

RENATA SOARES NOVELLINO

Quantificação de talidomida em plasma e em dispositivo de plasma seco por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida para monitoramento terapêutico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá

São Paulo
2023

RENATA SOARES NOVELLINO

Quantificação de talidomida em plasma e em dispositivo de plasma seco por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida para monitoramento terapêutico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá

São Paulo
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Novellino, Renata Soares

Quantificação de talidomida em plasma e em dispositivo de plasma seco por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida para monitoramento terapêutico / Renata Soares Novellino -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientadora: Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá.

Descritores: 1.Talidomida 2.Espectrometria de massas 3.Estudo de validação
4.Cromatografia líquida 5.Desenvolvimento experimental 6.Preparação de amostras

USP/FM/DBD-124/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Ao meu filho Angelo Elias, pela vida colorida.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tudo providencia.

Ao amado Elias, marido dedicado que me ofereceu suporte emocional e material para a realização do doutorado, atravessado pela pandemia da COVID-19 e ao Angelo Elias, nosso filho lindo por suportar minhas ausências, alegrando-se nos reencontros.

À grande família Soares Novellino D'Elia, Nona Angiola (96 anos), padrinho Miguel, Nona Maria, Nicola, Fátima, Sandra que fortalecem nossa rede de afeto. À minha mãe Sebastiana fonte de força, fé e coragem. Ao meu pai Antonio pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, Bene, Maria, Dalva, Rosana, Iracema, Diorgenes (*in memoriam*), sobrinhos, sobrinhas e a todos de nossas famílias.

Às amigas Sil, Sandra, Selma, Nanda, que me deram suporte, suprimentos, lealdade amizade, cobrindo minhas ausências e contribuindo para minha jornada.

À Profa Vanessa Rescia, da Universidade Oeste da Bahia (UFOB) que recebeu as amostras da simulação de transporte e cuidou para que elas retornassem a São Paulo.

Ao extraordinário Leonard, pós-doutorando enviado do Senhor para me guiar nos momentos muito difíceis, acolhendo, ajustando as rotas do projeto, buscando caminhos espertos e eficientes para viabilizar nível de excelência deste trabalho.

Aos companheiros do laboratório de toxicologia da Divisão de Laboratórios Central (DLC) Paschoalina, Persio, Nilo, Marc, Valdemir, Julia, Nina, Márcio, sempre prontos a resolver as dificuldades, com incentivos e ações. A todas e todos da DLC, pelo acolhimento, suporte, amizade e essenciais pausas para café. Às colegas do Laboratório de Investigações Médicas por suprir toda necessidade para o projeto continuar.

A todos os professores, assistentes, colegas, residentes, estagiários, pesquisadores iniciantes, funcionários do Departamento de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pacientes e pessoas não nomeados pela participação, colaboração e promoção da pesquisa científica.

Aos professores da reumatologia Dr Clovis, Dra Sandra, Dr Eduardo, Dra Nadia pelo conhecimento compartilhado, promoção e contribuição da pesquisa e publicações.

À minha orientadora Dra Eloisa Bonfá pela oportunidade da realização do sonho de fazer doutorado, trabalhar com LC-MS/MS e pesquisa clínica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e em especial pela minha participação nos importantes projetos de vacina contra COVID-19.

Agradecimento Especial

Este estudo foi patrocinado por bolsas da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#2015/03756-4 para CA Almeida da Silva, S Gofinet Pasoto, NE Aikawa and E Bonfá; #2017/03983-6 para o sistema LC-MS; #2019/17272-0 para LV Kanda Kupa; #2019/21211-6 para J Celestino Seraphim) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (#304984/2020-5 para CA Almeida da Silva; #305242/2019-9 para E Bonfá).

“O presente é tão grande, não nos afastemos

Não nos afastemos muito, vamos de mãos dadas”

Carlos Drummond de Andrade

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| ACN | Acetonitrila |
| AMR | Faixa de quantificação analítica, <i>Analytical measurement range</i> |
| ANOVA | Análise de variância |
| Carryover | Efeito residual |
| CLSI | <i>Clinical Laboratories Standards Institute</i> |
| COVID-19 | Coronavírus 2019 |
| CV | Coefficiente de variação |
| DBS | Dispositivo de amostragem de sangue a seco, <i>Dried Blood Spot</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido, <i>dimethyl sulfoxide</i> |
| DoE | Planejamento de Experimentos, <i>Design of Experiments</i> |
| DP | Desvio padrão |
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| DPS | Dispositivo de amostragem de plasma a seco, <i>Dried Plasma Spot</i> |
| DS | Dispositivo a seco, <i>Dried Spot</i> |
| EPR | Erro Padrão Relativo, <i>bias</i> |
| eV | eletroVolts |
| FDA | <i>US Food and Drug Administration</i> |
| FM | Fase móvel |
| H ₂ O | Água |
| HCFMUSP | Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo |
| HCQ | Hidroxicloroquina |
| HQC | Amostra de controle de qualidade de alta concentração, <i>High Quality Control limit</i> |
| IC _{95%} | Intervalo de confiança 95% |
| <i>Insert</i> | Recipiente de alíquota para volumes pequenos para cromatografia líquida |
| LC | Cromatografia líquida |
| LEC | Lúpus eritematoso cutâneo |
| LES | Lúpus eritematoso sistêmico |
| LIM | Laboratório de Investigações Médicas |
| LLOQ | Limite inferior de quantificação, <i>Low Limit of Quantification</i> |
| LOD | Limite de detecção, <i>Limite of Detection</i> |
| LQC | Amostra de controle de qualidade de baixa concentração, <i>Low Quality Control limit</i> |
| m/z | razão de massa/carga |
| MQC | Amostra de controle de qualidade de concentração média, <i>Median Quality Control limit</i> |
| PRED | Prednisona |
| QC | Amostra de controle de qualidade, <i>Quality Control limit</i> |
| r | Coefficiente de correlação de Pearson (<i>r-value</i>) |
| R ² | Coefficiente de determinação do modelo de regressão |
| RT | temperatura ambiente, <i>room temperature</i> |
| <i>SPE online</i> | Extração em fase sólida em linha |
| SRM | Monitoramento de reação selecionada, <i>Selected reaction monitoring</i> |
| TDM | Monitoramento terapêutico de fármacos, <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> |
| THD | Talidomida, <i>Thalidomide</i> |
| THD-d4 | Talidomida-d4, <i>Thalidomide-d4</i> |
| UPLC-MS/MS | Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massa em tandem, <i>Ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry</i> |
| V | Volts |
| <i>Vial</i> | Recipiente de alíquota para cromatografia líquida |
| WP | plasma úmido, <i>wet plasma</i> |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Desenho esquemático da configuração para o programa de fluxo para o experimento SPE-UHPLC-MS/MS | 12 |
| Figura 2 - Percurso das amostras em DPS durante simulação de transporte logístico.. | 18 |
| Figura 3 - Efeitos padronizados para resposta de porcentagem de recuperação de talidomida em DPS | 24 |
| Figura 4 - Otimização por planejamento de experimentos (DOE) para preparação de amostra de talidomida e talidomida-d4 em DPS | 24 |
| Figura 5 - Perfil cromatográfico de THD quantificada por SPE-UHPLC-MS para amostras preparadas como plasma seco e plasma úmido | 25 |
| Figura 6 - Faixa linear de quantificação para talidomida em DPS e WP | 27 |
| Figura 7 - Gráfico de dispersão dos resíduos padronizados para a faixa linear de quantificação para talidomida em DPS e WP | 27 |
| Figura 8 - Gráfico de intervalos para testes de limites de detecção e quantificação de talidomida em DPS e WP. | 28 |
| Figura 9 - Gráfico de intervalos para testes de efeito matriz, recuperação e eficiência do processo de talidomida em DPS e plasma úmido | 30 |
| Figura 10 - Gráfico de boxplot da estabilidade de talidomida em DPS | 32 |
| Figura 11 - Gráfico de boxplot da estabilidade de talidomida em plasma WP | 32 |
| Figura 12 - Temperaturas registradas das amostras DPS acondicionadas sem gelo (a) e com gelo (b) durante simulação de transporte logístico. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco | 35 |
| Figura 13 - Concentrações plasmáticas de talidomida em amostras de pacientes preparada em DPS antes e depois de simulação de transporte logístico com acondicionamento sem gelo e com gelo | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Dados do planejamento fatorial para otimizar a preparação da amostra DPS | 13 |
| Tabela 2 - Parâmetros de espectrometria de massa e tempos de retenção típicos para talidomida e seu padrão interno marcado com isótopo estável | 21 |
| Tabela 3 - Programa de eluição para limpeza em extração em fase sólida (SPE) <i>online</i> | 22 |
| Tabela 4 - Programa de eluição em gradiente para coluna de separação (analítica) | 22 |
| Tabela 5 - Resultados do planejamento fatorial para otimização do método para amostras DPS..... | 23 |
| Tabela 6 - Respostas do teste de linearidade para DPS e WP | 25 |
| Tabela 7 - Análise estatística do teste de linearidade para DPS e WP | 26 |
| Tabela 8 - Limites de detecção e quantificação para talidomida em DPS e WP..... | 28 |
| Tabela 9 - Exatidão e precisão da talidomida em DPS e WP | 29 |
| Tabela 10 - Efeito Matriz, Recuperação e Eficiência do Processo para talidomida em DPS e WP | 30 |
| Tabela 11 - Estabilidade de talidomida em amostras DPS e WP | 33 |
| Tabela 12 - Níveis plasmáticos de talidomida de pacientes em tratamento preparada em DPS ou WP | 34 |
| Tabela 13 - Concentração plasmática de talidomida em amostras de pacientes preparada em DPS antes e depois da simulação de transporte logístico | 36 |

