UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ROBERTA NATÁLIA CESTARI

**Disposição cinética e transferência placentária do lopinavir e ritonavir em
gestantes portadoras do HIV**

Ribeirão Preto
- 2014-

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Disposição cinética e transferência placentária do lopinavir e ritonavir em
gestantes portadoras do HIV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Roberta Natália Cestari

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
-2014-

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cestari, Roberta Natália

Disposição cinética e transferência placentária do lopinavir e ritonavir em gestantes portadoras do HIV. Ribeirão Preto, 2014.

66p. : il; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia.

Palavras chave 1. Lopinavir. 2. Ritonavir. 3. Farmacocinética. 4. Gestantes. 5. Parturientes. 6. HIV. 7. Transferência placentária.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberta Natália Cestari

Disposição cinética e transferência placentária do lopinavir e ritonavir em gestantes portadoras do HIV.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestrado em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia
Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu pai Roberto,
Que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade;
Que iluminou os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e
cheio de esperanças;
Que se doou inteiro e renunciou aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os
meus;
A você meu querido pai, todo meu amor, carinho e profunda saudade.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Dulce Cestari**, por todo amor e confiança em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos **Poliany Cestari** e **João Victor Cestari**, pelo eterno companheirismo e carinho.

Ao meu tio **Marcos Cestari**, e avós, **Tereza e Jair Cestari**, pelas oportunidades que sempre me foram oferecidas com tanto carinho, e pela força e confiança que sempre depositaram em mim.

À minha tia **Ivanice Maria Cestari**, que me auxiliou na busca da realização dos meus ideais profissionais e humanos. Sou grata pelos ensinamentos, pela orientação constante, pela paciência e compreensão. A você, meu estima e reconhecimento.

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas, **Bruno Fiorante Akimoto**, pela força transmitida, paciência, compreensão, amor e carinho ilimitados.

À minha orientadora **Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote** por permitir o meu desenvolvimento profissional e pessoal em seu laboratório e por seu exemplo de dedicação, competência e sabedoria.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Duarte** pelo carinho, atenção, ensinamentos e sugestões pertinentes para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Elaine Moisés** e ao **Prof. Dr. Ricardo Cavalli** pela colaboração e disposição em ajudar neste trabalho.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** (médicos, residentes e equipe de enfermagem) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho clínico, na seleção e coleta das amostras das pacientes.

Ao **Corpo Clínico** do Ambulatório de Moléstias Infecto-contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –

USP pela valiosa contribuição na seleção das pacientes portadoras do HIV.

Aos **funcionários** da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela competência no cuidado das pacientes e na coleta de amostras.

À equipe do **Centro Obstétrico** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio na coleta das amostras utilizada nesta pesquisa.

À **Dra. Adriana Rocha e Dra. Maria Paula Marques Pereira**, funcionárias do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, por todos os ensinamentos, competência e constante auxílio científico.

Ao **Sr. Natalino Bocado**, funcionário do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da FCFRP- USP, por seu auxílio e alegria contagiante, transformando o ambiente de trabalho sempre mais leve e agradável.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de farmacocinética e metabolismo: **Ms. Carolina Pinto, Dr. Daniel Neves, Daniela Miarelli, Ms. Diego Cusinato, Dra. Francine Attie de Castro, Ms. Gabriel Tavares, Gabriela Campos, Ms. Giovana Lanchoti, Ms. João Paulo Ximenez, Larissa Matheus, Leandro Pippa, Ms. Leonardo Pinto, Marília Souza, Milena Oliveira, Ms. Natalícia Antunes, Ms. Glauco Nardotto**, pela troca diária de experiências e conhecimentos, amizade e prontidão em ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho.

À funcionária da Seção de Pós-graduação **Rosemary Ioshimine Gerolineto** por toda dedicação.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

CESTARI, R.N. Disposição cinética e transferência placentária do lopinavir e ritonavir em gestantes portadoras do HIV. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) são os inibidores de proteases mais utilizados em mulheres grávidas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV). O LPV, um fármaco substrato do transportador de efluxo glicoproteína P (P-gp), apresenta uma baixa e variável biodisponibilidade oral devido ao extenso metabolismo dependente do CYP3A4 hepático e intestinal. No entanto, o LPV é co-administrado com o RTV, um potente inibidor do metabolismo mediado pelo CYP3A4 e um potente inibidor do transportador P-gp. O estudo investiga a disposição cinética do LPV e do RTV no plasma materno de gestantes portadoras do HIV assim como a transferência placentária de ambos os fármacos. Foram investigadas 7 pacientes no terceiro trimestre de gestação em tratamento com 400 mg de LPV e 100 mg de RTV a cada 12 h. As amostras seriadas de sangue materno foram coletadas até 12 h após a administração do LPV/RTV. No momento do parto, também foram coletadas, simultaneamente, amostras de sangue materno e sangue do cordão umbilical para determinar a taxa de transferência placentária do LPV/RTV. O método de análise simultânea do LPV e RTV em plasma foi desenvolvido e validado empregando LC-MS/MS. As amostras de plasma (100 μ L) foram adicionadas de antipirina como padrão interno e submetidas à extração líquido-líquido com éter metil *tert*-butilico. A separação do LPV, RTV e padrão interno foi obtida na coluna de fase reversa C18e com fase móvel constituída de acetonitrila, água e ácido fórmico (50:50:0,1, v/v/v) na vazão de 1,3 mL/min. O método não apresenta efeito matriz, é linear no intervalo de 6,40 ng/mL-12,50 μ g/mL para o LPV e 3,20 ng/mL-12,50 μ g/mL para o RTV e os limites inferiores de quantificação são de 6,40 ng/mL para o LPV e 3,20 ng/mL para o RTV. Os coeficientes de variação e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de precisão e exatidão intra e intercorridas foram inferiores a 15% para ambos os compostos. A análise farmacocinética foi realizada empregando o programa WinNonlin e os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Prisma. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos para o LPV (dados expressos como medianas) durante o terceiro trimestre da gestação: C_{max} 14,63 μ g/mL, t_{max} 4,0 h, AUC^{0-12} 95,21 μ g.h/mL, $t_{1/2}$ 6,72 h, Cl/F 4,20 L/h e Vd/F 37,91 L. Em relação ao RTV, foram obtidos os seguintes valores: C_{max} 0,64 μ g/mL, t_{max} 4,0 h, AUC^{0-12} 4,47 μ g.h/mL, $t_{1/2}$ 3,20 h, Cl/F 22,39 L/h e Vd/F 110,43 L. No momento do parto foram observadas as razões de concentrações veia umbilical/plasma materno de 0,11 (0,09-0,20) para o LPV e 0,07 (0,05-0,12) para o RTV (dados apresentados como medianas e percentis 25-75), indicando baixa transferência de ambos os fármacos através da barreira placentária.

Palavras-chave: lopinavir, ritonavir, farmacocinética, gestantes, parturientes, HIV, transferência placentária.

ABSTRACT

CESTARI, R.N. Kinetic disposition and placental transfer of lopinavir and ritonavir in pregnant women with HIV. 2014. 66p. Dissertation (Master Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Lopinavir (LPV)/ritonavir (RTV) are currently the most commonly used protease inhibitors in pregnant women with HIV. LPV, a substrate of drug efflux transporter P-glycoprotein (P-gp), has a very low oral bioavailability due to the extensive metabolism by CYP3A4. However, it is coadministered with ritonavir, a potent inhibitor of CYP3A4 and P-gp. This study investigates the kinetic disposition of LPV and RTV in maternal plasma of pregnant women with HIV as well as the placental transfer of both drugs. We investigated 7 patients in the third trimester of pregnancy treated with 400 mg of LPV and 100 mg of RTV every 12 h. Serial maternal blood samples were collected up to 12 h after administration of LPV/RTV. At delivery were also collected simultaneously maternal and cord blood samples to determine the placental transfer of both drugs. The method of simultaneous analysis of LPV and RTV in plasma was developed and validated using LC-MS/MS. Plasma samples (100 μ L) were spiked with antipyrine as internal standard and submitted to liquid-liquid extraction with *tert*-butyl methyl ether. The separation of LPV, RTV and internal standard was obtained on C18 reverse phase column with a mobile phase consisted of acetonitrile, water and formic acid (50:50:0.1, v/v/v) at a flow rate of 1.3 mL/min. The method has no matrix effect, it is linear in the range of 6.40 ng/mL to 12.50 μ g/mL for LPV and 3.20 to 12.50 μ g/mL for RTV and shows lower limits of quantitation of 6.40 ng/mL for LPV and 3.20 ng/mL for RTV. The coefficients of variation and relative standard errors obtained in studies of intraassay and interassay precision and accuracy were below 15% for both compounds. Pharmacokinetic analysis was performed using the WinNonlin program. The following pharmacokinetic parameters were obtained for LPV (data expressed as medians) during the third trimester of pregnancy: C_{max} 14.63 μ g/mL, t_{max} 4.0 h, AUC^{0-12} 95.21 μ g.h/mL, $t_{1/2}$ 6.72 h, Cl/F 4.20 L/h and Vd/F 37.91 L. Regarding RTV, the following values were obtained: C_{max} 0.64 μ g/mL, t_{max} 4.0 h, AUC^{0-12} 4.47 μ g.h/mL, $t_{1/2}$ 3.20 h, Cl/F 22.39 L/h and Vd/F 110.43 L. The umbilical vein/maternal plasma ratios were 0.11 (0.09 to 0.20) for LPV and 0.07 (0.05 to 0.12) for RTV (data presented as medians and percentiles 25-75), indicating low placental transfer of both drugs.

Keywords: lopinavir, ritonavir, pharmacokinetic, pregnant women, parturients, HIV, placental transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Via metabólica do lopinavir (LPV) mediada pelo CYP3A.....	22
Figura 2:	Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto do lopinavir.....	36
Figura 3:	Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto do ritonavir.....	36
Figura 4:	Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto da antipirina.....	37
Figura 5:	Cromatogramas referentes à análise de plasma branco.....	37
Figura 6:	Cromatogramas referentes à análise do lopinavir (LPV) e do ritonavir (RTV) em plasma.....	38
Figura 7:	Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo do lopinavir (LPV) e do ritonavir (RTV) no estado de equilíbrio em pacientes portadoras do HIV (n=7) após tratamento oral de 400mg de LPV e 100 mg de RTV/12h.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características das pacientes investigadas (n=7).....	32
Tabela 2:	Parâmetros bioquímicos das pacientes investigadas (n=7).....	33
Tabela 3:	Avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das pacientes investigadas (n=7).....	34
Tabela 4:	Características dos recém-nascidos (n=7).....	35
Tabela 5:	Limites de confiança do método de análise do lopinavir em plasma.....	39
Tabela 6:	Limites de confiança do método de análise do ritonavir em plasma.....	40
Tabela 7:	Estudo de estabilidade do lopinavir em plasma.....	41
Tabela 8:	Estudo de estabilidade do ritonavir em plasma.....	41
Tabela 9:	Disposição cinética do lopinavir (LPV) e do ritonavir (RTV) em pacientes tratadas com 400 mg de LPV e 100 mg de RTV/12h por via oral.....	43
Tabela 10:	Concentrações plasmáticas do lopinavir e do ritonavir em amostras coletadas no momento do parto de pacientes tratadas com dose múltipla oral de lopinavir/ritonavir.....	44
Tabela 11:	Transferência placentária do lopinavir e do ritonavir em parturientes portadoras do HIV.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: Proteína dependente de ATP

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

ALT: Alanina aminotransferase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARV: Antirretroviral

AST: Aspartato aminotransferase

CQA: Controle de qualidade de alta concentração

CQB: Controle de qualidade de baixa concentração

CQD: Controle de qualidade de diluição

CQM: Controle de qualidade de média concentração

CV: Coeficiente de variação

CYP: Citocromo P450

EPR: Erro padrão relativo

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FMN: Fator de matriz normalizado por padrão interno

HCFMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IC 95%: Índice confiança 95%

IFN- γ : Interferon γ

IMC: Índice de massa corporal

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LC: Cromatografia líquida

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

LIQ: Limite inferior de quantificação

LPV: Lopinavir

$[M+H]^+$: Íon molecular protonado

MDR: Gene resistente a múltiplas drogas

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: Espectrometria de massas

P-gp: Glicoproteína-P

PI: Padrão interno

RTV: Ritonavir

TCD4⁺: Linfócitos TCD4⁺

TGO: Transaminase glutâmico oxalacética

TGP: Transaminase glutâmico pirúvica

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

TARV: Terapia antirretroviral

TV: Transmissão vertical

UGT: Uridina-difosfato-glicuronosil-transferases

v/v: volume/volume

γ -GT: Gama glutamil transferase

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC^{0-12} : Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (0-12h)

Cl_T/F : *Clearance* total aparente

C_{max} : Concentração plasmática máxima

C_{min} : Concentração plasmática mínima

K_{el} : Constante de velocidade de eliminação

MRT: Tempo médio de residência

t_{max} : Tempo para alcançar C_{max}

t_{min} : Tempo para alcançar C_{min}

$t_{1/2}$: Meia-vida de eliminação

V_d/F : Volume de distribuição aparente

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiii
1. Introdução.....	15
1.1 Gravidez.....	15
1.2 Vírus da imunodeficiência humana.....	18
1.3 Terapias com antirretrovirais em gestantes.....	20
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Casuística e métodos.....	25
3.1 Casuística e protocolo clínico.....	25
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Coleta de sangue materno.....	26
3.2.2 Coleta de amostras no momento do parto.....	26
3.2.2.1 Coleta de sangue materno na extração fetal.....	27
3.2.2.2 Coleta de sangue do cordão umbilical.....	27
3.2.3 Análise do lopinavir e ritonavir em plasma.....	27
3.2.3.1 Soluções padrão e reagentes.....	27
3.2.3.2 Instrumentação.....	28
3.2.3.3 Preparo da amostra.....	29
3.2.4 Validação do método de análise do lopinavir e ritonavir em plasma.....	29
3.2.4.1 Efeito matriz.....	29
3.2.4.2 Linearidade.....	30
3.2.4.3 Precisão e exatidão.....	30
3.2.4.4 Estabilidade.....	30
3.2.5 Análise farmacocinética.....	31
3.2.6 Análise estatística.....	31
4. Resultados.....	32
4.1 Características das pacientes investigadas.....	32
4.2 Características dos recém-nascidos.....	34
4.3 Validação do método de análise do lopinavir e ritonavir em plasma empregando LC-MS/MS.....	36
4.4 Análise farmacocinética do lopinavir e ritonavir em pacientes portadoras do HIV.....	42
4.5 Avaliação da transferência placentária do lopinavir e ritonavir.....	44
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	52
7. Referências bibliográficas.....	53
8. Apêndices.....	58
9. Anexos.....	63

PRODUTÃO

1. Introdução

1.1 GRAVIDEZ

Os regimes de dosagem de medicamentos administrados durante a gestação geralmente são estabelecidos com base em estudos de farmacocinética em homens e em mulheres não grávidas, ignorando o impacto das mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a gravidez. No entanto, para medicamentos com estreito intervalo terapêutico, o ajuste da dose é necessário em vários estágios da gravidez para evitar ineficácia ou efeitos adversos (GAOHUA et al., 2012).

