K.; CHOW, M.S.S. Phenotype-genotype relationship and clinical effects of citalopram in chinese patients. **J. Clin. Psychopharmacol.**, Baltimore, v. 26, p. 267-372, 2006.
126. YU, B-N.; CHEN, G-L.; HE, N.; OUYANG, D-S.; CHEN, X-P.; LIU, Z-Q.; ZHOU, H-H. Pharmacokinetics of citalopram in relation to genetic polymorphism of CYP2C19. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 31, p. 1255-1259, 2003.
127. YU, K-S.; YIM, D-S.; CHO, J-Y.; PARK, S.S.; PARK, J.Y.; LEE, K-H.; JANG, I-J.; YI, S-Y.; BAE, K-S.; SHIN, S-G. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of moclobemide according to the genetic polymorphism of CYP2C19. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 69, p. 266-273, 2001.
128. YUAN, R.; SUMI, M.; BENET, L.Z. Investigation of aortic CYP3A bioactivation of nitroglycerin *in vivo*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 281, p. 1499-1505, 1997.
129. YUEN, K.H.; CHOY, W.P.; TAN, H.Y.; WONG, J.W.; YAP, S.P. Improved high performance liquid chromatographic analysis of omeprazole in human plasma. **J. Pharmac. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 24, p. 715-719, 2001.
130. ZANGER, U.M.; RAIMUNDO, S.; EICHELBAUM, M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. **Arch. Pharmacol.**, Berlin, v. 369, p. 23-37, 2004.
131. ZHANG, Y.; HSIEH, Y.; IZUMI, T.; LIN, E.T.; BENET, L.Z. Effects of ketoconazole on the intestinal metabolism, transport and oral bioavailability of K02, a novel vinylsulfone peptidomimetic cysteine protease inhibitor and P450 3A, P-glicoprotein dual substrate, in male Sprague-Dawley rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.287, p. 246-522, 1998.
132. ZHENG, Z.; JAMOUR, M.; KLOTZ, U. Stereoselective HPLC-assay for citalopram and its metabolites. **Ther. Drug Monit.**, New York, v. 22, p. 219-224, 2000.