RESUMO

Novellino RS. Quantificação de talidomida em plasma e em dispositivo de plasma seco por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida para monitoramento terapêutico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: A talidomida (TDH) é um fármaco imunomodulador e anticancerígeno; o monitoramento terapêutico de fármaco (TDM) é crucial para o ajuste de dose. *Dried Plasma Spot* (DPS) é uma estratégia de amostragem emergente, que pode permitir acesso a análise por HPLC-MS/MS mesmo em locais distantes. No presente estudo, foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para quantificação de Talidomida em DPS e o comparamos com amostras de plasma úmido (WP). **MÉTODOS:** Plasma seco em DPS (200 μ L) e 100 μ L de WP foram tratados com acetonitrila e água para extração de THD, e os extratos foram submetidos à extração em fase sólida em linha e analisados em HPLC-MS/MS. O método foi validado para linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, efeito matriz, eficiência de processo, efeito residual e de interferentes e diluição, e estabilidade. O método foi aplicado para quantificação de THD em amostras de plasma de pacientes com lúpus eritematoso cutâneo (LEC) tratados com THD preparadas em DPS e WP e para estudo de transporte de amostras dos pacientes, preparadas em DPS. **RESULTADOS:** A curva de calibração da razão de área do pico *versus* a concentração de THD foi linear na faixa de concentração de 50 a 2000 ng/mL ($r^2 > 0,990$) para DPS e WP. O método tem um limite de detecção (LOD) de 20 ng/mL e um limite inferior de quantificação (LLOQ) de 50 ng/mL para THD em DPS e WP. A exatidão e precisão resultaram em erro padrão relativo na faixa de 1,3% a 8,9%, com coeficiente de variação (CV%) máximo de 18,6% (no LLOQ) e 8,6% em concentrações superiores, para DPS e WP. Considerando as concentrações baixa e alta para DPS e WP, efeito matriz foi na faixa de 100,6% a 107,0%; recuperação foi de 88,7% a 105,0%, e eficiência de processo foi entre 91,3% e 109,3%. Nenhum efeito residual, de interferentes ou de diluição foi observado. As soluções estoque do padrão de THD foram estáveis a -20°C por 30 dias e a -80°C por 4 meses para DPS e WP. Além disso, as amostras de DPS foram estáveis por 14 dias em temperatura ambiente e a 45°C . A quantificação de THD em amostra de plasma de oito pacientes com LEC apresentaram resultados de mediana 257,1 ng/mL (DPS) e 269,3 ng/mL (WP). O transporte entre locais distantes (até 9 dias e 41°C) de amostras dos pacientes resultou em decaimento de concentração não maior que 14% para DPS.

CONCLUSÕES: O método validado para quantificar THD em DPS por UPLC-MS/MS é adequado para a determinação na faixa analítica do fármaco para o monitoramento terapêutico, usando amostras secas. O método validado é aplicável para TDM de THD e oferece a possibilidade de obtenção de amostras de locais remotas transportadas em temperatura ambiente preservando a estabilidade da THD para análise em LC-MS/MS. Estudos adicionais prospectivos usando estas metodologias serão necessários para avaliar a aplicabilidade de monitoramento de THD em populações expressivas que utilizem este medicamento.

Palavras-chaves: Talidomida. Espectrometria de massas. Estudo de validação. Cromatografia líquida. Desenvolvimento experimental. Preparação de amostras.

ABSTRACT

Novellino RS. Quantification of thalidomide in plasma and dried plasma device by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry combined with solid phase extraction for therapeutic monitoring [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

INTRODUCTION: Thalidomide (THD) is an immunomodulatory and anticancer drug; therapeutic drug monitoring (TDM) is crucial for dose adjustment. Dried Plasma Spot (DPS) is an emerging sampling strategy, which can allow access to HPLC-MS/MS analysis even in distant locations. In the present study, we developed and validated a SPE-ultra-HPLC-MS/MS method for quantification of THD in DPS and compared it with wet plasma (WP) samples. **METHOD:** Plasma dried in DPS devices (200 μ L) and 100 μ L of WP were treated with acetonitrile and water for THD extraction, and the extracts were subjected to online solid phase extraction and analyzed on UHPLC-MS/MS. The method was validated for linearity, the limit of detection and quantification, accuracy, precision, matrix effect, process efficiency, carryover, interference study, dilution integrity, and stability. The method was applied to quantify THD in plasma samples from patients with cutaneous lupus erythematosus (CLE) treated with THD, prepared in DPS and WP, and to study the transport of patient samples prepared in DPS. **RESULTS:** The peak area ratio calibration curve versus THD concentration was linear over the concentration range of 50 to 2000 ng/mL ($r^2 > 0.990$) for DPS and WP. The method has a limit of detection of 20 ng/mL and a lower limit of quantitation (LLOQ) of 50 ng/mL for THD in DPS and WP. Accuracy and precision resulted in a relative standard error of 1.3% to 8.9%, with a maximum coefficient of variation (CV%) of 18.6% (at LLOQ) and 8.6% at higher concentrations, for DPS and WP. Considering the low and high concentrations for DPS and WP, the matrix effect was 100.6% to 107.0%; recovery ranged from 88.7% to 105.0%, and process efficiency ranged from 91.3% to 109.3%. No carryover, interfering, or dilution effects were observed. THD standard stock solutions were stable at -20°C for 30 days and at -80°C for four months for DPS and WP. Furthermore, DPS samples were stable for 14 days at room temperature and 45°C . The quantification of THD in plasma samples from eight patients with LEC showed median results of 257.1 ng/mL (DPS) and 269.3 ng/mL (WP). Transport between long distances (up to 9 days and 41°C) of patient samples resulted in a concentration decrease not more than 14% for DPS.

CONCLUSIONS: The validated method to quantify THD in DPS by UHPLC-MS/MS is suitable for determination in the analytical range of the drug for therapeutic monitoring using dried samples. The validated method is applicable for THD TDM and offers the possibility of obtaining samples from remote locations transported at room temperature, preserving the stability of THD for analysis in LC-MS/MS. Additional prospective studies using these methodologies will be needed to assess the applicability of THD monitoring in significant populations treated with this drug.

Keywords: Thalidomide. Mass spectrometry. Validation studies. Chromatography liquid. Experimental development. Sample preparation.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

Sumário

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Introdução | 1 |
| 2 | Objetivos | 6 |
| 3 | Métodos | 8 |
| 3.1 | Desenho do estudo | 9 |
| 3.2 | Produtos químicos e reagentes | 9 |
| 3.3 | Reagentes, padrões e preparação de controle de qualidade..... | 9 |
| 3.4 | Preparação da amostra..... | 10 |
| 3.5 | Instrumentação LC-MS/MS..... | 11 |
| 3.6 | Desenvolvimento do método | 11 |
| 3.7 | Validação do método..... | 14 |
| 4 | Resultados | 20 |
| 4.1 | Desenvolvimento do método | 21 |
| 4.2 | Validação do método..... | 25 |
| 5 | Discussão | 37 |
| 6 | Conclusões | 43 |
| 7 | Anexos | 45 |
| 8 | Referencias..... | 54 |

1 INTRODUÇÃO

Talidomida: Uso, eficácia e segurança

A talidomida (THD) é um fármaco imunomodulador (Bartlett et al., 2004) usada principalmente em casos de lesões cutâneas não responsivas de lúpus eritematoso cutâneo (LEC) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Chasset et al., 2018; Fanouriakis et al., 2019; Yuki et al., 2021), e em alguns tipos de neoplasias hematológicas (Gordon; Goggin, 2003; Ribatti; Vacca, 2005). O fármaco é altamente eficaz no controle de lesões cutâneas causadas por LEC e LES (Samsoen et al., 1980; Stevens et al., 1997; Yuki et al., 2021a), e mostrou 30-70% de eficácia na neoplasia de mieloma múltiplo (Singhal et al., 1999). Os benefícios clínicos reportados com o uso da talidomida, devem ser balanceados com os efeitos adversos potenciais relatados para este fármaco. Além da alta teratogenicidade relatada desde os anos 1950 (Bartlett et al., 2004; Ito et al., 2012), o uso de talidomida está associado com outros efeitos adversos significantes, incluindo os cutâneos e, principalmente, a neuropatia periférica (reportada em 15-80% dos pacientes tratados), que pode ser moderada ou grave (Cuadrado et al., 2005; Frankel et al., 2013; Yuki, et al., 2021a), e apenas em alguns casos, pode ser parcialmente reversível com a interrupção do tratamento (Kathleen, 2006; Cortes-Hernandez, 2011, Chasset et al., 2018). A neuropatia periférica é uma condição debilitante caracterizada por sintomas neurocutâneos (dor, coceira, formigamento dormência, hiperalgesia, sensação de queimação) nos membros afetados (Naha, 2021, Zhou, 2023). Esta condição está associada com diminuição da qualidade de vida relacionada à saúde dos pacientes e representa o principal motivo de descontinuação da talidomida em pacientes tratados (Naha, 2021, Zhou, 2023, Yang et al., 2015). Foi também reportado que a neuropatia periférica induzida pelo uso da talidomida está correlacionada com a dose diária, dose cumulativa (Bastuji-Garin et al., 2002, Chasset et al., 2018), e o tempo de utilização do fármaco (Yuki et al., 2021a).

Monitoramento terapêutico da talidomida

O monitoramento terapêutico de fármacos (*Therapeutic Drug Monitoring* - TDM) da talidomida, pela quantificação da concentração sérica ou plasmática de THD, é muito útil neste contexto, como método direto para detectar pior aderência entre os pacientes, o que está fortemente relacionado com a não eficácia do tratamento (Yuki et al., 2021b). De fato, a baixa aderência ocorre em aproximadamente 60% dos pacientes tratados com talidomida para mieloma múltiplo, levando a uma alta taxa de hospitalização

(Silveira *et al.*, 2022). Além disso, essa baixa aderência ao medicamento ainda pode ser subestimada, uma vez que métodos indiretos são frequentemente aplicados para avaliação da aderência, e podem não detectar com precisão os pacientes não aderentes (Silveira *et al.*, 2022; Yuki *et al.*, 2021b). Este fato foi recentemente demonstrado num trabalho publicado pelo nosso grupo, onde o único paciente sem resposta terapêutica à talidomida apresentou nível plasmático de talidomida não detectado, mostrando má aderência terapêutica (Yuki *et al.*, 2021b). Entretanto, o mesmo paciente havia sido considerado aderente à terapia por meio de instrumento específico validado (questionário) (Yuki *et al.*, 2021b). O monitoramento terapêutico de talidomida também foi proposto para otimizar os benefícios terapêuticos e prevenir a polineuropatia. Porém, estes aspectos ainda são controversos, e há apenas poucos estudos com amostragens pequenas (Kakimoto *et al.*, 2002; Kodama *et al.*, 2009; Yuki *et al.*, 2021b).