A gravidez é um estado fisiológico que pode alterar a farmacodinâmica e a farmacocinética, com consequentes modificações nas concentrações plasmáticas e na resposta aos medicamentos em uso na clínica. As alterações na farmacocinética são mais evidentes no terceiro trimestre da gestação (GAOHUA et al., 2012; ABDULJALIL et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013).

Dentre as modificações destacam-se o retardo na motilidade gástrica e o prolongamento do tempo de trânsito gastrointestinal, o aumento do volume do fluido extracelular e da água corporal total, o aumento da gordura corporal, o aumento do débito cardíaco, aumento do volume sistólico e da frequência cardíaca, aumento da taxa de filtração glomerular e redução da concentração de albumina. Ocorrem também, alterações na atividade de enzimas hepáticas, incluindo as enzimas citocromo P450 (CYP), responsáveis pelo metabolismo de fase I e as vias de conjugação, dentre elas a Uridina-difosfato-glicuronosil-transferases (UGT) e a N-acetiltransferases (FDA, 2004; ANDERSON, 2005; GULATI et al., 2008; KNOPPERT, 2011; ABDULJALIL et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013).

O aumento no volume de plasma e a redução da concentração de albumina observados durante a gravidez (70-80% dos valores normais no momento do parto) podem alterar o volume de distribuição dos medicamentos, com consequente redução da concentração plasmática máxima na administração de doses múltiplas ou redução da concentração inicial na administração da dose de ataque (ANDERSON, 2005; ABDULJALIL et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013).

O fluxo de sangue hepático aumenta consideravelmente depois de 28 semanas de gestação, resultando em aumento do *clearance* e diminuição da área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) para os medicamentos de alta razão de extração hepática, tais como o metoprolol, o midazolam e a morfina. O aumento do *clearance* renal de fármacos

ocorre, também, devido ao aumento significativo da taxa de filtração glomerular, juntamente com o fluxo de sangue renal, podendo afetar a concentração plasmática no estado de equilíbrio dos fármacos de excreção renal (ANDERSON, 2005; ISOHERRANEN, 2013).

Durante a gravidez, pode ocorrer redução ou aumento na atividade do CYP. Estudos relatam redução na atividade do CYP1A2 com consequente redução do *clearance* total da cafeína em gestantes de 17-32 semanas (ANDERSON, 2005; GAOHUA et al., 2012; TRACY et al., 2005). A atividade do CYP2C19 também é reduzida a partir do final do segundo trimestre da gravidez com acúmulo plasmático de omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, entre outros substratos. Por outro lado, a atividade do CYP2C9 é aumentada durante o terceiro trimestre da gestação resultando em redução nas concentrações plasmáticas de seus substratos, tais como a fenitoína (ANDERSON, 2005; ISOHERRANEN, 2013). A atividade do CYP2D6 também parece estar aumentada durante o terceiro trimestre da gestação, inferindo aumento de 2 vezes nas doses de seus substratos (ABDULJALIL et al., 2012; ANDERSON, 2005; GAOHUA et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013; TRACY et al., 2005).

O CYP3A apresenta três principais isoformas, o CYP3A4, CYP3A5 e o CYP3A7. O CYP3A4 é altamente expresso no intestino e no fígado, sendo responsável pelo metabolismo de mais de 70% de todos os fármacos usados na prática clínica, enquanto o CYP3A7 é a enzima mais abundante presente no fígado fetal (MYLLYNEN; PASANEN; VÄHÄKANGAS, 2007; CASARETT et al., 2008; PAL et al., 2012). Destaca-se que um amplo número de interações significativas envolvidas na prática clínica é devido às interações entre fármaco-fármaco, fármaco-plantas medicinais e/ou fitoterápicos e fármaco-alimento, decorrente da inibição ou indução do CYP3A hepático ou intestinal (CASARETT et al., 2008; PAL et al., 2012). Os estudos com substratos do CYP3A sugerem aumento da atividade da enzima em 35-38% durante a gestação. No entanto, em função da alta variabilidade interindividual na atividade da enzima e do número limitado de pacientes até então investigadas, os dados ainda não são claros em termos das necessidades ou não do ajuste do regime de dosagem de substratos do CYP3A (ABDULJALIL et al., 2012; ANDERSON, 2005; TRACY et al., 2005).

A atividade de outras enzimas, tais como a UGT1A1, UGT1A4 e UGT2B7, também é aumentada durante a gestação (ANDERSON, 2005; ISOHERRANEN, 2013).

A placenta é um órgão complexo que forma a interface entre a circulação materna e fetal durante a gestação, com função de regular a troca de nutrientes e gases entre a mãe e o feto e, também remover os resíduos fetais (CECKOVA-NOVOTNA, 2006). A circulação

feto-placentária-materna é estabelecida por volta da décima semana de gestação. A barreira placentária pode limitar a distribuição de fármacos direcionados para o tratamento do feto, ou administrados para evitar transmissão materno-fetal de doenças, como os inibidores de proteases. Ademais, a barreira placentária protege o feto contra o efeito de compostos estranhos ao organismo (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; GULATI et al., 2009; RUBINCHIK-STERN, 2012).

A placenta expressa várias enzimas metabolizadoras de xenobióticos, mas com capacidade relativamente menor em comparação com o fígado. No entanto, as enzimas placentárias podem catalisar a formação de metabólitos que podem ser fetotóxicos. Essas enzimas participam das reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e de fase II (conjugação) do metabolismo. Dentre as enzimas de fase I, destaca-se o CYP, com as isoformas CYP1A1, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 4B1, e 19. As enzimas de fase II incluem a UGT, glutathione S-transferase, epóxido hidrolase, N-acetiltransferase e sulfotransferases (RUBINCHIK-STERN, 2012).

A placenta apresenta transportadores de membrana, que medeiam a captação de hormônios do sangue materno para o feto e a remoção de substrato de volta ao sangue materno, e seu desenvolvimento é dependente da idade gestacional. Ademais, atuam na proteção do feto à ação de substâncias químicas estranhas ao organismo, e participam da homeostase do próprio tecido placentário. Dentre os transportadores, destaca-se a glicoproteína-P (P-gp), uma proteína de membrana de 170 kDa, expressa na membrana apical de sinciciotrofoblastos, e codificada pelo gene *ABCB1* em humanos. A P-gp é um transportador de efluxo ATP-dependente, atuando na redução da exposição de fármacos ao feto. Os substratos da P-gp são geralmente moléculas hidrofóbicas, das quais muitas são catiônicas, tais como os inibidores da protease do HIV, imunossupressores, opióides, antimiméticos e antibióticos (CAMUS et al., 2006; CECKOVA-NOVOTNA, 2006; FEGHALI; MATTISON, 2011; RUBINCHIK-STERN, 2012; IQBAL et al., 2012).

A expressão da proteína de efluxo P-gp pode ser modulada por estados fisiológicos, doenças ou por fármacos associados, tais como verapamil, ciclosporina, quinidina e ritonavir, os quais inibem a P-gp (DEGORTER et al., 2012) e clotrimazol, midazolam, fenobarbital, reserpina e rifampicina, os quais induzem a P-gp (ZHOU, 2008).

A inibição da P-gp tem grande impacto na distribuição aos tecidos e na concentração plasmática de seus substratos, trazendo risco de interações fármaco-fármaco, e em contrapartida oferece uma ferramenta terapêutica para fármacos-alvo, permitindo atravessar

barreiras sangue-tecido (CAMUS et al., 2006; CECKOVA-NOVOTNA, 2006; CECCALDI et al., 2009).

A expressão da P-gp na placenta pode ser alterada de acordo com o estágio da gravidez e também pela presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em mulheres infectadas pelo vírus HIV, a expressão da P-gp na placenta é cerca de 3,3 vezes maior que em mulheres não infectadas (CAMUS et al., 2006; CECCALDI et al., 2009).

A propagação da infecção pelo HIV entre as mulheres levou ao uso de antirretrovirais (ARV) em gestantes e seus recém-nascidos. No entanto, os inibidores da protease, que são substratos da P-gp, não atravessam a placenta em quantidade apreciável, e, portanto, podem não exercer uma atividade direta no útero durante todo o intervalo entre as doses. Além disso, as placentas de mães HIV-positivas expressam níveis significativamente mais elevados de P-gp em comparação com placentas de gestantes saudáveis. Dessa forma, visando aumentar a transferência materno-fetal de ARV, o uso de inibidores da P-gp pode ser uma opção, por aumentar a distribuição de medicamentos para o feto (CECKOVA-NOVOTNA, 2006).

Deve-se ressaltar o efeito sinérgico entre o CYP3A4 e a P-gp nos processos de desintoxicação, uma vez que a maioria dos compostos que são substratos da P-gp são também substratos do CYP3A4. O ritonavir é descrito como inibidor da P-gp e do CYP3A4 (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; GULATI et al., 2009; PAL et al., 2012). Segundo Gulati et al. (2009), o ritonavir, nelfinavir e indinavir, na concentração de 5 μ M, aumentam a fluorescência da calceína em células CEM/VBL 100 (células leucêmicas com altos níveis de expressão da P-gp), indicando que a P-gp foi inibida. O saquinavir também atua como inibidor da P-gp, porém em uma concentração de 50 μ M. No entanto, dentre os ARV, o ritonavir é descrito como o inibidor mais potente da P-gp.

1.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

Segundo o último Boletim Epidemiológico Aids e DST do Ministério da Saúde (2013), o Brasil apresenta 709.477 casos registrados de infecção pelo HIV de 1980 até junho de 2013, dos quais 445.197 (64,9%) são do sexo masculino e 241.223 (35,1%) do sexo feminino. Do total de casos registrados, 379.045 (55,2%) são da região sudeste, 137.126 (20,0%) da região sul, 95.516 (13,9%) da região nordeste, 39.691 (5,8%) da região centro-oeste e 35.100 (5,1%) da região norte.

O número de casos de infecção pelo HIV em gestantes de 2000 a Junho de 2013 é de 77.066, compreendido em sua maioria na faixa etária de 20 a 29 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é descrita como uma doença caracterizada por sinais e sintomas provocados pela debilitação do sistema imunológico, devido à infecção pelo HIV (GROTTO; PARDINI, 2006).

O HIV é classificado como um retrovírus pertencente à família *Lentiviridae*, que infecta principalmente as células do sistema imune do hospedeiro (KILLIAN; LEVY, 2011; SMITH et al., 2013). O vírus apresenta núcleo proteico com cópias de RNA constituindo o seu genoma e enzimas virais, como a transcriptase reversa, integrase e protease. Ele é envolto por um envelope lipoproteico, no qual se inserem as proteínas gp120 e gp41 (GROTTO; PARDINI, 2006).

O vírus HIV é dividido em dois grupos HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é subdividido em grupos M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*New*). O grupo M ainda se subdivide em A, B (mais prevalente na América do Sul), C, D, E, F, G, H e J, mostrando grande diversidade genética viral. A variabilidade descrita é resultado do processo de recombinação genética entre diferentes vírus. A co-circulação dos múltiplos subtipos virais promove o surgimento de co-infecção, conduzindo ao aparecimento de vírus recombinantes (GROTTO; PARDINI, 2006; KILLIAN; LEVY, 2011).

Como todos os outros vírus, o HIV tem que ser introduzido em uma célula susceptível a fim de se replicar. A transmissão é geralmente sexual. Os vírus presentes no sêmen ou nos fluidos corporais encontram células susceptíveis, como linfócitos T (T_{CD4+}) e células dendríticas, dentro do epitélio genital ou através de fendas no revestimento mucoso (KILLIAN; LEVY, 2011; KLASSE, 2012). Uma vez que o vírus tenha entrado na célula, a replicação pode progredir para a produção de vírus descendentes. Se a replicação começa em cascata, a partir do tecido linfóide local para linfonodos regionais, e ainda para o tecido linfóide associado ao intestino e sangue, haverá infecção sistêmica do hospedeiro (KLASSE, 2012). Quando a transmissão é por via sexual, inicialmente ocorre uma infecção localizada (canal vaginal e anal), e durante as primeiras semanas após a transmissão do HIV ocorrem perdas de células $CD4^+$ no trato gastrointestinal, devido ao aumento da quantidade de citocinas, e o curso da infecção viral é determinada pela resposta imune inata e adquirida do hospedeiro (KILLIAN; LEVY, 2011).

As citocinas são hormônios peptídeos que controlam a homeostase e o sistema imune e, também, são fundamentais nas reações inflamatórias e imunes mediadas. Ademais, estão envolvidas em múltiplos níveis da patogênese da AIDS, contribuindo na severa depleção de células $CD4^+$, no entanto a relação quantitativa não está definida. As citocinas também estão envolvidas no estabelecimento da latência do vírus, durante as primeiras semanas de infecção viral. A infecção pelo HIV induz a produção de várias citocinas, dentre as quais a $IFN-\alpha$ e $IL-15$, seguidas pelas $TNF-\alpha$, $CXCL10$, $IFN-\gamma$ e $IL-12$. As alterações de citocinas variam de acordo com a progressão da doença (POLI; FAUCI, 1993; SHEBL et al., 2012; VANDERGEETEN et al., 2012).