Quantificação de fármacos por cromatografia líquida

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) é uma ferramenta padrão ouro no monitoramento terapêutico de fármacos, com um grau muito elevado de seletividade e sensibilidade. Por esta razão, apesar do alto custo e pessoal especializado necessário para seu uso, a LC-MS/MS é hoje a técnica mais almejada para a quantificação de pequenas moléculas e metabólitos em fluidos biológicos (Eliasson *et al.*, 2013). A técnica permite a quantificação de concentrações muito pequenas dos fármacos em diversas matrizes, inclusive matrizes não convencionais. A cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) agrega ainda mais benefícios à técnica convencional de HPLC, pois permite o uso reduzido de solventes orgânicos, uma análise mais rápida com maior rendimento da amostra, mais sensibilidade e melhor resolução de pico (López-Ruiz *et al.*, 2019).

Embora a LC-MS/MS seja o padrão ouro para quantificação de fármacos, o alto custo associado e a necessidade de pessoal especializado para sua utilização (Shipkova, 2016; Seger, 2020) limita sua disponibilidade aos grandes centros, mais frequentemente localizados nas principais cidades. Nesse contexto, o acesso a dosagens de fármacos em hospitais remotos sem instrumento LC-MS/MS só pode ser alcançado pelo envio de amostras biológicas obedecendo a uma rigorosa cadeia fria de transporte para garantir a integridade das amostras e a precisão dos resultados (Ball, 2010; Dinur *et al.*, 2022).

Adicionalmente, a necessidade crescente da utilização de abordagens alternativas

para obtenção de amostras clínicas de menor volume, com menor risco, maior aproveitamento e de forma menos invasivas, vem sendo discutido na literatura para aplicação no monitoramento terapêutico e para ampliação de acesso ao TDM, um recurso importante no cuidado aos pacientes (Jacques et al., 2022; Trifonova et al., 2019).

Abordagens alternativas de obtenção de amostras clínicas para TDM

Novas estratégias alternativas de amostragem têm sido introduzidas cada vez mais no campo do monitoramento terapêutico de medicamentos para várias classes de medicamentos e têm sido relatadas como uma solução para superar as limitações da amostragem convencional, trazendo vários benefícios (Jacques et al., 2022; Trifonova et al., 2019). Um desses dispositivos de microamostragem, o dispositivo de amostragem de plasma seco (DPS), consiste em um volume de plasma seco em um papel filtro disponível comercialmente em formato de cartão. Seu uso para análise qualitativa de metabólitos remonta de muitos anos passados, para a triagem de doenças genéticas em neonatos (Demirev, 2012; Delahaye et al., 2021).

Os benefícios dessa abordagem para monitoramento terapêutico incluem amostragem minimamente invasiva, pequeno volume de coleta, amostras estáveis e transportáveis em temperatura ambiente, benefícios ambientais (Li; Tse, 2010; Trifonova et al., 2019; Wilhelm et al., 2014) e tudo resultando em um fluxo de trabalho mais simples para a amostragem em monitoramento terapêutico de fármaco (Qu et al., 2017). O contexto da pandemia da doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) aumentou ainda mais a aplicabilidade dessa abordagem, pois as pessoas enfrentaram a crescente necessidade de coleta de amostras domiciliares (Anderson, 2021). Amostras de dispositivo a seco (DS) podem ser realizadas para vários fluidos biológicos, incluindo sangue total, plasma, soro, saliva ou urina, com resultados confiáveis de quantificação dos analitos. Além disso, o DS preparado pode ser facilmente enviado de um local remoto para chegar a centros mais especializados, onde laboratórios mais equipados estão disponíveis para a quantificação do fármaco, enquanto a integridade da amostra ainda é preservada e os custos de transporte são reduzidos em comparação com matrizes convencionais. Vários métodos de LC-MS/MS realizados com DS para TDM já foram reportados na literatura para diferentes fármacos, incluindo imunomoduladores, imunossupressores e anticancerígenos (Filali-Ansary et al., 2016; Iacuzzi et al., 2021; Qu et al., 2017). No entanto, até onde sabemos, não há dados reportados para a quantificação

de talidomida usando esses dispositivos.

Validação de métodos bioanalíticos

Para garantir a credibilidade e a qualidade dos resultados obtidos nas análises com esses novos dispositivos, é de extrema importância que o método de quantificação tenha passado por uma validação adequada, seguindo recomendações internacionalmente aceitas, incluindo validação analítica e clínica. Aspectos específicos, com parâmetros adicionais que não fazem parte do processo clássico de validação de amostras convencionais (sangue, plasma, soro), podem ser necessários, como é o caso do condicionamento de amostras em temperaturas específicas, simulando o transporte. Poucos métodos de LC-MS/MS validados foram reportados para a quantificação de talidomida em fluidos biológicos (Bai et al., 2013; Li et al., 2021; Roche et al., 2012; Shu et al., 2016; Teo et al., 2002) e apenas três métodos reportaram a quantificação de talidomida no plasma por LC-MS/MS, principalmente usando extração líquido-líquido, que pode apresentar algumas limitações, incluindo baixa recuperação e necessidade de maiores volume de solventes e maior quantidade de amostras (Kole et al., 2011). Além disso, nenhum dos métodos reportados empregou a técnica de UHPLC, nem uma abordagem alternativa de obtenção de amostra.

Assim sendo, considerando a utilidade do monitoramento dos níveis de talidomida para a avaliação da aderência dos pacientes em tratamento, para fins de otimização da terapia, e considerando o envio mais fácil de amostras de locais remotos e maior acesso a TDM para centros desprovidos de instrumentos analíticos para LC-MS/MS, desenvolvemos e validamos um método UHPLC-MS/MS com extração em fase sólida em linha (*SPE online*) para quantificar a talidomida em dispositivo de amostragem de plasma seco (DPS) em comparação com o plasma úmido (WP).

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida em linha para quantificar talidomida em dispositivo de amostragem de plasma a seco (DPS) em comparação com plasma úmido (WP).
2. Aplicar a metodologia bioanalítica validada para quantificar talidomida em amostras de plasma de pacientes diagnosticados com LEC em tratamento com talidomida e comparar as concentrações obtidas com DPS e WP.
3. Estudar o impacto do transporte de longas distâncias na estabilidade das amostras de pacientes em tratamento com talidomida, preparadas em DPS.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Este foi um estudo de desenvolvimento e validação de método bioanalítico desenhado para fornecer informações sobre a aplicação de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas combinado com extração em fase sólida em linha (SPE-UHPLC-MS/MS) para a quantificação de talidomida em DPS e WP. O método foi desenvolvido e validado em um instrumento UHPLC-MS/MS triplo quadrupolo.

3.2 Produtos químicos e reagentes

Os padrões para THD e o padrão interno THD-d4 marcado com isótopo estável correspondente foram obtidos de *Toronto Research Chemicals* (North York, Canadá). Reagentes grau LC/MS metanol, acetonitrila e ácido fórmico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água reagente especial (SRW) foi produzida em equipamento Milli-Q® Gradiente Merck (Darmstadt, Alemanha). O dispositivo de amostragem de plasma a seco (Dried Plasma Spot, DPS), produto QIAcard FTA™ micro foi adquirido da QIAGEN (Hilden, Alemanha). As amostras humanas livres do fármaco utilizadas neste estudo foram provenientes de voluntários saudáveis que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética local de nosso hospital universitário e terciário (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil (parecer número 1.922.444). O trabalho realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, incluíram participações do ambulatório da Disciplina de Reumatologia, Laboratório de Investigações Médicas (LIM) e Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP.

3.3 Reagentes, padrões e preparação de controle de qualidade

Sangue humano livre do fármaco foi obtido de doadores saudáveis para preparar calibradores e controle de qualidade. O sangue total foi coletado em tubos de heparina adquiridos da Greiner Bio-One (Kremsmünster, Áustria). Amostras de plasma heparinizado foram acidificadas com ácido cítrico 0,2 M pH 1,5 (v/v), para prevenir a hidrólise espontânea da talidomida. Soluções estoque de 2 mg/mL e 1 mg/mL para THD e seu padrão interno foram preparadas em DMSO e armazenadas a -20°C. Solução de trabalho de 20 µg/mL para THD e seu padrão interno foram preparadas na fase móvel,

uma mistura de 73% de Solvente A (0,1% de ácido fórmico em água) e 27% de Solvente B (0,1% de ácido fórmico em 70% de metanol e 30% de acetonitrila). As curvas de calibração foram preparadas diluindo a solução padrão de trabalho para obter soluções padrão em 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 15000 e 20000 ng/mL. Uma outra solução padrão de trabalho foi diluído obter soluções padrão em 1500, 11000 e 16000 ng/mL, utilizadas como soluções de controle de qualidade (QCs). Em seguida, 40 µL de cada solução foram adicionados a 360 µL de amostras de plasma acidificado-heparinizado livre do fármaco para atingir padrões de calibração em 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL e amostras de controle de qualidade de concentrações de 150, 1100 e 1600 ng/mL. As curvas de calibração foram preparadas a cada dia de cada corrida analítica.

3.4 Preparação da amostra

Para a preparação das amostras de DPS, 200 µL de plasma livre do fármaco, padrão, controle de qualidade ou plasma de paciente em tratamento com talidomida foram adicionados a um cartão DPS, em duas etapas de 100 µL cada, e mantidos para secar em temperatura ambiente por não menos que 15 minutos (após a primeira etapa) e não menos que duas horas (após a segunda etapa). Após a secagem, a área total de aplicação de 25 mm foi cortada manualmente, com o auxílio de um perfurador circular de 25 mm, e transferida para um tubo de ensaio de 5 mL, e foi adicionada uma mistura de 40 µL de padrão interno (1750 ng/mL), 325 µL de água e 435 µL de acetonitrila. O tubo foi agitado em vórtex por 60 segundos e o extrato foi vertido para um tubo de ensaio de 2 mL. Para WP, 100 µL de plasma livre do fármaco, padrão, controle de qualidade ou plasma de paciente em tratamento com talidomida foram misturados com 20 µL de padrão interno (1750ng/mL), 80 µL de solução extratora de sulfato de zinco 0,1 M preparada em uma mistura de água e metanol (80/20) e 200 µL de acetonitrila. Esta mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos. Após agitação em vórtex, os extratos DPS e WP foram centrifugados por 8 minutos a 15.000 rpm. Em seguida, 105 µL de sobrenadante foram combinados com 140 µL de água ultrapura em um *insert* de vidro para cada extrato. As amostras preparadas foram mantidas a +10°C no carrinho do amostrador automático até o momento da aquisição no sistema LC-MS/MS.

3.5 Instrumentação LC-MS/MS

A análise cromatográfica bidimensional foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência Dionex UltiMate 3000 equipado com bombas DGP-3600, amostrador automático WPS-3000TRS e forno TCC-3000RS com duas válvulas de comutação TitanHT de 2 posições e 6 portas (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

3.6 Desenvolvimento do método

3.6.1 Detecção em espectrométrica de massa

Foram injetadas soluções de trabalho da mistura (1 µg/mL THD e 1 µg/mL THD-d4) diretamente no detector de massas para identificação das massas correspondente às transições m/z 259,1 para TDH e 263,1 para THD-d4 e seus respectivos espectros de fragmentação.

3.6.2 Extração em fase sólida *online* e separação cromatográfica

Após a identificação dos fragmentos de maior abundância e estabilidade foram testadas diferentes fases estacionárias (colunas cromatográficas e temperatura), composição de fase móvel, fluxo de fase móvel e modo de eluição.

Após a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massa TSQ Altis™ Triplo Quadrupolo (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), com ionização por eletrospray em modo positivo, e otimização dos parâmetros da cromatografia líquida, o método instrumental foi construído e salvo no Software de análise software Trace Finder (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) para a validação do método. Os tempos de comutação da válvula para o experimento SPE-UHPLC-MS/MS são apresentados na Figura 1.

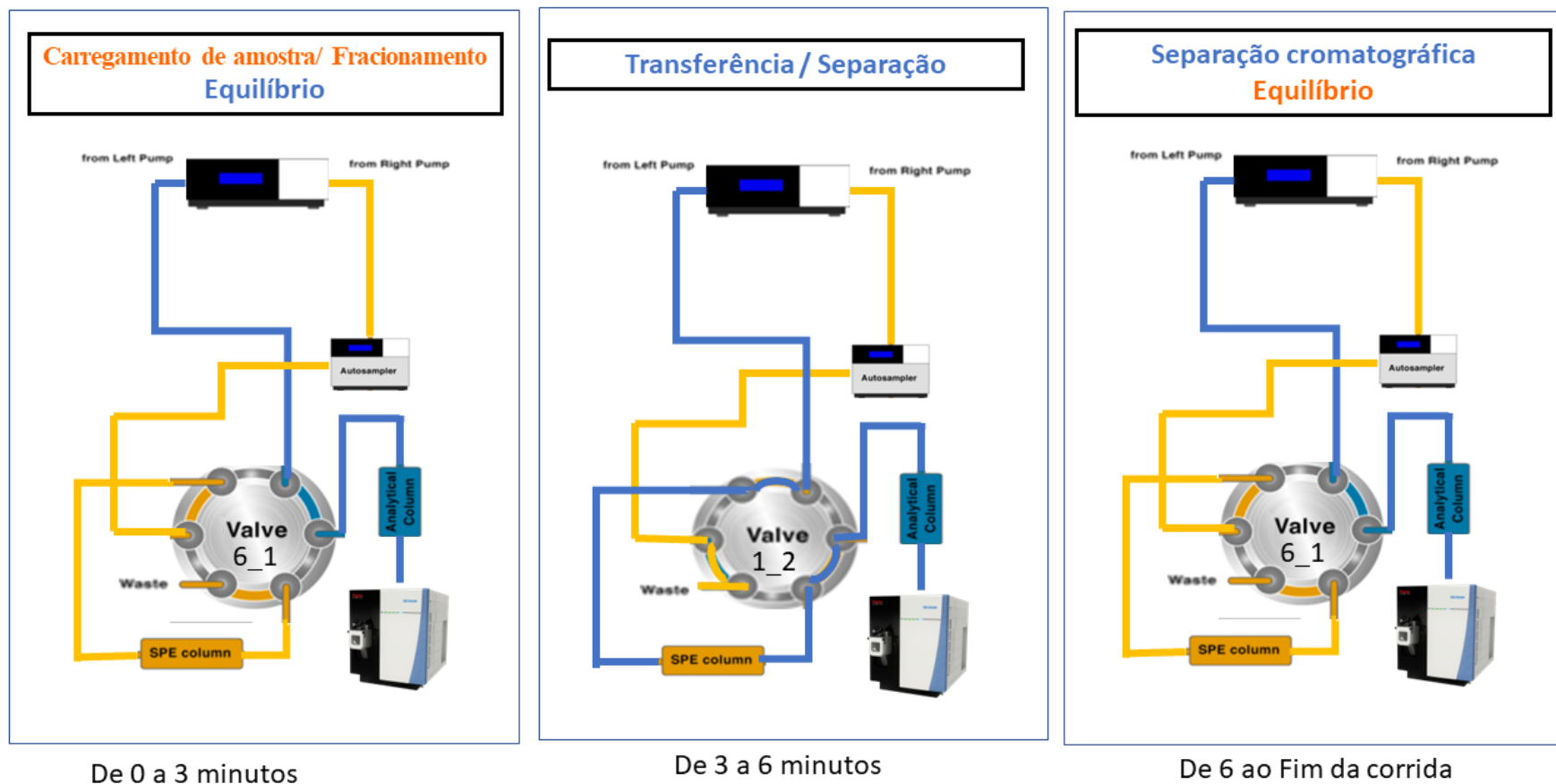


Figura 1 - Desenho esquemático da configuração para o programa de fluxo para o experimento SPE-UHPLC-MS/MS

3.6.3 Otimização de método para amostras DPS

O método foi inicialmente desenvolvido e validado para o WP e, em seguida, o planejamento de experimentos (DOE – *Design of Experiments*) para um planejamento fatorial completo foi realizado para ajustar e otimizar a preparação da amostra DPS.

Para construir as tabelas de planejamento fatorial são atribuídos níveis “-” e “+”, na chamada ordem padrão, quando todas as colunas da tabela, correspondente ao fator começam com o nível “-” e depois os sinais vão se alternando, de acordo com a disposição da coluna: 1ª (um-a-um); 2ª (dois-a-dois); 3ª (três-a-três), etc. Um planejamento completo com k fatores em dois níveis, resulta em 2^k ensaios e a última coluna teria 2^{k-1} sinais negativos e depois 2^{k-1} sinais positivos (Soares et al., 2009).

O efeito de cada fator X é calculado usando a equação:

$$E_x = \frac{\sum Y(+1)}{n_i} - \frac{\sum Y(-1)}{n_i} \quad (\text{equação 1})$$

Onde $\sum Y(+1)$ e $\sum Y(-1)$ são as somas das respostas quanto o fator X está no nível +1 e -1, respectivamente, e n_i o número de ensaios realizados no correspondente nível do fator. A significância dos efeitos pode ser determinada estatística e/ou graficamente.

Na etapa de otimização de método para amostras DPS foram combinados três fatores em dois níveis, em ordem padrão, totalizando oito ensaios, realizados em duas replicatas (Tabela 1). Os ensaios foram realizados em ordem aleatória, definida através de sorteio, usando os parâmetros do instrumento descritos na seção 3.5.

Tabela 1 - Dados do planejamento fatorial para otimizar a preparação da amostra DPS

| Ensaio | Fator | | |
|--------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| | extrator A | tempo vórtex B | centrifugação C |
| 1 | - | - | - |
| 2 | + | - | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | - | - | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | - | + | + |
| 8 | + | + | + |

NOTA:

| | Fator | Nível (-) | Nível (+) |
|---|---|----------------------|-----------|
| A | extrator (mistura de água e acetonitrila na presença de zinco ou a fase móvel) | H ₂ O/ACN | FM |
| B | tempo vórtex (agitação em vórtex por 30 ou 60 segundos) | 30s | 60s |
| C | centrifugação (remoção do cartão DPS antes ou depois da centrifugação) | com papel | sem papel |

3.7 Validação do método

A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes internacionais publicadas para validação de métodos bioanalíticos, incluindo os regulamentos de *Food and Drug Administration* (FDA, 2018) dos Estados Unidos, diretrizes do *Clinical Laboratories Standards Institute* (CLSI) (Carey et al., 2006; CLSI, 2003; Donald H. Chace et al., 2007), e literatura relevante (Matuszewski et al., 2003). A validação incluiu linearidade, limite de detecção (LOD), limite inferior de quantificação (LLOQ), exatidão e precisão intracorrida e intercorridas, efeito de matriz, recuperação, eficiência do processo, efeito residual, seletividade, incluindo interferência de fármacos, integridade da diluição e estabilidade de soluções padrão e amostras.

3.7.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade, os padrões descritos na seção 3.3 foram preparados em duplicata e injetados em triplicata. As soluções de calibração foram feitas por diluições independentes da mesma solução estoque. As curvas de calibração para matrizes biológicas foram geradas traçando a razão de área de pico THD/THD-4 (eixo Y) versus concentrações nominais correspondentes (eixo X) usando um modelo de regressão linear. Para avaliar a linearidade da curva, aplicou-se a inspeção visual, o critério de distribuição aleatória dos resíduos e um coeficiente de determinação aceitável ($R^2 \geq 0,98$). Testes estatísticos de falta de ajuste do método, significância da inclinação e do intercepto também foram aplicados.

3.7.2 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) foi definido como a menor concentração acima de zero que pode ser detectada em uma altura de pico com relação sinal/ruído de linha de base igual ou superior a 3:1 em não menos que seis replicatas. Para estabelecer o limite inferior de quantificação (LLOQ), foram feitas quatro diluições (1/10; 1/20; 1/40 e 1/100) de THD a partir de uma solução padrão (em matriz) de 2000ng/mL, obtendo soluções de concentrações de 20, 50, 100 e 200 ng/mL. O LLOQ foi assumido como a concentração mais baixa na qual o coeficiente de variação (CV%) e o erro padrão relativo seriam não maiores que 20%.

3.7.3 Exatidão e Precisão

Para avaliar a exatidão e precisão intracorrida, cinco níveis de concentração de LLOQ, QC baixo (LQC), QC médio (MQC) e QC alto (HQC) em DPS e WP, foram preparados adicionando soluções padrão de trabalho THD em plasma livre do fármaco. Após a devida extração, as amostras foram adquiridas no mesmo dia e o CV% e o Erro Padrão Relativo (ERP) foram calculados. A repetibilidade, ou seja, a concordância entre os resultados em um curto período com o mesmo analista e a mesma instrumentação, foi considerada aceitável para CV% não maior que 20% para o LLOQ e não maior que 15% para os QCs. A exatidão expressa pelo ERP, que é a diferença da concentração média experimental e da concentração nominal de talidomida, em porcentagem, foi considerada aceitável para ERP na faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal para o LLOQ e de $\pm 15\%$ para as concentrações de QCs.