A ativação da célula-alvo resulta na transcrição do DNA viral em RNA mensageiro (mRNA), que é então traduzido em proteínas virais. O novo RNA viral forma o material genético da próxima geração de vírus. O RNA viral e as proteínas virais se estruturam junto à membrana da célula para formar um novo vírus (KLASSE, 2012).

Uma vez que o material genético do HIV foi convertido em DNA, este DNA viral entra no núcleo, onde se integra ao material genético da célula. Depois de integrado ao material genético do hospedeiro, o HIV pode permanecer em estado latente por muitos anos. Esta habilidade que o HIV tem de se abrigar (e de permanecer latente) em células infectadas é o maior obstáculo para a erradicação ou a cura do HIV. Por esta razão, com base no conhecimento atual, os pacientes devem se manter em terapia antirretroviral (TARV) por toda a vida (KLASSE, 2012).

1.3 TERAPIAS COM ANTIRRETROVIRAIS EM GESTANTES

O tratamento do HIV inclui principalmente fármacos que tem como alvo as enzimas virais transcriptase reversa, integrase e protease. Os inibidores da transcriptase reversa se dividem em duas classes: análogos de nucleosídeo, que atuam por meio de mecanismos competitivos na finalização da cadeia de DNA bloqueando a sua síntese, e não análogos de nucleosídeos, que induzem modificações estruturais nos sítios ativos enzimáticos. Os inibidores de protease são um dos mais potentes tipos de medicamento antiviral e atuam bloqueando este estágio crítico da maturação do vírus. Dessa forma, geralmente combina-se um análogo de nucleosídeo do HIV e pelo menos um inibidor de protease (CAMUS et al., 2006; GROTTTO; PARDINI, 2006; KILLIAN; LEVY, 2011; KLASSE, 2012).

No tratamento de gestantes infectadas com o HIV, a TARV envolvendo a administração de múltiplos fármacos ARV que agem em diferentes fases do ciclo de vida do

HIV, visa não somente o tratamento da mãe, mas também a prevenção da transmissão do vírus para o feto. A combinação de regimes ARV consiste na associação de inibidores de transcriptase reversa e inibidores de proteases. O objetivo da terapia é reduzir a carga viral para indetectável e aumentar a contagem de células T CD4⁺. Existem diferenças na extensão da transferência dos fármacos ARV através da placenta, sendo os inibidores de protease particularmente pouco transferidos (GULATI et al., 2009; BUCKOREELALL; CRESSEY; KING, 2012).

Os pacientes portadores do HIV em tratamento com inibidores de proteases e nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa exibem modificações em relação ao perfil lipídico, incluindo atrofia da gordura periférica e lipo-hipertrofia visceral, homeostase da glicose e saúde cardiovascular. Os indivíduos infectados apresentam alta prevalência de dislipidemias, resistência à insulina e diabetes, e maior risco cardiovascular, comparado com os pacientes não infectados (CALZA et al., 2004; STANLEY; GRINSPOON, 2012).

Os pacientes infectados pelo HIV exibem dislipidemias com diminuição dos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) e aumento dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade). O aumento nos níveis de triglicérides está associado com um aumento de 17% do risco de infarto agudo do miocárdio (CALZA et al., 2004; STANLEY; GRINSPOON, 2012).

Os objetivos do uso de ARV na gravidez incluem tanto o tratamento da infecção da mãe quanto a prevenção da transmissão vertical (TV), a qual pode ocorrer no útero, durante o parto ou na amamentação. Entre o ano 2000, quando a profilaxia com ARV foi introduzida nos países desenvolvidos, e o ano 2009, ocorreu uma redução de 24% no número anual de novos casos de crianças infectadas (MAHY et al., 2010). A replicação do vírus em crianças ocorre de forma mais rápida, devido a maior carga viral comparada com adultos e a progressão da doença ser mais acelerada. Dessa forma, a TV é considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade infantil (GULATI et al., 2009).

Nos países em que a amamentação é comum, a probabilidade de TV, quando a mãe não está realizando o tratamento com ARV é de 20 a 45%, sendo de aproximadamente 15 a 25% durante a gravidez, e de 5 a 20% de transmissão durante a amamentação. Nos países desenvolvidos em que os ARVs são fornecidos para as mulheres grávidas HIV-positivas e com a amamentação limitada, o nível de transmissão vertical diminui para menos de 2% (MAHY et al., 2010; NEWELL; BUNDERS, 2013). Dessa forma, a TARV promove a supressão da carga viral do HIV, restaura a função imune, previne a transmissão do HIV e melhora a qualidade de vida (MARGOLIS et al., 2014).

O lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) são os inibidores de proteases mais utilizados em mulheres grávidas portadoras do HIV. O LPV, um fármaco substrato do transportador de efluxo P-gp, apresenta uma baixa e variável biodisponibilidade oral devido ao extenso metabolismo dependente do CYP3A4 hepático e intestinal. No entanto, para compensar a baixa biodisponibilidade do LPV, ele é co-administrado com o RTV, um potente inibidor do metabolismo mediado por CYP3A4 e P-gp. Além disso, o LPV é altamente ligado às proteínas plasmáticas (> 99%), incluindo albumina e alfa-1-glicoproteína ácida. No fígado, a P-gp facilita a excreção hepatobiliar do LPV, enquanto o CYP3A4 é responsável pela formação de metabólitos hidrofílicos (Figura 1) (WATERSCHOOT et al., 2010; ANGER; PIQUETTE-MILLER, 2011; HEINE et al., 2011).

Figura 1: Via metabólica do lopinavir (LPV) mediada pelo CYP3A. O LPV (a) é metabolizado em M3/M4 (b) (4-hidroxi-LPV) pelo CYP3A e M3/M4 é metabolizado subsequentemente a M1 (c) (4-oxo-LPV), também pelo CYP3A. O carbono-4 é o local para estas reações metabólicas, o qual é indicado por um asterisco em (a). O LPV é um substrato da proteína de efluxo P-gp e os metabólitos M3/M4 e M1 são substratos prováveis da P-gp (Ilustração modificada de ANGER; PIQUETTE-MILLER, 2011).

O LPV é conhecido quimicamente como [S- [1R*,(R*),3R*,4R*]]-N-[4-[[2,6-dimetilfenoxi) acetil]amino]-3-hidroxi-5-fenil-1- (fenilmetil)pentil]tetraidro-alfa-(1-metiletil)-2-oxo-1-(2H)-pirimidinoacetamida, sendo ele um inibidor das proteases do HIV-1 e HIV-2 e a inibição da protease previne a clivagem da poliproteína *gag-pol* levando à formação de um vírus imaturo, não infeccioso. Já o RTV, é conhecido quimicamente como éster 5-tiazolilmetílico, [5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)] do ácido 10-hidroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1- [2-(1-metiletil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11-bis(fenilmetil)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-óico (DRUGBANK, 2014).

A exposição ao LPV é reduzida em gestantes de 30-36 semanas quando comparadas com 6-12 semanas do período pós-parto. A redução da exposição ao LPV pode ser consequente do aumento da atividade da P-gp intestinal durante a gestação ou do aumento do *clearance* intrínseco do lopinavir durante a gestação (STEK et al., 2006).

Os parâmetros farmacocinéticos do LPV durante o segundo e terceiro trimestres da gestação (AUC 88,4 e 87,2 µg.h/mL) diferem daqueles observados no período pós-parto (122,4 µg.h/mL) em mulheres tratadas com doses padrão de LPV/RTV (400mg/100mg), inferindo que o aumento das doses de LPV/RTV são necessários para a observação de parâmetros farmacocinéticos similares entre o segundo e terceiro trimestres da gestação e o período pós-parto. O aumento das doses de LPV/RTV (600mg/150mg) resultaram em valores de AUC de 139,4 µg.h/mL no segundo trimestre e de 130,7 µg.h/mL no terceiro trimestre da gestação (SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014). O aumento das doses de LPV/RTV (600mg/150mg) durante o segundo e terceiro trimestres da gestação com o objetivo de resultar em concentrações plasmáticas de LPV comparáveis às das mulheres não grávidas tratadas com doses de 400mg/100mg também foi sugerido por outros autores (BEST et al., 2010).

A transferência placentária do LPV é considerada relativamente baixa em pacientes tratadas com LPV/RTV, com razões de concentrações plasmáticas cordão umbilical/sangue materno variando de 0,17-0,23 (STEK et al., 2006; MIROCHNICK et al., 2008; BEST et al., 2010; ELSE et al., 2011; SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014). Em relação ao RTV, as razões de concentrações plasmáticas cordão umbilical/sangue materno são ainda menores com valores variando de 0,09-0,13 (ELSE et al., 2011; SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014).

08937905

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a disposição cinética e a transferência placentária do LPV e do RTV em gestantes portadoras do HIV durante o terceiro trimestre da gestação e no momento do parto.

2.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver e validar o método de análise das concentrações plasmáticas do LPV e RTV empregando LC-MS/MS.
- Descrever a farmacocinética do LPV e RTV em pacientes portadoras do HIV durante o terceiro trimestre da gestação.
- Avaliar a transferência placentária do LPV e RTV em parturientes portadoras do HIV.

Casística & Métodos

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística e protocolo clínico

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), em sua 364^a Reunião Ordinária realizada em 15/04/2013, Processo HCRP n° 5165/2013 (ANEXO A). O projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP – USP) no dia 23/09/2013 (ANEXO B). Todas as pacientes investigadas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C) contendo todas as informações detalhadas sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos.

Foram investigadas 7 pacientes portadoras do HIV em tratamento (ou profilaxia da transmissão vertical) com zidovudina, lamivudina e LPV/RTV, internadas na Unidade de Pesquisa Clínica do HC-FMRP/USP durante o último trimestre da gestação e no Centro Obstétrico do HC-FMRP/USP durante o parto.

O diagnóstico do HIV foi realizado de acordo com o Teste Imunoenzimático (ELISA). O diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV foi confirmado após a análise de no mínimo duas amostras de sangue coletadas em momentos diferentes (Portaria MS/SVS-N°59 de 28/01/03). A idade gestacional das pacientes investigadas variou de 36-42 semanas, sendo todas com gestação única e com ausência de intercorrências fetais. Todas as pacientes investigadas mostraram funções hepática (dosagem sérica de bilirrubinas, AST, ALT e γ -GT) e renal (dosagem sérica de uréia e creatinina) dentro dos limites da normalidade.

Foram excluídas as pacientes com resolução do parto decorrente de urgência/emergência obstétrica, com obesidade mórbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$), com outras doenças além da infecção por HIV ou pacientes em uso crônico de outras medicações exceto os ARV.

As pacientes portadoras do HIV em tratamento com zidovudina, lamivudina e LPV/RTV, em regime de dose múltipla há pelo menos 2 semanas, foram investigadas na fase de estado de equilíbrio, durante o intervalo de dose de 12 h de administração de 400 mg de LPV e 100 mg de RTV (2 comprimidos de Kaletra®, Abbott, São Paulo).

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta de sangue materno

Esta pesquisa foi realizada em 2 etapas, a primeira etapa foi realizada no último trimestre de gestação na Unidade de Pesquisa Clínica do HC-FMRP/USP, com duração de 12 horas e a segunda foi realizada no momento do parto no Centro Obstétrico do HC-FMRP/USP.

Na primeira etapa, antes da administração do LPV/RTV, foram coletados das pacientes investigadas 10 mL de sangue, em seringa não heparinizada, através de um cateter intravenoso 18G com torneira de 3 vias. Para a manutenção do acesso venoso, o cateter foi salinizado com solução fisiológica 0,9%, em volume suficiente (aproximadamente 3 mL) até desaparecer o sangue do conduto do mesmo, utilizando uma seringa de 10 mL. As amostras de sangue materno foram encaminhadas ao Laboratório Central de Análises Clínicas do HC-FMRP/USP para dosagem de uréia, creatinina, bilirrubinas, TGP/ALT, TGO/AST, glicemia, gama-GT, fosfatase alcalina, albumina, α 1 glicoproteína ácida e proteínas séricas totais, para a avaliação das funções renal e hepática.

As amostras seriadas de sangue materno para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos foram coletadas nos tempos zero e 1; 2; 4; 6; 8 e 12 h após a administração do LPV/RTV. Durante cada coleta de sangue, foram retirados aproximadamente 3 mL de sangue em seringa não heparinizada, sendo este volume desprezado para evitar interferência nas análises a serem realizadas. Posteriormente, foram coletados 10 mL de sangue e transferido para o tubo heparinizado BD Vacutainer® de 10 mL. Após cada coleta sangüínea, o cateter intravenoso foi novamente salinizado. As amostras de plasma para análise cromatográfica foram obtidas por centrifugação (2500 rpm por 15 minutos) (centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão) das amostras de sangue. As amostras de plasma foram armazenadas a -70°C até o momento da análise.

3.2.2 Coleta de amostras no momento do parto

Na segunda etapa, as amostras foram coletadas no momento do parto para avaliar a transferência placentária e a distribuição do LPV/RTV no compartimento da unidade materno-placentária-fetal.

3.2.2.1 Coleta de sangue materno na extração fetal

No momento da extração fetal, foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue materno para a determinação das concentrações plasmáticas do LPV/RTV.

3.2.2.2 Coleta de sangue do cordão umbilical

A coleta de sangue do cordão umbilical só foi efetuada após o clampeamento e secção do cordão umbilical, não oferecendo riscos para a mãe e para o neonato.