Para avaliar exatidão e precisão intercorridas, as amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente, com repetição em três corridas diferentes. A concentração de talidomida foi medida para cada nível de concentração durante os três dias. A precisão intercorrida foi considerada adequada se CV% não maior que 20% para o LLOQ e não maior que 15% para os QCs. A exatidão foi considerada aceitável para ERP na faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal para o LLOQ e de $\pm 15\%$ para as concentrações de QCs.

A exatidão (ERP) e precisão (CV%) intracorrida e intercorrida foram calculadas com base em todos os valores experimentais obtidos.

3.7.4 Efeito Matriz, Recuperação e Eficiência do Processo

Efeito matriz (ME), recuperação (RE) e eficiência do processo de extração (PE) foram realizados de acordo com Matuszewski (2003). Três conjuntos de ensaios foram realizados usando amostras de DPS e WP a 150 ng/mL e 1600 ng/mL. No primeiro conjunto (A), a adição do padrão foi feita na fase móvel para avaliar a resposta MS/MS para padrões puros. No segundo conjunto (B), a adição do padrão foi realizada no plasma de cinco voluntários diferentes, com a extração dos plasmas antes da adição do padrão, ou seja, a adição do padrão ocorreu depois da extração. No terceiro conjunto (C), a adição do padrão foi feita no plasma de cinco voluntários diferentes, mas a adição ocorreu antes da extração. A concentração de THD em cada amostra foi obtida em cada conjunto para DPS e WP usando as respectivas curvas de calibração. O efeito matriz (ME) foi calculado comparando a concentração de THD observada no conjunto B com as observadas no

conjunto A, de acordo com a equação 2, descrita abaixo. A recuperação (ER) foi determinada comparando a concentração observada obtida no conjunto C com as do conjunto B, de acordo com a equação 3, descrita abaixo. A eficiência do processo de extração (PE) foi determinada comparando a concentração observada obtida no conjunto C com as do conjunto A, de acordo com a equação 4, descrita abaixo.

Os valores de ME, RE e PE foram considerados aceitáveis se entre 85-115% e foram calculados com as equações:

$$ME (\%) = B/A \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

$$RE (\%) = C/B \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

$$PE (\%) = C/A \times 100 = (ME \times RE)/100 \quad (\text{equação 4})$$

3.7.5 Efeito residual (*Carryover*)

Amostras de controle de qualidade (QCs) de concentrações alta (1600 ng/mL) e baixa (150 ng/mL) foram preparadas em DPS e WP e foram adquiridas na seguinte ordem: baixo (n = 3), alto (n = 2), baixo (n = 1), alto (n = 2), baixo (n = 4), alto (n = 2), baixo (n = 1), alto (n = 2), baixo (n = 1), alto (n = 2), baixo (n = 1).

A diferença entre a média da concentração no QC baixo depois de QC baixo e a média da concentração de QC baixo depois de QC alto foi calculada. Então, o erro limite foi calculado multiplicando três vezes o desvio padrão obtido para amostras QC baixo adquiridas depois de amostras QCs baixo. O método foi considerado livre de efeito residual (*carryover*) se a diferença das medias for menor que o erro limite.

3.7.6 Estudo de interferentes

Hidroxicloroquina (HCQ) e prednisona (PRED), que são fármacos comumente utilizados por pacientes com LEC e LES, foram avaliadas como possíveis analitos de interferência no sinal de THD no detector de massas. Amostras de plasma com 1600 ng/mL de THD foram “contaminadas” com HCQ (concentração final de HCQ: 1000 ng/mL) e PRED (concentração final de PRED: 100 ng/mL). A interferência de fármacos foi considerada significativa se a concentração de THD em amostras com HCQ e PRED em comparação com a concentração de THD em amostras sem adição mostrou uma diferença > 20%.

3.7.7 Integridade da diluição

Para a integridade da diluição, o plasma em branco foi preparado com solução padrão para produzir amostras de CQ fora do intervalo da curva de calibração (3200 ng/mL). A amostra CQ preparada foi então diluída com plasma em branco pela metade e foi analisado em triplicata para WP e DPS. A concentração medida deveria estar entre 85-115% da concentração nominal (1600 ng/mL).

3.7.8 Estabilidade

A estabilidade da solução estoque padrão (20.000 ng/mL) de THD e THD-d4 a -20°C foi avaliada para DPS e WP em três repetições para as concentrações de 150, 1100 e 1600 ng/mL. A estabilidade da amostra a curto (até 14 dias) e a longo prazo (até 4 meses) foi avaliada à temperatura ambiente, 2-8°C, -80°C para DPS e WP a 150 ng/mL e 1600 ng/mL. Além disso, a estabilidade de condições extremas (45°C) foi avaliada para DPS e a estabilidade de congelamento-descongelamento foi avaliada por até três ciclos para WP. Os ensaios foram realizados em triplicata para DPS e WP a 150 e 1600 ng/mL. A estabilidade da amostra foi considerada aceitável se a média da concentração de condição comparada à concentração inicial, expressa em porcentagem de recuperação atendeu a faixa de 85 a 115%.

Após a validação, o método validado foi aplicado para análise de amostras de pacientes em DPS e em comparação com WP e em estudo exploratório de transporte logístico de amostras de plasma de pacientes em DPS.

3.7.9 Análise de amostras de pacientes

Amostras de plasma de oito pacientes diagnosticados com LEC em tratamento com talidomida foram obtidas do repositório de amostras da Disciplina de Reumatologia do HCFMUSP. Os pacientes assinaram previamente o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética local (nº 1.922.444). As amostras foram analisadas como DPS e WP de acordo com o método validado. A concentração medida de DPS e WP foi comparada.

3.7.10 Estudo de transporte de amostras de plasma de pacientes em DPS

Foram realizados testes exploratórios usando amostras de plasma disponíveis de cinco dos oito pacientes, obtidas conforme item 3.7.9, para avaliar a estabilidade de

amostra reais em DPS submetidas à simulação de transporte logístico em condições de temperatura e umidade não controladas, em região tropical do Brasil (Figura 2).

Duas replicatas de aliquotas de 200 μ L de plasma das cinco amostras de pacientes foram transferidas para DPS e submetidas a etapa de secagem. A primeira replicata de cada amostra foi acondicionada em envelope comum e colocada dentro de caixa contendo um aparelho de medição de temperatura (dispositivo TagTemp Stick, NS 19159726 e Software NXperience versão 2.1.8.04) para o monitoramento durante o transporte. A segunda replicata de cada amostra foi acondicionada em envelope comum e colocada dentro de caixa de isopor contendo frascos de gelo em gel e aparelho de medição de temperatura (dispositivo RC-5 Data Logger e Software ElitechLog versão V6.1.0). As caixas de cada grupo foram despachadas de modo independente em Agências dos Correios via Sedex da cidade de São Paulo para a cidade de Barreiras no Oeste da Bahia, onde a Profa. Dra. Vanessa Cristina Rescia, docente do Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) recebeu o material e fez acondicionamento intermitente em condição ambiente (recipiente sem gelo) ou em refrigerador (recipiente com gelo) e despachou de volta para São Paulo, via Sedex. A Figura 2 ilustra o percurso das amostras. Depois do transporte de volta para o laboratório em São Paulo, as amostras foram analisadas de acordo com o método validado para DPS e a concentração de talidomida foi comparada com os resultados das amostras pareadas, obtidos antes do transporte.

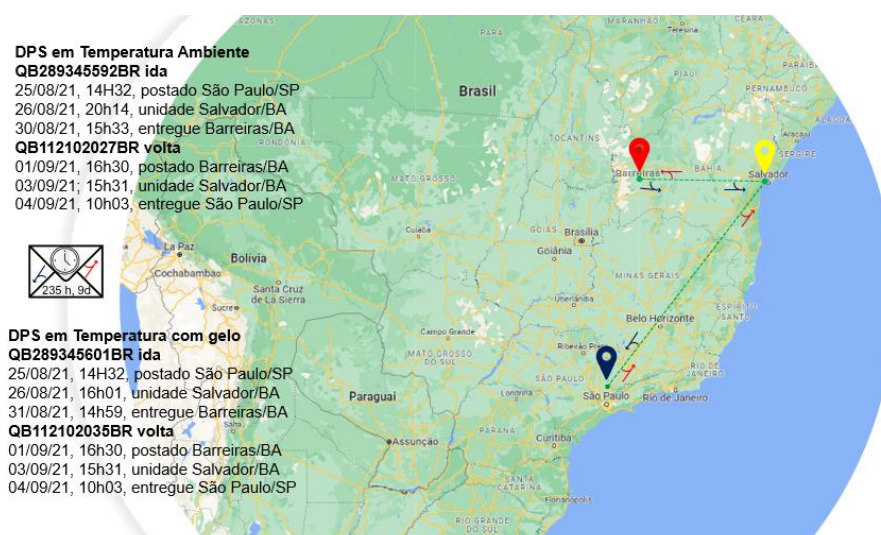


Figura 2 - Percurso das amostras em DPS durante simulação de transporte logístico

NOTA: DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco

📍 São Paulo/SP; 📍 Salvador/BA; 📍 Barreiras/BA; → ida; ← volta

3.7.11 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados empregando o Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO Versão 2202 (Redmond, EUA) e o software Minitab®, versão 20.1.3 (State College, EUA) para a análise estatística incluindo modelo de regressão com teste de falta de ajuste, significância de inclinação e intercepto, correlação de Pearson, planejamento fatorial, teste de normalidade, teste de igualdade de variâncias, teste t-Student e análise de variância. Para a análise da linearidade, que teve tamanho de amostra de 14 e 2 termos na equação de regressão, a estatística Durbin-Watson foi empregada, adotando os limites $DL = 1,045$ e $Du = 1,350$, baseados na Tabela de Savin e White (Savin, White, 1977) e considerando a seguinte interpretação: se o valor (D) calculado for $D > DU$, não existe correlação, se $D < DL$, existe uma correlação positiva e se D estiver entre os dois limites, o teste é inconclusivo. Para a comparação da quantificação obtida por DPS e WP foi adotada estatística de Mann-Whitney e para a comparação das amostras do estudo de transporte foi aplicado Teste de Friedman. Os resultados são expressos por média e coeficiente de variação (CV%) ou por mediana e interquartil 25% e interquartil 75%. Foi aplicado um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento do método

4.1.1 Detecção de THD e THD-d4 em espectrometria de massa

As transições m/z 259,1 \rightarrow 84,1 para THD e 263,1 \rightarrow 84,1 para THD-d4 apresentaram alta estabilidade e abundância, e foram selecionadas para quantificar a talidomida nas amostras analisadas. Os íons de confirmação para cada composto também foram selecionados com base na estabilidade e abundância do pico, sendo, m/z 259,1 \rightarrow 186,0 para THD e 263,1 \rightarrow 190,0 para THD-d4. Além disso, a consistência da proporção de íons para a quantificação sobre o pico de confirmação foi considerada para construir o método de detecção SRM (*Single Reaction Monitoring*). Os valores otimizados para os parâmetros MS (energia de colisão, lente de RF, temperaturas e vazão de gás de dessolvatação) foram obtidos do relatório de aplicação TSQ Altis Tune.

As transições m/z (razão de massa/carga) incluindo íon precursor, íon produto de quantificação e íon produto de confirmação e razão de íons para THD e THD-d4 foram selecionadas e estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de espectrometria de massa e tempos de retenção típicos para talidomida e seu padrão interno marcado com isótopo estável

| Composto | Tempo de retenção (min) | Íon precursor (m/z) | Íon produto (m/z) ⁽¹⁾ | Energia de colisão (eV) | Voltagem tubo de lentes (V) | Razão de íon alvo |
|----------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|
| talidomida | 5,7 | 259,1 | 84,1 | 13 | 70 | |
| | | | 186 | 17 | 70 | 87,2 |
| talidomida -d4 | 5,7 | 263,1 | 84,1 | 13 | 70 | |
| | | | 190 | 17 | 70 | 76,3 |

NOTA: ⁽¹⁾ Íons produto são dados como íon de quantificação e íon de confirmação, respectivamente.

ESI: ionização por eletrospray; eV: eletroVolts; m/z: razão massa/carga; V: Volts.

4.1.2 Extração em fase sólida *online* e separação cromatográfica

Extração em fase sólida *online* foi aplicada no método com a eluição da coluna SPE (SolEx™ RSLC HRP, 2,1 x 20 mm) no modo gradiente produzindo picos mais simétricos e melhor formato de pico do que o modo isocrático.

A combinação ideal em relação ao tempo de execução, tempo de retenção, formato do pico e resposta MS foi alcançada para a coluna SPE *online* com uma mistura de Solvente A (0,5% de ácido fórmico em água) como fase aquosa e uma mistura de Solvente B (0,5% de ácido fórmico em 50% de metanol, 40% de acetonitrila e 10% de água) como fase orgânica. Para a separação cromatográfica, a condição ótima foi

obtida com uma coluna analítica Accucore PFP 80 A, $50 \times 2,1$ mm, $2,6 \mu\text{m}$, acoplada a uma coluna de proteção $2,1 \times 20$ mm (Security Guard Cartridge C18 Phenomenex, Torrance, CA, EUA), como fase estacionária, e uma mistura de Solvente A (0,1% de ácido fórmico em água) como fase aquosa e uma mistura de Solvente B (0,1% de ácido fórmico em 70% de metanol e 30% de acetonitrila) como fase orgânica. O modo isocrático de eluição testado não forneceu separação adequada dos compostos tanto para a coluna SPE *online* quanto para a coluna analítica. Por isso, as fases móveis foram bombeadas em modo gradiente de acordo com o programa de eluição conforme descrito na Tabela 3 para SPE *online* e para o método cromatográfico analítico (Tabela 4). O tempo de retenção foi de 5,7 minutos para THD e THD-d4 (Tabela 2).

Tabela 3 - Programa de eluição para limpeza em extração em fase sólida (SPE) *online*

| Tempo min | Fluxo mL/min | Solvente A % | Solvente B % |
|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| condição inicial | 1,000 | 100,0 | 0,0 |
| 0,0 | 1,000 | 100,0 | 0,0 |
| 1,0 | 1,000 | 100,0 | 0,0 |
| 3,0 | 1,000 | 80,0 | 20,0 |
| 3,1 | 1,000 | 15,0 | 85,0 |
| 6,9 | 1,000 | 15,0 | 85,0 |
| 7,0 | 1,000 | 100,0 | 0,0 |
| 8,0 | término da corrida | | |

NOTA: Limpeza otimizada de SPE *online* com coluna SolEx™ RSLC HRP, $2,1 \times 20$ mm, ajustada a 40°C e eluída com mistura de fases orgânica e aquosa. Solvente A: 0,5% de ácido fórmico em água; Solvente B: 0,5% de ácido fórmico em 50% de metanol, 40% de acetonitrila e 10% de água.

Tabela 4 - Programa de eluição em gradiente para coluna de separação (analítica)

| Tempo min | Fluxo mL/min | Solvente A % | Solvente B % |
|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Condição inicial | 0,400 | 73,0 | 27,0 |
| 0,0 | 0,400 | 73,0 | 27,0 |
| 3,0 | 0,400 | 73,0 | 27,0 |
| 5,0 | 0,400 | 10,0 | 90,0 |
| 6,5 | 0,400 | 10,0 | 90,0 |
| 6,6 | 0,400 | 73,0 | 27,0 |
| 8,0 | término da corrida | | |

NOTA: Método cromatográfico otimizado usando coluna analítica Accucore™ PFP 50X $2,1$ mm X $2,6 \mu\text{m}$, acoplada a uma coluna de proteção $2,1 \times 20$ mm (Security Guard Cartridge C18 Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Temperatura do forno a 40°C e eluído com uma mistura de fases orgânica e aquosa. Solvente A: 0,1% de ácido fórmico em água; Solvente B: ácido fórmico a 0,1% em 70% de metanol e 30% de acetonitrila. Volume de injeção de $60 \mu\text{L}$.

4.1.3 Otimização do método para amostras DPS

Os resultados do planejamento fatorial para otimização do método para amostras DPS foram apresentados como porcentagem de recuperação, e variaram de 89 a 148% (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados do planejamento fatorial para otimização do método para amostras DPS

| Ensaio | Fator | | | Resposta de % recuperação de talidomida |
|--------|----------|--------------|---------------|---|
| | extrator | tempo vórtex | centrifugação | |
| | A | B | C | |
| 1 | - | - | - | 88,6 |
| 2 | + | - | - | 94,3 |
| 3 | - | + | - | 105,1 |
| 4 | + | + | - | 103,4 |
| 5 | - | - | + | 147,5 |
| 6 | + | - | + | 103,8 |
| 7 | - | + | + | 106,0 |
| 8 | + | + | + | 100,0 |
| 9 | - | - | - | 91,2 |
| 10 | + | - | - | 95,1 |
| 11 | - | + | - | 101,9 |
| 12 | + | + | - | 99,1 |
| 13 | - | - | + | 142,7 |
| 14 | + | - | + | 105,8 |
| 15 | - | + | + | 106,3 |
| 16 | + | + | + | 97,0 |

NOTA:

| | | | |
|-------|---------------|----------------------|-----------|
| Fator | | Nível (-) | Nível (+) |
| A | extrator | H ₂ O/ACN | FM |
| B | tempo vórtex | 30s | 60s |
| C | centrifugação | com papel | sem papel |

Os três fatores avaliados, a saber, a solvente extrator, o tempo de agitação em vórtex e a condição de centrifugação apresentaram efeito significativo na recuperação da amostra DPS, e a interação de dois fatores (tempo de vórtex e centrifugação) apresentou maior contribuição para a variabilidade da concentração de THD (Figura 3).

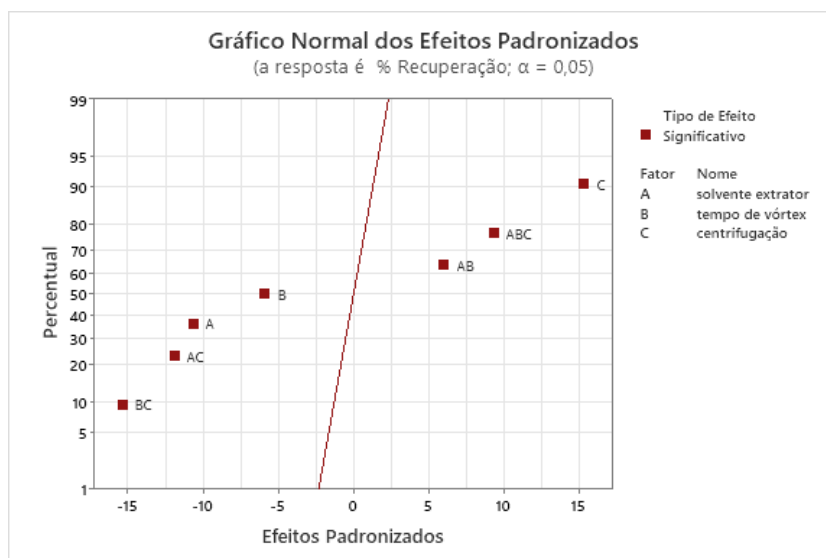


Figura 3 - Efeitos padronizados para resposta de porcentagem de recuperação de talidomida em DPS
 NOTA: DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco

Adotar maior tempo de agitação, combinado com a centrifugação sem papel e a solução extratora contendo maior proporção de água em vez de solvente orgânico produz melhor recuperação de THD do cartão DPS (Figura 4), com bom perfil de pico nos cromatogramas (Figura 5). Assim, a preparação da amostra DPS usando uma mistura de água e acetonitrila combinada a 60 segundos de agitação seguido pela remoção do papel antes da centrifugação foi escolhida para os experimentos de validação do método DPS e quantificação de amostras de pacientes.