Após o nascimento da criança, a placenta foi transferida para uma mesa de procedimento, protegida com compressas estéreis, instalada na sala de parto. O lado basal ou fetal foi voltado para cima de forma que o cordão umbilical esteja exposto para ser lavado com solução fisiológica 0,9 %. Seguido este procedimento, foram localizadas as duas artérias umbilicais para a coleta de uma alíquota de sangue (volume de 0,5-5 mL) utilizando seringa heparinizada e agulha 23G (0,60 x 25 mm). Posteriormente, foi coletada da veia umbilical uma amostra de 10 mL de sangue com o auxílio de seringa heparinizada e agulha 21G (0,8 x 25 mm).

Todas as amostras de sangue materno e sangue umbilical para a análise do LPV/RTV foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas até o Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da FCFRP-USP, onde as alíquotas de plasma foram armazenadas a -70 °C até a análise.

3.2.3 Análise do lopinavir e ritonavir em plasma

3.2.3.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de LPV e RTV (purezas respectivamente de 99,8% e 99,4%, Rockville, Italy) foi preparada na concentração de 1000 µg de LPV e RTV/mL de metanol. A partir dessa solução foram realizadas diluições para obtenção das soluções de uso, nas concentrações 12,80; 25,60; 51,20; 320; 1600; 4000; 20000 e 50000 ng de LPV e RTV/mL de metanol. A solução de antipirina (padrão interno - PI, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 200 µg/mL de metanol e diluída para 2000 ng/mL de metanol.

Os controles de qualidade foram preparados nas concentrações 6,40 ng/mL plasma para o LPV e 3,20 ng/mL plasma para o RTV (LIQ – limite inferior de quantificação), 12,80 ng/mL plasma para o LPV e 6,40 ng/mL plasma para o RTV (CQB – controle de qualidade de

baixa concentração), 5000 ng/mL plasma para o LPV e RTV (CQM – controle de qualidade de média concentração), 10000 ng/mL plasma para o LPV e RTV (CQA – controle de qualidade de alta concentração), e 20000 ng/mL plasma para o LPV e RTV [CQD – controle de qualidade de diluição (diluído com plasma branco na proporção de 1:5)].

O metanol, solvente empregado para diluição das soluções padrão foi obtido da Tedia Way (Fairfield, EUA), a acetonitrila utilizada no preparo da fase móvel foi obtida da J. T. Baker (Philipsburg, NJ, EUA) e o solvente extrator utilizado para o preparo das amostras foi obtido da Fisher Chemical (New Jersey, EUA), todos como grau cromatografia. O ácido fórmico 85% empregado como modificador orgânico da fase móvel foi obtido da Labsynth Produtos para Laboratório Ltda. (Diadema, Brasil), como grau analítico. A água utilizada durante o experimento e na fase móvel foi obtida em sistema de purificação Sinergy UV[®] (Millipore, Molsheim, França).

O experimento foi realizado utilizando vidraria âmbar e sob luz amarela para evitar a fotodegradação do LPV e RTV, como descrito pelo próprio fabricante (Rockville, Italy).

3.2.3.2 Instrumentação

A separação do LPV, RTV e PI antipirina foi obtida na coluna de fase reversa C18e, comercializada como Lichrocart[®] (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) de 125 x 4 mm, partículas de 5 µm e com pré-coluna C18, mantida à 24°C. A fase móvel utilizada foi constituída de acetonitrila, água e ácido fórmico (50:50:01, v/v/v) na vazão de 1,3 mL/min.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo. A voltagem do capilar foi de 3 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120 e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização no fluxo de 400 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2,52 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 20 V para o LPV, 22 V para o RTV e 25 para o PI. A energia de colisão foi de 15 eV para o LPV e de 20 eV para o RTV e PI. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 10 µL/min.

As análises foram executadas no modo MRM (Monitoramento de reações múltiplas). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 630>447 para o LPV, 721>296 para o RTV e 189 > 104 para o PI. A aquisição e a

quantificação de dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4,1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.3.3 Preparo da amostra

As amostras de plasma branco de voluntários sadios (não tratados com LPV e RTV) foram obtidas do Hemocentro do HC-FMRP/USP.

Em tubos de vidro de extração, alíquotas de 100 µL de plasma foram enriquecidas com 25 µL da solução de uso do padrão interno (antipirina) e 3 mL de éter metil *terc*-butílico. Posteriormente, os tubos foram vedados e agitados em plataforma horizontal por 30 minutos a 220 ± 10 ciclos/minuto (Agitador de mesa reciprocante modelo MA 139 / CTF da Marconi) e em seguida centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm (Centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão). A seguir, as fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos de vidro e evaporadas em concentrador de amostras (Christ RCV 2-25 CO plus e Christ CT 04-50 SR). Os resíduos foram reconstituídos com 125 µL da fase móvel e volumes de 75 µL foram introduzidos no sistema cromatográfico para a análise.

3.2.4 Validação do método de análise do lopinavir e ritonavir em plasma

O método de análise do LPV e RTV em plasma foi validado de acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 para métodos bioanalíticos.

3.2.4.1 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se 8 amostras de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os plasmas foram processados de acordo com o item 3.2.3.3. Após o procedimento de extração, as fases orgânicas foram acrescidas das soluções de padrão interno (PI) e LPV e RTV, nas mesmas concentrações das amostras de CQB (12,80 ng de LPV/mL plasma e 6,40 ng de RTV/mL plasma) e CQA (10000 ng de LPV e RTV/mL plasma). Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = (\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}) / (\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução})$$

3.2.4.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da análise de três curvas de calibração, construídas através de alíquotas de 100 µL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de solução padrão de LPV e RTV nas concentrações de 6,40; 12,80; 80; 400; 1000; 5000 e 12500 ng de LPV/mL de plasma e 3,20; 6,40; 12,80; 80; 400; 1000; 5000 e 12500 ng de RTV/mL de plasma, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e PI) e da amostra zero (contendo apenas PI).

3.2.4.3 Precisão e Exatidão

A repetibilidade e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra-corrida e intercorridas. Os estudos foram realizados nas concentrações de 6,40 ng de LPV/mL plasma e 3,20 ng de RTV/mL plasma (LIQ); 12,80 ng de LPV/mL plasma e 6,40 ng de RTV/mL plasma (CQB); 5000 ng de LPV e RTV/mL plasma (CQM); 10000 ng de LPV e RTV/mL plasma (CQA) e 20000 ng de LPV e RTV/mL plasma (Diluído com plasma branco na proporção de 1:5 - CQD). Estas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-corrida foram analisadas 5 alíquotas destas soluções através de uma única curva de calibração. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 alíquotas de cada controle de qualidade em 3 diferentes corridas.

Os resultados da precisão intra e intercorridas foram expressos pelo cálculo do coeficiente de variação e os resultados da exatidão foram expressos pelo cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = [(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) / \text{Valor nominal}] * 100$$

3.2.4.4 Estabilidade

Para a avaliação da estabilidade do LPV e RTV foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com 12,80 ng de LPV/mL plasma e 6,40 ng de RTV/mL plasma (CQB) e 10000 ng de LPV e RTV/mL plasma (CQA). Foram analisadas 3 alíquotas de cada controle de qualidade através de uma única curva de calibração, imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaios aplicáveis.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -70°C por 24 h, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor por um período de 20 h à 12°C , sendo então injetadas no sistema cromatográfico.

Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas na bancada por 4 h à 23°C .

Os resultados dos estudos de estabilidade foram expressos em porcentagem de desvio em relação ao valor nominal.

3.2.5 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática total *versus* tempo. Foi empregado o programa WinNonlin, versão 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, Califórnia, EUA). A disposição cinética do LPV e RTV foi avaliada no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h, empregando modelo não compartimental. A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC^{0-12}) foi calculada pelo método dos trapezóides. O *clearance* total aparente (Cl_T/F) foi obtido através da equação $\text{Cl}_T/\text{F} = \text{Dose}/\text{AUC}^{0-12}$. O volume de distribuição aparente (Vd/F) foi calculado pela equação padrão do *software* (GABRIELSSON & WEINER, 2000). A concentração plasmática média no estado de equilíbrio foi calculada pela equação $\text{C}^{\text{ss}} = \text{AUC}^{0-12}/12$. Também foram avaliadas a concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio ($\text{C}^{\text{ss}}_{\text{min}}$), a concentração plasmática máxima no estado de equilíbrio ($\text{C}^{\text{ss}}_{\text{max}}$), o tempo médio de residência (MRT) e a porcentagem de flutuação das concentrações plasmáticas.

3.2.6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prisma® para obtenção da média, mediana (percentis 25 e 75), erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança 95% (IC 95%).

Resultados

4. Resultados

4.1 Características das pacientes investigadas

A fase de recrutamento das pacientes foi realizada no Ambulatório de Moléstias Infecto-contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do HC-FMRP/USP, sendo selecionadas 7 pacientes portadoras do HIV.

Os dados demográficos das pacientes internadas durante o 3º trimestre de gestação na Unidade de Pesquisa Clínica do HC-FMRP/USP estão apresentados na Tabela 1 como mediana (percentis 25 e 75) e no APÊNDICE A (Tabela i) como valores individuais. Duas pacientes eram primigestas e 3 pacientes eram multigestas. A idade das pacientes expressa em mediana foi de 35 anos, a idade gestacional foi de 36 semanas e 5 dias, o peso gestacional foi de 79 Kg e o IMC gestacional foi de 27 Kg/m². As pacientes investigadas não apresentaram efeitos adversos durante o período do estudo.

Tabela 1: Características das pacientes investigadas (n=7).

Parâmetros	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Idade (anos)	19	35	35
Peso (Kg)	58,95	79,00	84,65
Altura (m)	1,57	1,58	1,64
IMC (Kg/m ²)	23,61	27,00	33,87
IG (semanas(s) e dias(d))	36s 4d	36s 5d	36s 7d

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado; IG: Idade Gestacional, dado em semanas (s) e dias (d).

Todas as pacientes realizaram pré-natal de maneira satisfatória. Foram realizados exames clínicos e laboratoriais para a avaliação da função hepática (TGP/ALT, TGO/AST, gama-GT, bilirrubina total e frações e fosfatase alcalina), função renal (uréia, creatinina, sódio e potássio) e avaliação metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL e glicemia de jejum). Os valores dos referidos exames para as pacientes portadoras do HIV estão apresentados na Tabela 2 como mediana (percentis 25 e 75) e no APÊNDICE B (Tabela iii) como valores individuais. Foram realizados também exames laboratoriais para a avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico, o qual está apresentado na Tabela 3 como mediana

(percentis 25 e 75) e no APÊNDICE C (Tabela iv) como valores individuais. Todas as pacientes apresentaram sorologias negativas para o vírus da Hepatite B (HBsAg), Hepatite C (HCV), para a Sífilis (VDRL), Toxoplasmose e Rubéola. Ainda, apresentaram exame parasitológico de fezes, Urina I e urocultura negativos.

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos das pacientes investigadas (n=7).

Parâmetros	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Uréia (10-50 md/dL)	13,00	18,00	22,00
Creatinina plasmática (0,7-1,5 mg/dL)	0,50	0,66	0,67
Bilirrubina			
Total (0,2-1,2 mg/dL)	0,25	0,40	0,48
Direta (até 0,3 mg/dL)	0,08	0,12	0,15
Indireta (até 0,9 mg/dL)	0,18	0,26	0,36
TGP/ALT (até 31U/L)	7,40	9,50	19,30
TGO/AST (até 32U/L)	14,00	16,00	20,60
Albumina (3,5-4,8 g/dL)	3,27	3,50	3,72
Glicemia (70 -100 mg/dL)	66,00	79,00	90,00
GTT 75g ($\geq$ 92/180/153 mg/dL)	80,75/114,30/81,50	83/151,50/112,50	89/153,30/116,80
Gama-GT (11-50 U/L)	14,00	16,00	20,00
Alfa 1-glicoproteína ácida (50-120 mg/dL)	48,00	55,20	71,20
Fosfatase alcalina (65-300 U/L)	203,00	314,00	385,00
Proteínas totais (6- 8,5 g/dL)	5,90	6,50	6,70
Colesterol Total (< 200mg/dL)	179,00	223,00	280,00
HDL (> 35 mg/dL)	38,00	57,00	62,00
LDL (< 130 mg/dL)	108,00	114,00	151,00
Triglicerídes (< 150mg/dL)	162,00	221,00	296,00
Na+ (135 – 145 mEq/L)	137,10	139,40	141,50
K+ (3,5 – 5 mEq/L)	3,80	4,30	4,30

Tabela 3: Avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das pacientes investigadas (n=7).

Parâmetros	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Glóbulos vermelhos (3,9 a 5 10^6 /uL)	3,17	3,52	3,73
Hemoglobina (12 a 15,5 g/dL)	10,10	11,70	12,60
Hematócrito (35 a 45 %)	30,00	34,00	38,00
Glóbulos Brancos (3500 a 10500 10^3 /uL)	6700	7600	9500
Neutrófilos (1700 a 8000 10^3 /uL)	4000	5000	6400
Linfócitos (900-2900 10^3 /uL)	1400	1900	2000
Plaquetas (150 a 450 10^3 /uL)	228,00	249,00	305,00

A internação para a resolução do parto aconteceu entre 37 e 41 semanas de gestação. Todas as pacientes investigadas (n=7) apresentaram carga viral < 40 cópias/mL (abaixo do limite de detecção), sendo 6 submetidas a resolução do parto por via vaginal (natural) e 1 submetida a resolução do parto por via abdominal (cesária) devido à falha no processo de indução do parto natural.

4.2 Características dos recém-nascidos

Os recém-nascidos das pacientes investigadas não apresentaram doenças diagnosticadas ao nascer. Os valores de peso e altura ao nascer estão apresentados na Tabela 4 como mediana (percentis 25 e 75) e no APÊNDICE A (Tabela ii) como valores individuais.

Todos os recém-nascidos apresentaram Índice de Apgar maior ou igual a 7 no 1º minuto e de 9 a 10 no 5º minuto. Estes recém-nascidos apresentaram evolução favorável no período pós-natal e receberam alta hospitalar no mesmo momento da alta materna, após 48 horas da internação para resolução do parto.

O peso das placentas expressa em mediana foi de 500 g, sendo que as placentas eram discóides e nenhuma apresentou alterações macroscópicas relevantes (Tabela 4).

Tabela 4: Características dos recém-nascidos (n=7).

Parâmetros	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Peso do recém-nascido (g)	2355	2745	2915
Estatura (cm)	45	47	48
Peso da placenta (g)	435	500	620

4.3 Validação do método de análise do lopinavir e ritonavir em plasma empregando LC-MS/MS

A Figura 2 mostra os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 630>447 para o LPV.

Figura 2 - Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) do lopinavir.

A Figura 3 mostra os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 721>296 para o RTV.

Figura 3 - Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) do ritonavir.

A Figura 4 mostra os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 189>104 para a antipirina (PI).

Figura 4 - Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) da antipirina.

A Figura 5 apresenta os cromatogramas referentes à análise de plasma branco nas transições do LPV, RTV e antipirina (PI).

Figura 5 - Cromatogramas referentes à análise de plasma branco. (A) Plasma branco, referente a transição do lopinavir; (B) Plasma branco, referente a transição do ritonavir e (C) Plasma branco, referente a transição da antipirina.

A Figura 6 apresenta os cromatogramas referentes à análise do LPV e RTV em plasma enriquecido com LPV e RTV (400 ng de cada fármaco/mL) e plasma de gestante portadora do HIV 4 h após a administração de 400 mg de LPV e 100 mg de RTV.

Figura 6 - Cromatogramas referentes à análise do lopinavir (LPV) e do ritonavir (RTV) em plasma. Plasma de gestante portadora do HIV 4 h após a administração de 400 mg LPV (A) e de 100 mg RTV (B) enriquecido com padrão interno (PI) antipirina (2000 ng/mL) (C). Plasma humano enriquecido com LPV (400 ng/mL) (D), RTV (400 ng/mL) (E) e PI (2000 ng/mL) (F).

As Tabelas 5 e 6 apresentam os limites de confiança do método de análise do LPV e do RTV em plasma, respectivamente.

Tabela 5: Limites de confiança do método de análise do lopinavir em plasma.

	lopinavir
Efeito Matriz (CV%)	10,20
Linearidade (ng/mL)	6,40 – 12500
Equação da reta	$y=0,0012x+0,0019$
Coefficiente de correlação linear	$r = 0,996$
Limite de Quantificação (6,40 ng/mL)	
Precisão (CV %, n = 10)	7,09
Exatidão (Inexatidão %)	5,66
Precisão intra-corrida (CV %)	
LIQ - 6,40 ng/mL (n=5)	4,40
CQB - 12,80 ng/mL (n=5)	8,58
CQM - 5000 ng/mL (n=5)	2,44
CQA - 10000 ng/mL (n=5)	5,83
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=5)	8,43
Precisão intercorridas (CV %)	
LIQ - 6,40 ng/mL (n=15)	2,31
CQB - 12,80 ng/mL (n=15)	1,77
CQM - 5000 ng/mL (n=15)	2,95
CQA - 10000 ng/mL (n=15)	3,41
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=15)	1,35
Exatidão intra-corrida (EPR %)	
LIQ - 6,40 ng/mL (n=5)	6,34
CQB - 12,80 ng/mL (n=5)	0,00
CQM - 5000 ng/mL (n=5)	-4,62
CQA - 10000 ng/mL (n=5)	-2,17
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=5)	3,49
Exatidão intercorridas (EPR %)	
LIQ - 6,40 ng/mL (n=15)	7,03
CQB - 12,80 ng/mL (n=15)	2,07
CQM - 5000 ng/mL (n=15)	-3,44
CQA - 10000 ng/mL (n=15)	-5,53
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=15)	4,29

CV= coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100

EPR= erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal] * 100

LIQ= limite inferior de quantificação do método

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQM= controle de qualidade de média concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

CQD= controle de qualidade de diluição

Tabela 6: Limites de confiança do método de análise do ritonavir em plasma.

	ritonavir
Efeito Matriz (CV%)	7,80
Linearidade (ng/mL)	3,20 – 12500
Equação da reta	$y=0,0016x+0,0001$
Coefficiente de correlação linear	$r = 0,994$
Limite de Quantificação (3,20 ng/mL)	
Precisão (CV %, n = 10)	6,80
Exatidão (Inexatidão %)	-1,69
Precisão intra-corrida (CV %)	
LIQ - 3,20 ng/mL (n=5)	6,48
CQB - 6,40 ng/mL (n=5)	4,41
CQM - 5000 ng/mL (n=5)	9,56
CQA - 10000 ng/mL (n=5)	4,04
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=5)	5,13
Precisão intercorridas (CV %)	
LIQ - 3,20 ng/mL (n=15)	4,36
CQB - 6,40 ng/mL (n=15)	5,21
CQM - 5000 ng/mL (n=15)	4,89
CQA - 10000 ng/mL (n=15)	4,73
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=15)	2,38
Exatidão intra-corrida (EPR %)	
LIQ - 3,20 ng/mL (n=5)	0,94
CQB - 6,40 ng/mL (n=5)	-4,84
CQM - 5000 ng/mL (n=5)	-1,73
CQA - 10000 ng/mL (n=5)	-0,23
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=5)	0,05
Exatidão intercorridas (EPR %)	
LIQ - 3,20 ng/mL (n=15)	-3,58
CQB - 6,40 ng/mL (n=15)	-0,58
CQM - 5000 ng/mL (n=15)	-1,93
CQA - 10000 ng/mL (n=15)	-1,83
CQD - 20000 ng/mL (1:5) (n=15)	1,33

CV= coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100

EPR= erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal] * 100

LIQ= limite inferior de quantificação do método

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQM= controle de qualidade de média concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

CQD= controle de qualidade de diluição

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados obtidos na avaliação da estabilidade do LPV e RTV em plasma, respectivamente.

Tabela 7: Estudo de estabilidade do lopinavir em plasma.

Estabilidade (Desvio %)	lopinavir
Ciclos de congelamento e descongelamento (24h), -70°C	
CQB – 12,80 ng/mL (n=3)	-1,34
CQA - 10000 ng/mL (n=3)	-10,56
Curta duração (4h), 23°C	
CQB – 12,80 ng/mL (n=3)	6,80
CQA - 10000 ng/mL (n=3)	- 11,85
Pós Processamento (20h), 12°C	
CQB – 12,80 ng/mL (n=3)	7,81
CQA - 10000 ng/mL (n=3)	-8,60

% desvio em relação ao valor nominal

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

Tabela 8: Estudo de estabilidade do ritonavir em plasma.

Estabilidade (Desvio %)	ritonavir
Ciclos de congelamento e descongelamento (24h), -70°C	
CQB – 12,80 ng/mL (n=3)	6,59
CQA - 10000 ng/mL (n=3)	-6,66
Curta duração (4h), 23°C	
CQB – 12,80 ng/mL (n=3)	7,97
CQA - 10000 ng/mL (n=3)	- 11,45
Pós-processamento (20h), 12°C	
CQB – 12,80 ng/mL (n=3)	1,95
CQA - 10000 ng/mL (n=3)	-7,09

% desvio em relação ao valor nominal

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

4.4 Análise farmacocinética do lopinavir e ritonavir em pacientes portadoras do HIV

A disposição cinética do LPV e do RTV foi avaliada, no estado de equilíbrio, em pacientes portadoras do HIV (n=7) após a administração oral de 400 mg de LPV e 100 mg de RTV/12h, empregando o modelo não compartimental. As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Figura 7 e os parâmetros farmacocinéticos, expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95% (IC 95%), estão apresentados na Tabela 9. Os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados no APÊNDICE D (Tabela v) para o LPV e no APÊNDICE E (Tabela vi) para o RTV.

Figura 7 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo do lopinavir (LPV) e do ritonavir (RTV) no estado de equilíbrio em pacientes portadoras do HIV (n=7) após tratamento oral de 400 mg de LPV e 100 mg de RTV/12h. (A) lopinavir, (B) ritonavir. Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

Tabela 9: Disposição cinética do lopinavir (LPV) e do ritonavir (RTV) em pacientes tratadas com 400 mg de LPV e 100 mg de RTV/12h por via oral. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetros	lopinavir	ritonavir
$C_{\min}$ ($\mu\text{g/mL}$)	4,18 4,46 (2,73-6,19)	0,10 0,14 (0,02-0,25)
$t_{\min}$ (h)	12,00 8,86 (3,89-13,82)	12,00 8,29 (3,49-13,08)
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	14,63 14,68 (10,62-18,74)	0,64 0,85 (0,48-1,23)
$t_{\max}$ (h)	4,00 4,00 (2,93-5,07)	4,00 4,00 (4,00-4,00)
AUC^{0-12} ($\mu\text{g.h/mL}$)	95,21 104,78 (79,03-130,53)	4,47 4,53 (3,23-5,82)
$C_{\text{média}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	7,93 8,73 (6,59-10,88)	0,37 0,39 (0,26-0,52)
MRT (h)	10,92 11,62 (9,22-14,02)	6,59 6,50 (5,76-7,23)
$t_{1/2}$ (h)	6,72 6,88 (5,31-8,45)	3,20 3,15 (2,58-3,72)
Kel (h^{-1})	0,10 0,10 (0,08-0,13)	0,22 0,22 (0,18-0,27)
Vd/F (L)	37,91 39,19 (28,78-49,60)	110,43 110,42 (67,50-153,33)
Cl_T/F (L/h)	4,20 4,03 (3,17-4,88)	22,39 23,63 (16,82-30,44)
Flutuação (%)	112,40 117,20 (90,17-144,30)	156,80 186,10 (118,90-253,30)

$C_{\min}$: concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio; $t_{\min}$: tempo para alcançar $C_{\min}$; $C_{\max}$: concentração plasmática máxima no estado de equilíbrio; $t_{\max}$: tempo para alcançar $C_{\max}$; AUC^{0-12} : área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; $C_{\text{média}}$: Concentração plasmática média no estado de equilíbrio; MRT: Tempo médio de residência; $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação; Kel: constante de velocidade de eliminação; Vd/F: volume de distribuição aparente; Cl_T/F : *clearance* total aparente

4.5 Avaliação da transferência placentária do lopinavir e ritonavir

Na tabela 10 estão apresentados os valores individuais, a mediana (percentil 25 e percentil 75), a média e o intervalo de confiança (IC 95%) das concentrações do LPV e do RTV nas amostras de plasma materno e plasma da veia e da artéria do cordão umbilical das parturientes portadoras do HIV.

Tabela 10: Concentrações plasmáticas do lopinavir e do ritonavir em amostras coletadas no momento do parto de pacientes tratadas com dose múltipla oral de lopinavir/ritonavir.

Parturientes	lopinavir			ritonavir		
	Plasma materno (ng/mL)	Veia umbilical (ng/mL)	Artéria umbilical (ng/mL)	Plasma materno (ng/mL)	Veia umbilical (ng/mL)	Artéria umbilical (ng/mL)
1	8040,47	2150,04	1426,04	133,10	23,85	26,41
2	5165,63	488,24	490,57	94,02	6,23	4,02
3	15317,05	2693,53	-	2690,87	148,27	-
4	-	-	-	-	-	-
5	3755,50	511,72	559,80	107,15	11,10	3,66
6	6528,13	602,30	347,63	481,73	38,35	3,47
7	4772,98	416,61	-	282,7	13,89	-
Mediana	5847,00	557,00	525,20	207,90	18,87	3,84
Percentil 25	4519,00	470,30	383,40	103,90	9,88	3,52
Percentil 75	9860,00	2286,00	1209,00	1034,00	65,83	20,81
Média	7263,00	1144,00	706,00	631,60	40,28	9,39
IC 95%	2838,00 11689,00	87,45 2200,00	70,64 1483,00	438,40 1702,00	16,51 97,07	8,67 27,45

- dado não disponível

Na Tabela 11 estão apresentados os dados de transferência placentária do LPV e do RTV. Os dados foram expressos como valores individuais, mediana (percentis 25 e 75), média e intervalo de confiança (IC 95%).

Tabela 11: Transferência placentária do lopinavir e do ritonavir em parturientes portadoras do HIV.

Parturientes	lopinavir			ritonavir		
	Veia umbilical/ Plasma materno	Artéria umbilical/ Plasma materno	Artéria umbilical/ Veia umbilical	Veia umbilical/ Plasma materno	Artéria umbilical/ Plasma materno	Artéria umbilical/ Veia umbilical
1	0,27	0,18	0,66	0,18	0,20	1,11
2	0,09	0,09	1,00	0,07	0,04	0,64
3	0,17	-	-	0,05	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	0,14	0,15	1,09	0,10	0,03	0,33
6	0,09	0,05	0,58	0,08	0,01	0,09
7	0,09	-	-	0,05	-	-
Mediana	0,11	0,12	0,83	0,07	0,04	0,49
Percentil 25	0,09	0,06	0,60	0,05	0,01	0,15
Percentil 75	0,20	0,17	1,07	0,12	0,16	0,99
Média	0,14	0,12	0,83	0,09	0,04	0,14
IC 95%	0,07	0,03	0,43	0,07	0,07	0,21
	0,21	0,21	1,24	0,54	0,16	1,24

- dado não disponível

Dissertação

5. Discussão

No presente estudo foi avaliada a disposição cinética do LPV/RTV em pacientes portadoras do HIV. Para todas as voluntárias investigadas, foram padronizados um regime de dose múltipla de pelo menos 2 semanas, portanto, foram investigadas na fase de estado de equilíbrio, durante o intervalo de dose de 12 h de administração de 400 mg de LPV e 100 mg de RTV.