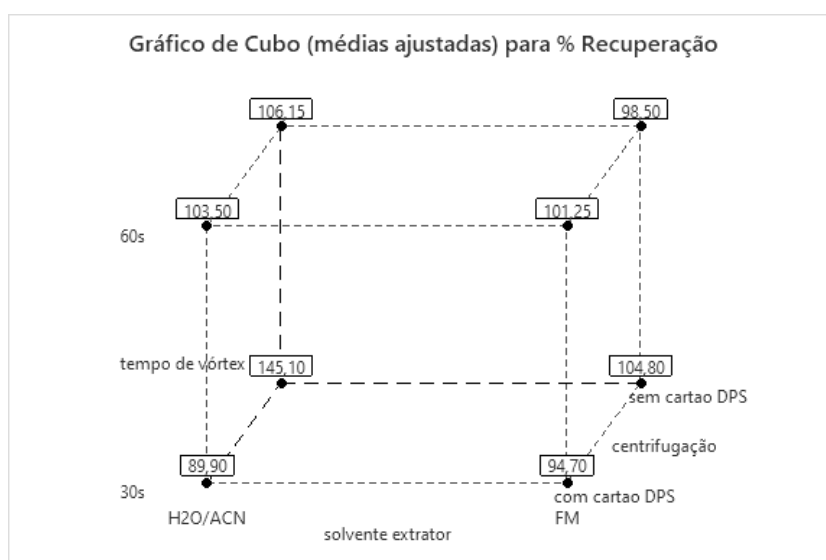


Figura 4 - Otimização por planejamento de experimentos (DOE) para preparação de amostra de talidomida e talidomida-d4 em DPS

NOTA: FM: 73% Solvente A (0,1% de ácido fórmico em água) e 27% de Solvente B (0,1% de ácido fórmico em 70% de metanol e 30% de acetonitrila). Os resultados de DOE são expressos no gráfico de cubo como a porcentagem de recuperação com base na concentração nominal.
 ACN: Acetonitrila; DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; FM: fase móvel.

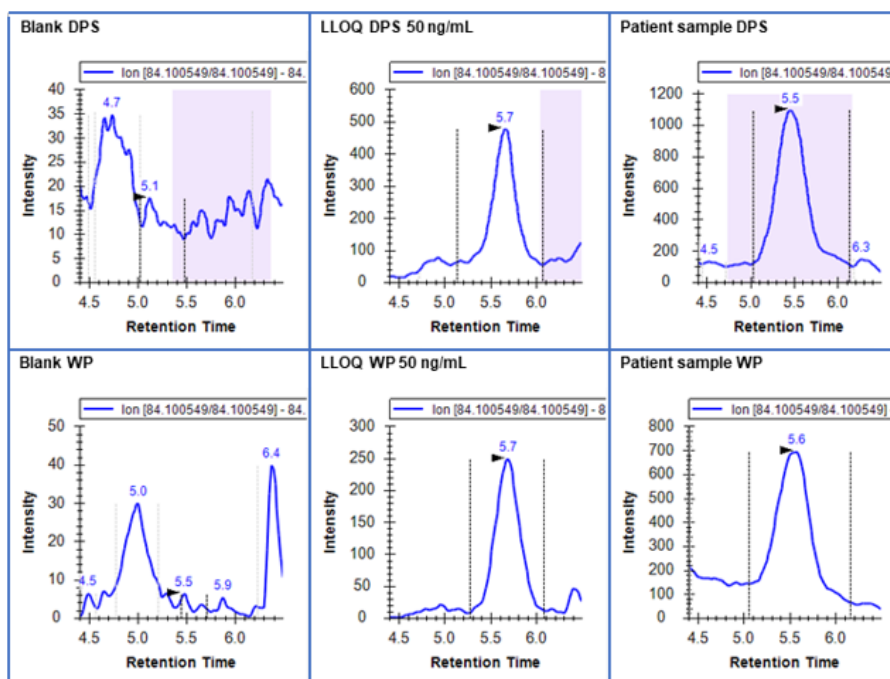


Figura 5 - Perfil cromatográfico de THD quantificada por SPE-UHPLC-MS para amostras preparadas como plasma seco e plasma úmido

NOTA: Plasma sem adição de THD – Branco; Limite inferior de quantificação, amostra de paciente; DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; WP: plasma úmido

4.2 Validação do método

4.2.1 Linearidade

As respostas de razão de área de pico THD/THD-d4 são consistentes para o preparo por DPS e WP (Tabela 6).

Tabela 6 - Respostas do teste de linearidade para DPS e WP

| Concentração nominal (ng/mL) | Razão de área de pico THD/THD-4 | |
|------------------------------|---------------------------------|-------|
| | DPS | WP |
| 50 | 0,032 | 0,085 |
| 50 | 0,040 | 0,087 |
| 100 | 0,172 | 0,150 |
| 100 | 0,177 | 0,151 |
| 250 | 0,415 | 0,415 |
| 250 | 0,334 | 0,390 |
| 500 | 0,787 | 0,817 |
| 500 | 0,742 | 0,776 |
| 1000 | 1,523 | 1,579 |
| 1000 | 1,456 | 1,389 |
| 1500 | 2,193 | 2,431 |
| 1500 | 1,888 | 2,387 |
| 2000 | 2,982 | 3,371 |
| 2000 | 3,220 | 3,295 |

A análise de regressão linear, estimada pelo método dos mínimos quadrados, demonstra que o método é linear na faixa de concentração de talidomida de 50 a 2000 ng/mL para quantificação de talidomida por DPS e por WP (Tabela 7). Uma ponderação por peso ($1/x$) resultou em melhores valores para o coeficiente de determinação (R^2) 0,990 e 0,997 respectivamente para DPS e WP. A avaliação da significância dos interceptos (IC_{95%} inclui o zero) e das inclinações (IC_{95%} não inclui o zero) das curvas de calibração foram aceitáveis. Os dados apresentaram homoscedasticidade, e foi demonstrada igualdade de variância ao longo da faixa linear. Além disso, não foi observada falta de ajuste (p-valor > 0,05) para ambas as matrizes.

Tabela 7 - Análise estatística do teste de linearidade para DPS e WP

| Resumo da linearidade | DPS | WP |
|--|----------------------------|----------------------------|
| equação ajustada | $y = -0,0155 + 0,001498 X$ | $y = -0,0014 + 0,001606 X$ |
| coeficiente de determinação (R^2) | 0,990 | 0,997 |
| coeficiente de correlação (r) | 0,994 | 0,998 |
| significância do intercepto (IC _{95%}) | (-0,0511; 0,0202) | (-0,0234; 0,0205) |
| significância da inclinação (IC _{95%}) | (0,001403; 0,001593) | (0,001548; 0,001664) |
| p-valor do teste de falta de ajuste (homoscedasticidade) | 0,110 | 0,101 |
| D-valor da estatística Durbin-Watson | 1,420 | 1,805 |

NOTA: modelo de regressão linear ponderado por peso ($1/x$)

A faixa linear de quantificação da talidomida mostrou uma razão de inclinação (DPS/WP) de 0,93 (Figura 6). O gráfico de dispersão dos resíduos padronizados para cada matriz mostra um ponto menor que -2 desvios padrão, porém não menor que -3 desvios padrão (Figura 7). A distribuição dos resíduos foi randômica e não foi observada autocorrelação serial dos resíduos, com base na estatística Durbin-Watson, sendo considerado aceitável.

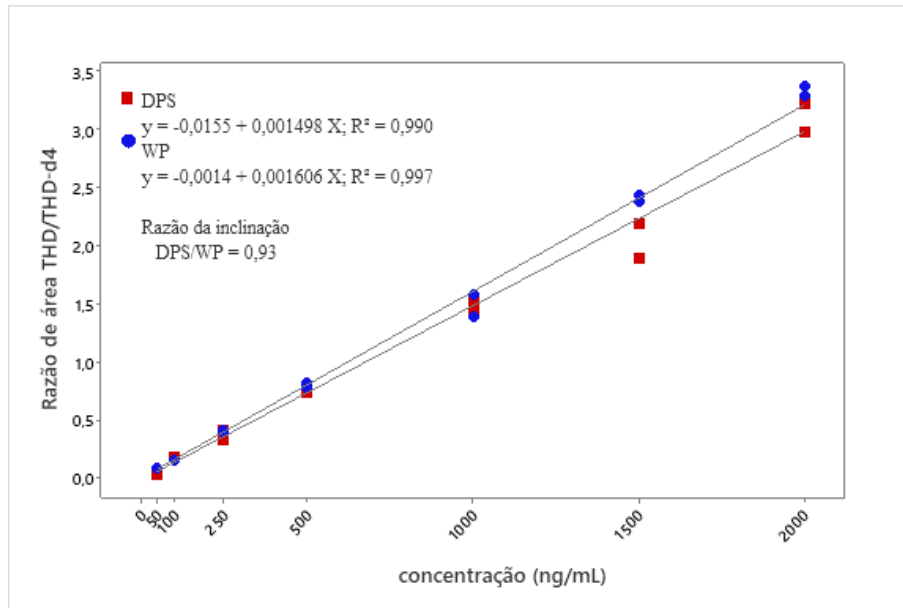


Figura 6 - Faixa linear de quantificação para talidomida em DPS e WP
 NOTA: O ensaio foi realizado com duas replicatas de preparação e três replicatas de aquisição para cada um dos sete níveis de concentração da curva de calibração. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco. WP: plasma úmido

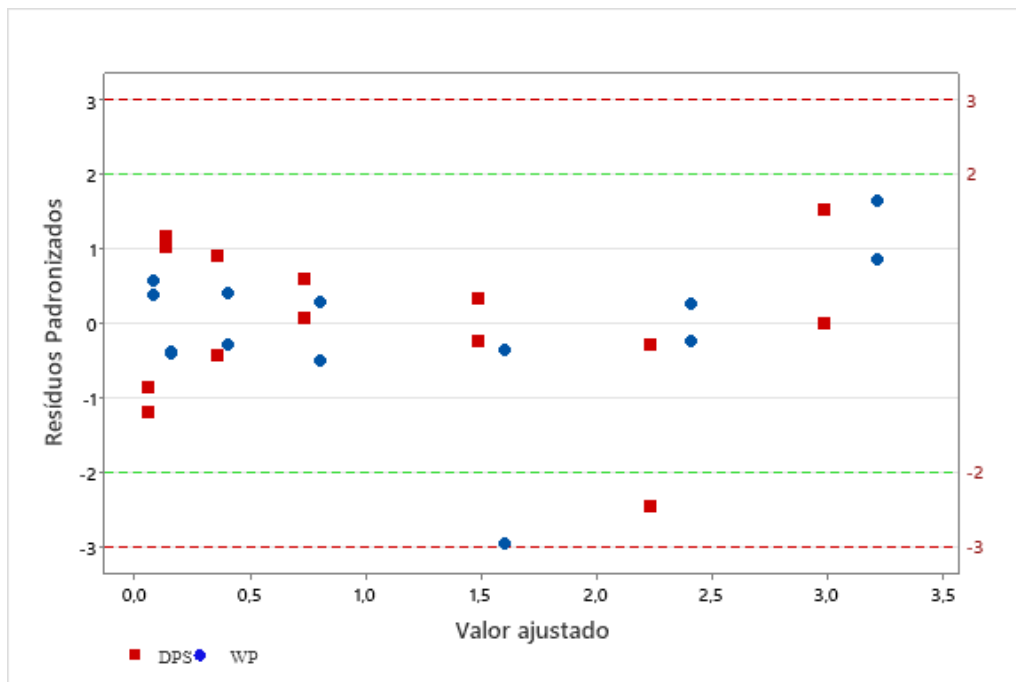


Figura 7 - Gráfico de dispersão dos resíduos padronizados para a faixa linear de quantificação para talidomida em DPS e WP
 NOTA: DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco. WP: plasma úmido

4.2.2 Limites de detecção e quantificação

A concentração de 20 ng/mL atende os requisitos para limite de detecção (LOD) para DPS e WP, com variabilidade e erro elevados (Figura 8).