Todas as pacientes foram submetidas à avaliação da função metabólica, função renal e hepática, além da quantificação dos níveis séricos de proteínas totais, alfa 1-glicoproteína ácida e albumina. Os resultados obtidos foram considerados dentro dos valores de normalidade, exceto discreta elevação da fosfatase alcalina para quatro pacientes, discreta redução da glicemia e observação de dislipidemia (APÊNDICE B). Durante o período gestacional a fosfatase alcalina também é produzida pela placenta, além do fígado, intestino, rins e ossos, explicando o aumento desta enzima nas pacientes avaliadas (DARBY et al., 2011). A glicemia discretamente reduzida para duas pacientes pode ser atribuída ao jejum pré-internação. A dislipidemia observada na maioria das pacientes investigadas está de acordo com dados da literatura de que pacientes com a infecção pelo HIV, particularmente aquelas com anormalidades da composição corporal associadas, tem um perfil de dislipidemia com diminuição do HDL e aumento do colesterol total, LDL e triglicérides. Isso pode ser associado à própria infecção do HIV e aos ARV utilizados, em particular os inibidores de protease (STANLEY;GRINSPOON, 2012; PINTO NETO et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Ressalta-se ainda que em três pacientes investigadas valores discretamente abaixo daqueles considerados referência também foram observados para a hemoglobina (APÊNDICE C). Essa diminuição pode ser atribuída aos ARV utilizados para o controle da infecção viral ou como profilaxia da transmissão vertical do HIV (VOLBERDING, 2002).

A investigação da farmacocinética do LPV e do RTV em gestantes exigiu o desenvolvimento e a validação de um método de análise sequencial dos fármacos em plasma, com sensibilidade compatível com as concentrações plasmáticas observadas em pacientes tratadas com doses múltiplas de 400 e 100 mg/12 h de LPV e RTV, respectivamente.

O método de análise do LPV/RTV em plasma foi desenvolvido empregando LC-MS/MS, baseando-se nos trabalhos disponíveis na literatura como o de Jung et al. (2007), Myasein et al. (2009), Quaranta et al. (2009); Else et al. (2010) e Mishra et al. (2012). O sistema de detecção por espectrometria de massas utilizado foi o Quattro Micro LC triplo

quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo.

O LPV, o RTV e o padrão interno antipirina foram separados utilizando a coluna de fase reversa C18e comercializada como Lichrocart[®] (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) de 125 x 4 mm, partículas de 5 µm e com pré-coluna C18, mantida à 24°C. Durante o período de padronização do método, foram experimentadas as colunas Select B e C8, porém os resultados apresentados foram inferiores aos observados na coluna utilizada no presente estudo. O mesmo foi observado em outros trabalhos, onde a C18 também foi a coluna de escolha (JUNG et al., 2007; MYASEIN et al., 2009; QUARANTA et al., 2009; ELSE et al., 2010; MISHRA et al., 2012). Baseado nos artigos acima referenciados, foram feitos testes para determinar a fase móvel, utilizando acetonitrila, água e ácido fórmico em diferentes proporções. Dessa maneira, a fase móvel que teve um melhor resultado e se tornou a de escolha foi a constituída de 50% de acetonitrila, 50% de água e 0,1% de ácido fórmico. Simultaneamente, foram feitos diversos testes para determinar a vazão da mesma. Sendo que, a vazão de 1,3mL/min demonstrou uma melhor apresentação cromatográfica. Os compostos foram eluídos da coluna cromatográfica nos tempos de retenção de 6,76, 5,60 e 1,33 minutos para o LPV, RTV e antipirina (PI), respectivamente, totalizando 10 minutos de tempo total de corrida (Figura 6). Outros artigos utilizaram tampão como fase móvel, porém não são bem aceitos para este tipo de sistema de detecção.

Para o desenvolvimento do método foram empregadas alíquotas de apenas 100 µL de plasma enriquecidas com antipirina, utilizada como padrão interno, e extraídas com 3 mL de éter metil *terc*-butílico. As amostras de plasma branco demonstraram não ocorrer qualquer interferência endógena no método de análise do LPV/RTV (Figura 5). O método desenvolvido foi avaliado quanto ao efeito matriz empregando 8 amostras de plasma, sendo 4 de plasmas normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN). O coeficiente de variação entre todos os FMNs (concentrações de 12,80; 10000 ng de LPV e 6,40; 10000 ng de RTV/mL de plasma) foi inferior a 15% para ambos os compostos (Tabela 5 e 6, respectivamente), dessa forma, nenhum dos componentes da matriz biológica causou interferências na resposta do fármaco em análise ou do padrão interno. Outros tipos de extração empregando uma etapa prévia de precipitação foram experimentados. No primeiro teste, as amostras de 100 µL de plasma foram adicionadas de 200 µL de ácido fórmico 0,05%, agitadas no *vortex* por 1 minuto e em seguida extraídas com 3 mL de éter metil *terc*-butílico. No segundo teste, as amostras de 100

μL de plasma foram adicionadas de acetonitrila (200 μL) como agente precipitante, agitadas no *vortex* por 1 minuto e em seguida extraídas com 3 mL de éter metil *terc*-butílico. No entanto, quando realizou-se o teste de efeito matriz utilizando-se esses dois tipos de extração, o coeficiente de variação foi superior a 15% para ambas as extrações.

O limite de quantificação (LIQ), utilizando alíquotas de 100 μL de plasma no procedimento de extração, foi de 6,40 ng/mL plasma para o LPV (Tabela 5) e 3,20 ng/mL plasma para o RTV (Tabela 6). Estes resultados, quando comparados com trabalhos desenvolvidos por Martin et al. (2009); Myasein et al. (2009); Quaranta et al. (2009); Else et al. (2010) e Mishra et al. (2012), que quantificaram o LPV/RTV no plasma empregando LC-MS/MS, mostram que o método desenvolvido no presente estudo apresenta sensibilidade compatível para o RTV e maior sensibilidade para o LPV. Para o LPV os autores relataram LIQ variando entre 15-200 ng/mL de plasma e utilizaram alíquotas de 50 ou 100 μL de plasma. Já para o RTV, relataram valores de LIQ de 3,1-50 ng/mL de plasma, utilizando alíquotas de 50 ou 100 μL de plasma.

O LIQ de 6,40 e 3,20 ng/mL de plasma permitiu a análise do LPV/RTV até 12h após a administração de dose múltipla de 400 mg de LPV e 100 mg de RTV/12 h para todas as pacientes investigadas e também a análise das amostras coletadas no momento do parto (veia umbilical 416,61 a 2693,53 ng/mL para o LPV e 6,23 a 148,27 ng/mL para o RTV e artéria umbilical 347,63 a 1426,04 ng/mL para o LPV e 3,47 a 26,41ng/mL para o RTV). Os artigos de farmacocinética do LPV/RTV em gestantes (STEK et al., 2006; MIROCHNICK et al., 2008; BEST et al., 2010 e ELSE et al., 2011) também relataram valores de LIQ superiores ao desenvolvido pelo presente estudo.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas (Tabela 5 e 6) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados, podendo assim, ser utilizado como um trabalho de referência para outros estudos que envolvam a análise de LPV/RTV em plasma.

A avaliação da estabilidade em três ciclos de congelamento e descongelamento, manutenção durante 4 h em temperatura ambiente e durante 20 h à 12°C, após o processamento das amostras, apresentou valores de porcentagem de desvio inferiores a 15% (Tabela 7 e 8), garantindo a estabilidade dos analitos durante o descongelamento, preparo e o processamento das amostras.

As pacientes incluídas na investigação (n=7) foram submetidas a duas etapas do estudo clínico. Na etapa 1, realizada no terceiro trimestre de gestação, foram coletadas amostras seriadas de sangue no intervalo de 0-12 h para o estudo da farmacocinética do LPV/RTV. Na etapa 2, realizada no momento do parto, foram coletadas amostras de sangue materno e sangue da veia e artéria umbilical para o estudo da transferência placentária do LPV/RTV.

O LPV alcançou a concentração plasmática máxima ($C_{\max}$) de 14,63 (10,62-18,74) $\mu\text{g/mL}$ e $t_{\max}$ de 4,0 h (2,93-5,07) e o RTV $C_{\max}$ de 0,64 (0,48-1,23) $\mu\text{g/mL}$ e $t_{\max}$ de 4,0 h (4,0-4,0) (Tabela 9) nas pacientes portadoras do HIV tratadas com 400 mg de LPV e 100 mg de RTV a cada 12 h. Valores similares de $C_{\max}$ e $t_{\max}$ foram reportados por Santini-Oliveira et al. (2014), Else et al. (2011), Ramautarsing et al. (2011), Best et al. (2010) e Mirochnick et al. (2008) em pacientes durante o segundo ou terceiro trimestres da gestação tratadas com LPV/RTV nas mesmas doses do presente estudo (400mg/100mg).

Os valores de AUC^{0-12} de 95,21 (79,03-130,53) $\mu\text{g.h/mL}$ para o LPV e 4,47 (3,23-5,82) $\mu\text{g.h/mL}$ para o RTV obtidos na presente investigação também estão de acordo com os reportados por Santini-Oliveira et al. (2014), Else et al. (2011), Ramautarsing et al. (2011), Best et al. (2010) e Mirochnick et al. (2008), os quais variaram de 57,30-87,20 $\mu\text{g.h/mL}$ para o LPV e 2,90-4,33 $\mu\text{g.h/mL}$ para o RTV em gestantes durante o segundo ou terceiro trimestres da gestação tratadas com LPV/RTV nas mesmas doses do presente estudo (400mg/100mg).

A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do LPV obtida no presente estudo foi de 6,72 h (5,31-8,45) e do RTV foi de 3,20 h (2,58-3,72) em pacientes portadoras do HIV, valores similares ao relatado por Else et al. (2011), Ramautarsing et al. (2011), Best et al. (2010) e Mirochnick et al. (2008), os quais variaram de 4,80-6,02 h para o LPV e 3,10-4,70 h para o RTV. O *clearance* total aparente do LPV e do RTV nas pacientes portadoras do HIV investigadas foi de 4,20 (3,17-4,88) e 22,39 (16,82-30,44) L/h, respectivamente, valores similares ao relatado por Santini-Oliveira et al. (2014), Best et al. (2010) e Mirochnick et al. (2008) em pacientes portadoras do HIV durante o segundo ou terceiro trimestres da gestação, os quais variaram de 4,90-7,00 L/h para o LPV e de 27,40-35,00 L/h para o RTV. O volume de distribuição aparente (V_d/F) do LPV e do RTV nas pacientes portadoras do HIV investigadas foi de 37,91 (28,78-49,60) e 110,43 (67,50-153,33) L, respectivamente, de acordo com os estudos de Best et al. (2010) e Mirochnick et al. (2008) com valores que variaram de 41,00-49,00 L para o

LPV e de 158,00-210,00 L para o RTV em pacientes durante o segundo ou terceiro trimestres da gestação.

O valor de flutuação das concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio durante o intervalo de dose de 12 h $[(C_{\max}-C_{\min}/C_{\text{médio}})\times 100]$ encontrado no presente estudo foi de 112,40% para o LPV e 156,80% para o RTV.

Outro dado que merece destaque é a diferença observada entre os valores de AUC^{0-12} , Cl_T/F e Vd/F , para o LPV e o RTV quando as pacientes portadoras do HIV investigadas durante o terceiro trimestre da gestação são comparadas com os dados relatados por Crommentuyn et al. (2004) e Hsu et al. (2003) na investigação de mulheres não grávidas e homens portadores do HIV também tratados com 400 mg de LPV e 100 mg de RTV a cada 12 horas. Os valores reportados de AUC^{0-12} para mulheres não grávidas e homens foram de 63,50 a 75,40 $\mu\text{g.h/mL}$ para o LPV e 3,46 a 3,50 $\mu\text{g.h/mL}$ para o RTV. O Cl_T/F do LPV variou de 5,30 a 6,30 L/h e do RTV de 28,30 a 29,50 L/h. Em relação ao Vd/F relatado apenas por Crommentuyn et al. (2004), os valores foram de 55,70 L para o LPV e de 168,70 L para o RTV em mulheres não grávidas e homens.

Concluindo, os parâmetros farmacocinéticos do LPV e RTV obtidos no presente estudo para pacientes no terceiro trimestre da gestação estão de acordo com outros estudos anteriormente reportados para pacientes durante o segundo e terceiro trimestres da gestação (SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014; ELSE et al., 2011; RAMAUTARSING et al., 2011; BEST et al., 2010; MIROCHNICK et al., 2008). No entanto, os valores de AUC^{0-12} do presente estudo (79,03-130,53 $\mu\text{g.h/mL}$ para o LPV e 3,23-5,82 $\mu\text{g.h/mL}$ para o RTV) são próximos aos relatados para mulheres não grávidas e homens, conflitando com a sugestão de outros autores referente ao aumento das doses de LPV/RTV com base em comparações de valores de AUC^{0-12} entre o segundo e terceiro trimestres da gestação com o pós-parto (STEK et al., 2006; BEST et al., 2010; SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014).

No presente estudo, as concentrações do LPV e do RTV determinadas no plasma materno no momento do parto foram de 5847 (4519-9860) ng/mL e 207,90 (103,90-1034) ng/mL, respectivamente. Os valores encontrados nas amostras coletadas da veia umbilical foram 557 (470,30-2286) ng/mL para o LPV e 18,27 (9,88-65,83) ng/mL para o RTV e nas amostras coletadas da artéria umbilical os valores foram 525,20 (383,40-1209) ng/mL para o LPV e 3,84 (3,52-20,81) ng/mL para o RTV (Tabela 10).

Observou-se uma relação feto/materna (relação entre as concentrações séricas de LPV e RTV na veia umbilical e no sangue materno periférico) de 0,11 (0,09-0,20) para o LPV e

0,07 (0,05-0,12) para o RTV, indicando uma baixa transferência desses fármacos através da barreira placentária. As razões de concentrações na artéria umbilical/sangue materno foram de 0,12 para o LPV e 0,04 para o RTV, enquanto as razões veia umbilical/artéria umbilical foram de 0,83 para o LPV e 0,49 para o RTV (Tabela 11).

Os dados obtidos no presente estudo referentes a relação feto/materna de 0,11 (0,09-0,20) para o LPV concordam com os referidos na literatura para as pacientes portadoras do HIV, com valores variando de 0,17-0,20 (STEK et al., 2006; MIROCHNICK et al., 2008; BEST et al., 2010; ELSE et al., 2011; SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014). Em relação ao RTV, os valores do presente estudo 0,07 (0,05-0,12) também são comparáveis aos reportados na literatura com faixa de variação de 0,09-0,13 (ELSE et al., 2011; SANTINI-OLIVEIRA et al., 2014).

Concluindo, o método desenvolvido e validado para a análise sequencial do LPV/RTV em plasma é compatível com a aplicação em estudo de farmacocinética em pacientes por apresentar as vantagens do baixo volume de plasma requerido nas análises (100 µL), corrida cromatográfica de apenas 10 min, simples procedimento de extração líquido-líquido com éter metil *terc*-butilico, baixo LIQ (6,40 ng de LPV e 3,20 ng de RTV/mL de plasma), extensa linearidade (6,40-12500 ng de LPV/mL e 3,20-12500 ng de RTV/mL) e estabilidade assegurada em estudos de curta duração, ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento. A transferência placentária do LPV e RTV é baixa com valores inferiores a 20% e os valores de AUC^{0-12} obtidos para ambos os fármacos estão de acordo com os valores alvos relacionados com eficácia.

CONCLUSÃO

6. Conclusões

- O método de análise do LPV/RTV em plasma, empregando a coluna de fase reversa C18e acoplada ao sistema LC-MS/MS é sensível (limite de quantificação de 6,40 ng/mL para o LPV e 3,20 ng/mL para o RTV), preciso e exato (coeficiente de variação e erros relativos < 15%), o que permitiu a quantificação do LPV/RTV até 12 h após a administração de doses múltiplas de 400 mg do LPV e 100 mg do RTV/12 h.
- Os dados farmacocinéticos das pacientes investigadas corroboram com os dados encontrados na literatura.
- O LPV e o RTV apresentaram uma baixa transferência placentária, 11 e 7%, respectivamente.

RESERVOIR BLINDING GAS

7. Referências bibliográficas

ABDULJALIL, K.; FURNESS, P.; JOHNSON, T. N.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SOLTANI, H. Anatomical, physiological and metabolic changes with gestational age during normal pregnancy: a database for parameters required in physiologically based pharmacokinetic modelling. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v.51, n.6, p.365-96, 2012.

ANDERSON, G.D. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v.44, n.10, p.989-1008, 2005.

ANGER, G.J.; PIQUETTE-MILLER, M. Mechanisms of reduced maternal and fetal lopinavir exposure in a rat model of gestational diabetes. **Drug Metab and Dispos**, Bethesda, v.39, n.10, p.1850-1859, 2011.

BEST, B.M.; STEK, A.M.; MIROCHNICK, M.; HU, C.; READ, J.S.; CAPPARELLI, E.V. Lopinavir tablet pharmacokinetics with an increased dose during pregnancy. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v.54, n.4, p.381-388, 2010.

BUCKOREELALL, K.; CRESSEY, T.R.; KING, J.R. Pharmacokinetic optimization of antiretroviral therapy in pregnancy. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v.51, p.639-659, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: Agosto de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 59, de 28 de janeiro de 2003. Dispõe sobre a sub-rede de laboratórios do Programa Nacional de DST e Aids. Disponível em: <http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/legislacao/Portaria%2059%20de%2028%2001%2003.pdf>. Acesso em: 01/Jun/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Aids e DST. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2013>. Acesso em: 01/Jun/2014.

CALZA, L.; MANFREDI, R.; CHIODO, F. Dyslipidaemia associated with antiretroviral therapy in HIV- infected patients. **J Antimicrob Chemother**, London, v.53, n.1, p.10-14, 2004.

CAMUS, M.; DELIMÉNIE, C.; DIDIER, N.; FAYE, A.; GIL, S.; DAUGE, M.-C.; MABONDZO, A.; FARINOTTI, R. Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women. **Placenta**, London, v.27, n.6-7, p.699-706, 2006.

CASARETT, L.J.; DOULL, J.; KLAASEN, C.D. Biotransformation of Xenobiotics. In: **Toxicology the basic science of poisons**. 7 ed. New York McGraw-Hil, 2008, p. 161 – 304.

CECCALDI, P-F.; GAVALD, L.; MANDELBROT, L.; REY, E.; FARINOTTI, R.; TRELUYER, J-M.; GIL, S. Functional role of P-Glycoprotein and binding protein effect on

the placental transfer of lopinavir/ritonavir in the ex vivo human perfusion model. **Obstet Gynecol Int**, New York, v. 2009, p.1-6, 2009.

CECKOVA-NOVOTNA, M.; PAVEK, P.; STAUD, F. P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. **Reprod Toxicol**, Elmsford, n. 22, p.400-410, 2006.

CROMMENTUYN, K.M.; MULDER, J.W.; MAIRUHU, A.T.; VAN GORP, E.C.; MEENHORST, P.L.; HUITEMA, A.D.; BEIJNEN, J.H. The plasma and intracellular steady-state pharmacokinetics of lopinavir/ritonavir in HIV-1-infected patients. **Antivir Ther**, London, v.9, n.5, p.779-85, 2004.

DARBY, R.A.J; CALLAGHAN, R; MCMAHON, R.M. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. **Curr Drug Metabolism**, Oxford, v. 12, p. 722-31, 2011.

DE GORTER, M.K.; XIA, C.Q.; YANG, J.J.; KIM, R.B. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v.52, p.249-73, 2012.

DRUGBANK. Lopinavir. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01601>>. Acesso em: 01/Jun/2014.

DRUGBANK. Ritonavir. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00503>>. Acesso em: 01/Jun/2014.

ELSE, L.; WATSON, V.; TJIA, J.; HUGHES, A.; SICCARDI, M.; KHOO, S.; BACK, D. Validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) assay for the simultaneous determination of existing and new antiretroviral compounds. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, Amsterdam, v.878, p.1455-1465, 2010.

ELSE, L.J.; DOUGLAS, M.; DICKINSON, L.; BACK, D.J.; KHOO, S.H.; TAYLOR, G.P. Improved oral bioavailability of lopinavir in melt-extruded tablet formulation reduces impact of third trimester on lopinavir plasma concentrations. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.56, n.2, p.816-824, 2011.

FEGHALI, M.N.; MATTISON, D.R. Clinical Therapeutics in Pregnancy. **J Biomed Biotechnol**, Cairo, v.2011, p.1-13, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for Industry, Pharmacokinetics in Pregnancy - Study Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, October 2004: 1-14. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072133.pdf>>. Acesso em Julho de 2012.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts & Applications. 3rd edition. Stockholm, Sweden: Apotekarsocieteten, 2000. 924 p.

GAOHUA, L.; ABDULJALIL, K.; JAMEI, M.; JOHNSON, T.N.; HODJEGAN, A.R. A pregnancy physiologically-based pharmacokinetic (p-PBPK) model for disposition of drugs metabolized by CYP1A2, CYP3A4 and CYP2D6. **Br J Clin Pharmacol**, Oxford, 2012.

GULATI, A.; BOUDINOT, F.D.; GERK, P.M. Short communication binding of lopinavir to human α_1 -acid glycoprotein and serum albumin. **Drug Metab Dispos**, Bethesda, v.37, n.8, p.1572-1575, 2009.

GULATI, A.; GERK, P. M. Role of placental ATP-binding cassette (ABC) transporters in antiretroviral therapy during pregnancy. **J Pharm Sci**, v.98, n.7, p.2317-2335, 2008.

GROTTO, R. M. T.; PARDINI, M. I. M. C. Biologia Molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.13, n.3, p.61-64, 2006.

HEINE, R.T.; WATERSCHOOT, R.A.B.V.; KEIZER, R.J.; BEIJNEN, J.H.; SCHINKEL, A.H.; HUITEMA, A.D.R. An integrated pharmacokinetic model for the in vivo disposition of lopinavir and its modulation by ritonavir. **J Pharma Sci**, Hoboken, v.100, n.6, p. 2508-2515, 2011.

IQBAL, M.; AUDETTE, M.C.; PETROPOULOS, S.; GIBB, W.; MATTHEWS, S.G. Placental drug transporters and their role in fetal protection. **Placenta**, London, v.33, n.3, p.137-142, 2012.

ISOHERRANEN, N.; THUMMEL, K.E. Drug metabolism and transport during pregnancy: How does drug disposition change during pregnancy and what are the mechanisms that cause such changes? **Drug Metab Dispos**, Bethesda, v.41, n.2, p.256-62, 2013.

JUNG, B.H.; REZK, N.L.; BRIDGES, A.S.; CORBETT, A.H.; KASHUBA, A.D.M. Simultaneous dertermination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**, Chichester, v.21, p.1095-1104, 2007.

KILLIAN, M.S.; LEVY, J.A. HIV/AIDS: 30 years of progress and future challenges. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 41, 2011.

KLASSE, P. J. The molecular basis of HIV entry. **Cell Microbiol**, Oxford, v.14, n.8, p.1183-1192, 2012.

KNOPPERT, D. Safety and efficacy of drugs in pregnancy. **J Popul Ther Clin Pharmacol**, Toronto, v.18, n.3, p.506-12, 2011.

MARGOLIS, A.M.; HEVERLING, H.; PHAM, P.A.; STOLBACH, A. A Review of the Toxicity of HIV Medications. **J Med Toxicol**, New York, v.10, n.1, p.26-39, 2014.

MAHY, M.; STOVER, J.; KIRAGU, K.; HAYASHI, C.; AKWARA, P.; LUO, C.; STANECKI, K.; EKPINI, R.; SHAFFER, N. What Will it take to achieve virtual elimination of mother-to-child transmission of HIV? An assessment of current progress and future needs. **Sex Transm Infect**, London, v.86, n.2, p.48-55, 2010.

MARTIN, J.; DESLANDES, G.; DAILLY, E.; RENAUD, C.; RELIQUET, V.; RAFFI, F.; JOLLIET, P. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, Amsterdam, v.877, p. 3072-3082, 2009.

MYLLYNEN, P.; PASANEN, M.; VÄHÄKANGAS, K. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, London, v. 3, n. 3, p. 331-46, 2007.

MIROCHNICK, M.; BEST, B.M.; STEK, A.M.; CAPPARELLI, E.; HU, C.; BURCHETT, S.K.; HOLLAND, D.T.; SMITH, E.; GADDIPATI, S.; READ, J.S. Lopinavir exposure with an increased dose during pregnancy. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v.49, n.5, p.485-491, 2008.

MISHRA, T.; KURANI, H.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P.S. Simultaneous quantitation of HIV-protease inhibitors ritonavir, lopinavir and indinavir in human plasma by UPLC-ESI-MS-MS. **J Chromatogr Sci**, Oxford, v.50, p.625-635, 2012.

MYASEIN, F.; KIM, E.; ZHANG, J.; WU, H.; EL-SHOUBAGY, T.A. Rapid, simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/liquid extraction, and ultrafast LC-MS/MS. **Anal Chim Acta**, Amsterdam, v.651, p.112-116, 2009.

NEWELL, M.L.; BUNDERS, M.J. Safety of antiretroviral drugs in pregnancy and breastfeeding for mother and child. **Curr Opin HIV AIDS**, Hagerstown, v.8, n.5, p. 504-510, 2013.

PAL, D.; KWATRA, D.; MINOCHA, M.; PATURI, D. K.; BUDDA, B.; MITRA, A. K. Efflux transporters – and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. **Life Sci**, Amsterdam, v.88, n.21-22, p.959-971, 2012.

PINTO NETO, L.F. S.; NEVES, M. B.; RODRIGUES, R. R.; PAGE, K.; MIRANDA, A. E. Dyslipidemia and fasting glucose impairment among HIV patients three years after the first antiretroviral regimen in a Brazilian AIDS outpatient clinic. **Braz J Infect Dis**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 438-443, 2013.

POLI, G.; FAUCI, A.S. Cytokine modulation of HIV expression. **Semin Immunol**, London, v.5, n.3, p.165-73, 1993.

QUARANTA, S.; WOLOCH, C.; PACCOU, A.; GIOCANTI, M.; SOLAS, C.; LACARELLE, B. Validation of an electrospray ionization LC-MS/MS method for quantitative analysis of raltegravir, etravirine, and 9 other antiretroviral agents in human plasma samples. **Ther Drug Monit**, Hagerstown, v.31, n.6, 2009.

RAMAUTARSING, R.A.; LUGT, J.V.D.; GOROWARA, M.; KERR, S.J.; BURGER, D.; RUXRUNGTHAM, K.; PHANUPHAK, P.; CHAITHONGWONGWATTHANA, S.; AVIHINGSANON, A.; PHANUPHAK, N. Thai HIV-1-infected women do not require a dose increase of lopinavir/ritonavir during the third trimester of pregnancy. **AIDS**, London, v.25, n.10, p.1299-1303, 2011.

RUBINCHIK-STERN, M.; EYAL, S. Drug interactions at the human placenta: what is the evidence? **Front Pharmacol**, Lausanne, v.3, n.126, p.1-7, 2012.

SANTINI-OLIVEIRA, M.; ESTRELA, R.C.E.; VELOSO, V.G.; CATTANI, V.B.; YANAVICH, C.; VELASQUE, L.; TORRES, T.S.; MARINS, L.M.S.; PILOTTO, J.H.; JOÃO, E.C.; GONÇALVES, J.C.S.; GRINSZTEJN, B. Randomized clinical trial comparing the pharmacokinetics of standard- and increased-dosage lopinavir-ritonavir coformulation tablets in HIV-positive pregnant women. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.58, n.5, p.2884-93, 2014.

SHEBL, F.M.; YU, K.; LANDGREN, O.; GOEDERT, J.J.; RABKIN, C.S. Increased levels of circulating cytokines with HIV-related immunosuppression. **AIDS Res Hum Retroviruses**, Larchmont, v.28, n.8, p.809-15, 2012.

SMITH, R.L.; DE BOER, R.; BRUL, S.; BUDOVSKAYA, Y.; VAN DER SPEK, H. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? **Front Genet**, Lausanne, v.3, n.328, p.1-10, 2013.

SOUZA, S. J.; LUZIA, L. A.; SANTOS, S. S.; RONDÓ, P. H. C. Lipid profile of HIV-infected patients in relation to antiretroviral therapy: a review. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v.59, n.2, p.186–198, 2013.

STANLEY, T.L.; GRINSPOON, S.K. Body composition and metabolic changes in HIV-infected patients. **J Infect Dis**, Oxford, v.205, p.383-90, 2012.

STEK, A.M.; MIROCHNICK, M.; CAPPARELLI, E.; BEST, B.M.; HU, C.; BURCHETT, S.K.; ELGIE, C.; HOLLAND, D.T.; SMITH, E.; TUOMALA, R.; COTTER, A.; READ, J.S. Reduced lopinavir exposure during pregnancy. **AIDS**, London, v.20, n.15, p.1931-1939, 2006.

TRACY, T.S.; VENKATARAMANAN, R.; GLOVER, D.D. et al. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A activity) during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, New York, v.192, n.2, p. 633-9, 2005.

VANDERGEETEN, C.; FROMENTIN, R.; CHOMONT, N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v.23, n.4-5, p.143-9, 2012.

VOLBERDING, P. The impact of anemia on quality of life in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Dis**, Oxford, v. 185, p. S110-4, Suplemento 2, 2002.

WATERSCHOOT, R.V.; HEINE, R.T.; WAGENAAR, E.; KRUIJSSEN, C.M.M.V.D.; ROOSWINKEL, R.W.; HUITEMA, A.D.R.; BEIJNEN, J.H.; SCHINKEL, A.H. Effects of cytochrome P450 3A (CYP3A) and the drug transporters P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and MRP2 (ABCC2) on the pharmacokinetics of lopinavir. **Br J Pharmacol**, London, v.160, p.1224-1233, 2010.

ZHOU, H.; TAN, K.C.; SHIU, S.W. et al. Determinants of leukocyte adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 gene expression in type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, Philadelphia, v.57, n.8, p.1135-40, 2008.

AP ENGLISH

8. Apêndices

APÊNDICE A – Características individuais das pacientes investigadas e dos recém-nascidos

Tabela i – Características das pacientes portadoras do HIV (n=7)

Pacientes	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	IG (semanas(s) e dias(d))
1	19	61,20	1,57	24,83	36 s 5d
2	35	84,65	1,60	33,00	36 s
3	43	53,20	1,58	21,31	36 s 4 d
4	18	82,95	1,54	34,97	36 s 7 d
5	35	91,10	1,64	33,87	37 s 1 d
6	27	79,00	1,71	27,00	36 s 5 d
7	35	58,95	1,58	23,61	36 s 5 d

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado; IG: Idade Gestacional, dado em semanas (s) e dias (d).

Tabela ii – Características dos recém-nascidos (n=7)

Pacientes	Peso do recém-nascido (g)	Estatura (cm)	Peso da placenta (g)
1	2745	48,0	580
2	2830	47,0	500
3	2390	45,0	490
4	3475	51,0	725
5	2355	45,5	430
6	2915	47,5	620
7	2070	41,00	435

APÊNDICE B – Parâmetros bioquímicos

Tabela iii: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos das pacientes portadoras do HIV investigadas

Variáveis Estudadas	Pacientes						
Valores de Referência	1	2	3	4	5	6	7
Úrêia							
10-50 md/dL	20,00	25,00	13,00	18,00	17,00	22,00	10,00
Creatinina plasmática							
0,7-1,5 mg/dL	0,64	0,67	0,49	0,50	0,66	0,67	0,72
Bilirrubina							
Total 0,2-1,2 mg/dL	0,25	0,44	0,79	0,33	0,40	0,48	0,25
Direta até 0,3 mg/dL	0,08	0,12	0,18	0,11	0,15	0,12	0,08
Indireta até 0,9 mg/dL	0,18	0,32	0,61	0,22	0,26	0,36	0,17
TGP/ALT							
até 31U/L	7,00	8,00	17,8	31,00	9,50	19,30	7,40
TGO/AST							
até 32U/L	14,00	16,00	20,4	31,70	8,60	20,60	15,00
Albumina							
3,5-4,8 g/dL	3,60	3,20	3,40	3,70	3,80	-	3,30
Glicemia							
70 -100 mg/dL	93,00	90,00	66,00	64,00	79,00	90,00	77,00
GTT 75g							
≥92/180/153 mg/dL	82/152/113	-	77/73/85	84/128/71	89/151/122	89/157/112	82/152/115
Gama-GT							
11-50 U/L	16,00	10,00	14,00	30,00	15,00	16,00	20,00
Alfa 1-glicoproteína ácida							
50-120 mg/dL	109,00	51,00	53,70	58,60	56,70	-	39,00
Fosfatase alcalina							
65-300 U/L	314,00	203,00	323,00	385,00	247,00	186,00	388,00
Proteínas totais							
6- 8,5 g/dL	6,70	6,70	5,90	6,50	6,70	-	6,10
Colesterol Total							
< 200mg/dL	164,00	244,00	223,00	294,00	179,00	280,00	202,00
HDL							
> 35 mg/dL	34,00	51,00	59,00	57,00	38,00	63,00	62,00
LDL							
< 130 mg/dL	114,00	151,00	114,00	125,00	82,00	173,00	108,00
Triglicerídes							
< 150mg/dL	79,00	210,00	251,00	317,00	296,00	221,00	162,00
Na+							
135 – 145 mEq/L	137,13	141,50	142,00	139,40	139,10	133,00	139,50
K+							
3,5 – 5 mEq/L	4,13	4,30	4,46	3,80	4,30	3,70	4,30

- dado não disponível

APÊNDICE C – Exames laboratoriais para a avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico

Tabela iv: Dados individuais da avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das pacientes portadoras do HIV investigadas

Parâmetros	Pacientes						
	1	2	3	4	5	6	7
Glóbulos vermelhos (3,9 a 5 10^6 /uL)	3,52	3,17	3,31	3,63	3,73	2,64	4,61
Hemoglobina (12 a 15,5 g/dL)	9,40	11,80	13,40	11,70	11,10	10,10	12,60
Hematócrito (35 a 45 %)	29,00	34,00	39,00	34,00	34,00	30,00	38,00
Glóbulos Brancos (3500 a 10500 10^3 /uL)	8300	5100	6700	7000	7600	10500	9500
Neutrófilos (1700 a 8000 10^3 /uL)	5700	3200	4000	5000	4800	8000	6400
Linfócitos (900-2900 10^3 /uL)	1900	1200	2000	1500	2000	2100	1400
Plaquetas (150 a 450 10^3 /uL)	224,00	277,00	246,00	228,00	305,00	338,00	249,00

APÊNDICE D – Dados individuais da disposição cinética do lopinavir em pacientes portadoras do HIV tratadas com dose múltipla de lopinavir, 400 mg/12 horas

Tabela v: Dados individuais da disposição cinética do lopinavir em pacientes portadoras do HIV (n=7)

Parâmetros	Pacientes						
	1	2	3	4	5	6	7
C_{min} (µg/mL)	7,22	2,89	6,02	5,38	4,18	3,68	1,82
t_{min} (h)	12,00	1,00	12,00	12,00	12,00	12,00	1,00
C_{max} (µg/mL)	20,20	10,41	20,30	15,65	9,36	12,22	14,63
t_{max} (h)	4,00	4,00	4,00	4,00	6,00	2,00	4,00
AUC⁰⁻¹² (µg.h/mL)	151,20	80,25	135,45	102,35	80,31	95,21	88,70
C_{média} (µg/mL)	12,60	6,69	11,29	8,53	6,69	7,93	7,39
MRT^{0-∞} (h)	12,27	10,71	10,85	11,64	10,92	8,18	16,74
t_{1/2} (h)	8,60	5,83	7,21	6,72	5,85	4,53	9,44
Kel (h⁻¹)	0,08	0,12	0,10	0,10	0,12	0,15	0,07
Vd/F (L)	32,83	41,92	30,74	37,91	42,04	27,49	61,40
Cl_T/F (L/h)	2,64	4,98	2,95	3,91	4,98	4,20	4,51
Flutuação (%)	103,03	112,38	126,52	120,32	77,42	107,68	173,29

APÊNDICE E – Dados individuais da disposição cinética do ritonavir em pacientes portadoras do HIV tratadas com dose múltipla de ritonavir, 100 mg/12 horas

Tabela vi: Dados individuais da disposição cinética do ritonavir em pacientes portadoras do HIV (n=7)

Parâmetros	Pacientes						
	1	2	3	4	5	6	7
C_{min} (µg/mL)	0,10	0,10	0,40	0,10	0,07	0,14	0,04
t_{min} (h)	12,00	1,00	8,00	12,00	12,00	12,00	1,00
C_{max} (µg/mL)	0,52	1,28	1,42	0,53	0,48	0,64	1,11
t_{max} (h)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
AUC⁰⁻¹² (µg.h/mL)	3,66	4,87	6,92	3,04	3,16	5,57	4,46
C_{média} (µg/mL)	0,30	0,41	0,65	0,25	0,26	0,46	0,37
MRT^{0-∞} (h)	6,73	6,59	5,10	7,58	6,13	6,22	7,13
t_{1/2} (h)	3,62	3,73	2,29	3,88	2,62	2,71	3,20
Kel (h⁻¹)	0,19	0,18	0,30	0,18	0,26	0,25	0,22
Vd/F (L)	142,73	110,43	420,85	184,35	119,50	70,29	103,53
Cl_T/F (L/h)	27,31	20,51	12,74	32,90	31,62	17,96	22,39
Flutuação (%)	135,46	291,52	155,91	168,99	156,84	108,54	285,68

#N3X05

9. Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMRP - USP

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

Ribeirão Preto, 17 de abril de 2013

Ofício nº 1367/2013
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5165/2013

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“DISPOSIÇÃO CINÉTICA DO LOPINAVIR E RITONAVIR EM PARTURIENTES COM HIV PORTADORAS OU NÃO DE DIABETES MELLITUS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 364ª Reunião Ordinária realizada em 15/04/2013, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimos Senhores

PROF. DR. GERALDO DUARTE

Mestranda: Roberta Natália Cestari (FCFRP-USP)

Orientadora: Profª Drª Vera Lucia Lanchote (FCFRP-USP)

Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do FCFRP - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 23 de setembro de 2013.

Projeto de pesquisa: “Disposição cinética do lopinavir e ritonavir em parturientes com HIV portadoras ou não de *Diabetes mellitus*”.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Geraldo Duarte - FMRP/USP

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

“O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, a FCFRP-USP, como instituição coparticipante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

Prof. Dra. Maria Regina Torqueti
Coordenadora do CEP/FCFRP

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque
Diretor da FCFRP/USP

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - USP*****PESQUISA CIENTÍFICA*****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

NOME DA VOLUNTÁRIA / IDADE: _____ / _____

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO: _____

NOME DA PESQUISA: **“Disposição cinética do lopinavir e ritonavir em parturientes com HIV portadoras ou não de diabetes mellitus”.**

PESQUISADORES:

Aluna: Roberta Natália Cestari– (16) 8176-5447

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote (FCFRP-USP) – Tel.: (16) 3602-4195

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

Convido você a participar do estudo: *Disposição cinética do lopinavir e ritonavir em parturientes com HIV portadoras ou não de diabetes mellitus”.*

O estudo implica em que você se submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

Sabe-se que o diabetes pode produzir alterações no organismo que façam com que os remédios usados para tratar o HIV diminuam o seu efeito. Para isso iremos comparar se os remédios usados para o tratamento do HIV chamados lopinavir e ritonavir produzem efeitos diferentes entre as parturientes que tem HIV e diabetes com as parturientes que só tem HIV. Para responder a estas dúvidas, desejamos saber como o lopinavir e o ritonavir, remédios usados para tratar o HIV durante a gravidez, são eliminados pelo seu corpo. Esta pesquisa será

realizada em 2 etapas, com duração de 12 horas e caso você concorde, a primeira etapa será realizada no último trimestre de gestação e a segunda será realizada no momento do parto e em cada etapa a Sra. receberá uma única dose do remédio Kaletra, que contém lopinavir e ritonavir juntos. Antes de iniciar a pesquisa 3 tubos de sangue de 10 mL cada um (duas colheres de sopa) da veia do seu braço será coletado para verificar se as funções do seu fígado e dos seus rins estão normais. Ao ser internada no terceiro trimestre de gestação, nós iremos coletar amostras de 10mL de sangue várias vezes (cerca de 10 vezes) com seringa da veia do seu braço. Um tubinho de plástico será colocado dentro da sua veia, assim nós iremos picar você uma única vez. Na hora do seu parto nós iremos coletar uma amostra de 10mL de sangue da veia do seu braço e 10mL do líquido amniótico (com agulha de peridural com ponta romba), após o médico certificar-se que no sítio da punção não há nenhuma das partes fetais. Somente depois do nascimento do mesmo e da clampagem do cordão umbilical, iremos coletar uma amostra de sangue da placenta. Os inconvenientes dessa pesquisa são a picada da agulha para colher sangue e a internação durante 12 horas. A pesquisa não interferirá na conduta clínica a ser conduzida no caso da senhora e não ocasionará nenhum risco adicional à senhora e ao seu (sua) filho (a). A sua colaboração vai aumentar o nosso conhecimento de como os remédios usados para o tratamento do HIV são eliminados pelo corpo e poderá ajudar na escolha e no ajuste da dosagem para a senhora e para outras parturientes com problemas de saúde semelhantes ao seu.

Eu, _____, abaixo assinada, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionada com a pesquisa e o tratamento a que serei submetida;
2. A liberdade de aceitar ou não participar da pesquisa, bem como retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu acompanhamento e tratamento no HC-FMRP-USP;
3. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
4. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;
5. Em caso de danos causados pela pesquisa, a senhora tem o direito de procurar as leis vigentes no Brasil.

Declaro que em ____/____/____ concordei voluntariamente em participar como voluntária do projeto de pesquisa acima referido e que fui devidamente informada de todos os detalhes.

Assinatura da voluntária
RG ou CPF:

Mestranda: Roberta Natália Cestari
CPF: 367.073.208-07