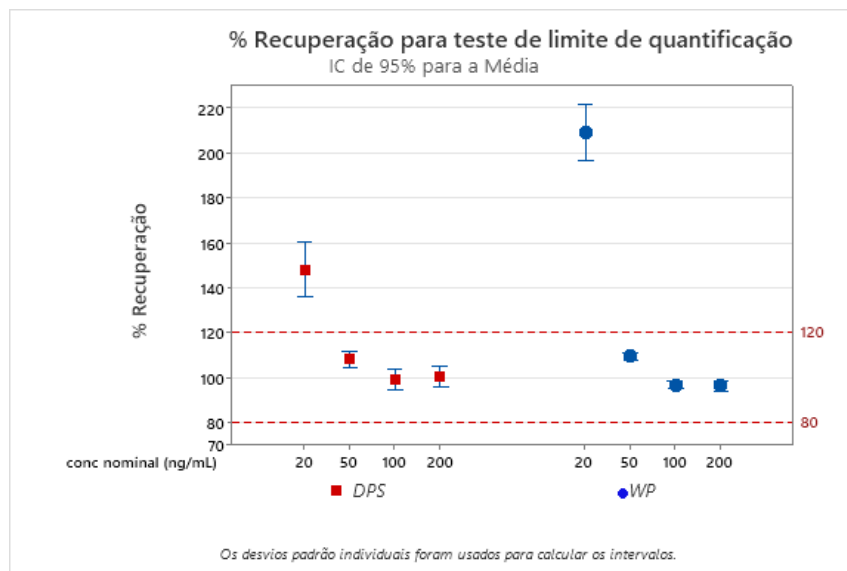


Figura 8 - Gráfico de intervalos para testes de limites de detecção e quantificação de talidomida em DPS e WP. NOTA: Intervalo para concentração abaixo de 50 ng/mL é apenas ilustrativo, pois não pode ser quantificado com exatidão e precisão. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco. WP: plasma úmido.

O limite inferior de quantificação (LLOQ) do método corresponde à concentração de 50 ng/mL para a qual foram obtidos coeficiente de variação e erro padrão relativo menor que 10% (Tabela 8).

Tabela 8 - Limites de detecção e quantificação para talidomida em DPS e WP

| | % Recuperação DPS | | | | % Recuperação WP | | | |
|-------|-------------------|------------|----------|----------|------------------|------------|----------|----------|
| | 20ng/mL | 50ng/mL | 100ng/mL | 200ng/mL | 20ng/mL | 50ng/mL | 100ng/mL | 200ng/mL |
| | 160,8 | 100,7 | 95,4 | 96,6 | 212,1 | 110,7 | 92,5 | 92,2 |
| | 134,8 | 107,6 | 105,8 | 99,6 | 208,1 | 112,3 | 96,5 | 90,2 |
| | 156,4 | 111,1 | 104,0 | 94,0 | 196,0 | 109,1 | 96,5 | 95,1 |
| | 143,5 | 112,8 | 105,8 | 100,5 | 252,5 | 110,7 | 98,1 | 99,5 |
| | 152,1 | 104,1 | 94,5 | 92,3 | 220,2 | 113,9 | 93,3 | 95,9 |
| | 143,5 | 107,6 | 91,9 | 100,5 | 200,0 | 109,1 | 98,1 | 99,9 |
| | 126,1 | 116,3 | 99,7 | 109,6 | 204,0 | 105,8 | 97,3 | 99,9 |
| | 139,1 | 105,9 | 98,0 | 108,3 | 200,0 | 109,1 | 97,3 | 97,9 |
| | 178,1 | 109,3 | | 103,5 | 187,9 | 107,4 | 100,5 | 97,5 |
| | | | | | 212,1 | 107,4 | 98,9 | 97,9 |
| Média | 148,3 | 108,4 | 99,4 | 100,5 | 209,3 | 109,6 | 96,9 | 96,6 |
| CV% | 10,5 | 4,3 | 5,4 | 5,9 | 8,5 | 2,2 | 2,5 | 3,4 |
| %EPR | 48,3 | 8,4 | -0,6 | 0,5 | 109,3 | 9,6 | -3,1 | -3,4 |

NOTA: Os dados são expressos como resultados de recuperação individuais e médios, coeficiente de variação em porcentagem (CV%) e %EPR que é a diferença da concentração observada e da concentração nominal de talidomida expressa em porcentagem. Replicatas de DPS com n=8 e n=9 é devido à quantidade insuficiente de solução no *vial*. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; WP: plasma úmido.

4.2.3 Exatidão e precisão

Os ensaios intracorrída para exatidão e precisão em baixas e altas concentrações resultaram em erro padrão relativo menor que 8% para ambas as matrizes e CV% < 18,6% (no LLOQ) para DPS e < 7,7% para WP. Os ensaios intercorridas para exatidão e precisão resultam em erro padrão relativo na faixa de 1,7 a 6,7% para DPS e 1,3 a 8,9% para WP, com coeficiente de variação de 3,4 a 11,6% para DPS e 4,3 a 8,6% para plasma úmido (Tabela 9).

Os ensaios intracorrída e intercorridas para avaliar exatidão e precisão, considerando todos os valores obtidos retornou ERP dentro da faixa de $\pm 15\%$ e CV $\leq 15\%$, cumprindo com os limites estabelecidos.

Tabela 9 - Exatidão e precisão da talidomida em DPS e WP

| Concentração nominal (ng/mL) | Intracorrída | | Intercorridas | |
|---------------------------------|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | DPS | WP | DPS | WP |
| 50 | 3,2 (18,6) | 7,7 (7,3) | 4,2 (11,6) | 8,9 (4,3) |
| 150 | 2,3 (3,0) | 5,2 (2,9) | 1,7 (6,1) | 1,3 (8,6) |
| 1100 | 4,6 (4,0) | 0,4 (7,7) | 3,9 (4,7) | 4,1 (5,8) |
| 1600 | 7,9 (4,8) | 4,8 (6,6) | 6,7 (3,4) | 3,4 (6,4) |

NOTA: Os dados são expressos como %EPR que é a diferença da concentração observada e da concentração nominal de talidomida expressa em porcentagem obtida em três replicatas independentes e cinco réplicas por nível (coeficiente de variação expresso em porcentagem) a 50, 150, 1100 e 1600 ng/ mL. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; WP: plasma úmido.

4.2.4 Efeito de Matriz, Recuperação e Eficiência do Processo de extração

Considerando os níveis de concentração baixo e alto de THD para DPS e WP, o efeito matriz (ME) ficou na faixa entre 100,6% e 107,0%, sendo considerado mínimo. A recuperação (RE) variou entre 88,7% e 105,0%, o que é adequado tanto em baixa quanto em alta concentrações. O processo de preparação da amostra mostrou-se adequado, pois a análise de eficiência do processo (PE) variou entre 91,3% e 109,3% (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito Matriz, Recuperação e Eficiência do Processo para talidomida em DPS e WP

| Concentração nominal (ng/mL) | DPS | | | WP | | | |
|------------------------------|---------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | ME (%) | RE (%) | PE (%) | ME (%) | RE (%) | PE (%) | |
| 150 | 106,3 | 93,6 | 99,5 | 100,1 | 105,4 | 105,5 | |
| | 112,1 | 82,9 | 93,0 | 112,5 | 100,5 | 113,1 | |
| | 101,7 | 98,0 | 99,6 | 108,9 | 109,6 | 119,4 | |
| | 106,9 | 94,8 | 101,4 | 106,9 | 91,2 | 97,5 | |
| | 108,1 | 92,2 | 99,6 | 94,0 | 118,1 | 111,0 | |
| 1600 | 101,5 | 100,4 | 101,9 | 102,2 | 95,1 | 97,1 | |
| | 108,4 | 91,5 | 99,3 | 99,3 | 96,8 | 96,1 | |
| | 101,0 | 82,8 | 83,7 | 101,2 | 109,8 | 111,1 | |
| | 97,6 | 91,3 | 89,1 | 99,9 | 101,2 | 101,1 | |
| | 106,3 | 77,7 | 82,5 | 100,2 | 101,9 | 102,1 | |
| 150 | Média | 107,0 | 92,3 | 98,6 | 104,5 | 105,0 | 109,3 |
| | DPR (%) | 3,5 | 6,1 | 3,3 | 7,1 | 9,6 | 7,6 |
| 1600 | Média | 103,0 | 88,7 | 91,3 | 100,6 | 100,9 | 101,5 |
| | DPR (%) | 4,2 | 9,9 | 9,7 | 1,1 | 5,7 | 5,9 |

NOTA: Os dados são expressos como resultados individuais e média de ME, RE e PE obtidos em cinco amostras (desvio padrão relativo expresso em porcentagem). DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; ME: Efeito da Matriz; PE: Eficiência do Processo; RE: Recuperação; WP: plasma úmido.

A comparação de médias (Figura 9) mostra que o efeito matriz é igual para DPS e para WP, entretanto observou-se uma maior recuperação e melhor extração do WP em relação ao DPS, apesar dos resultados serem considerados aceitável, pois as médias obtidas cumprem com a faixa recomendada de 85 a 115% para métodos bioanalíticos.

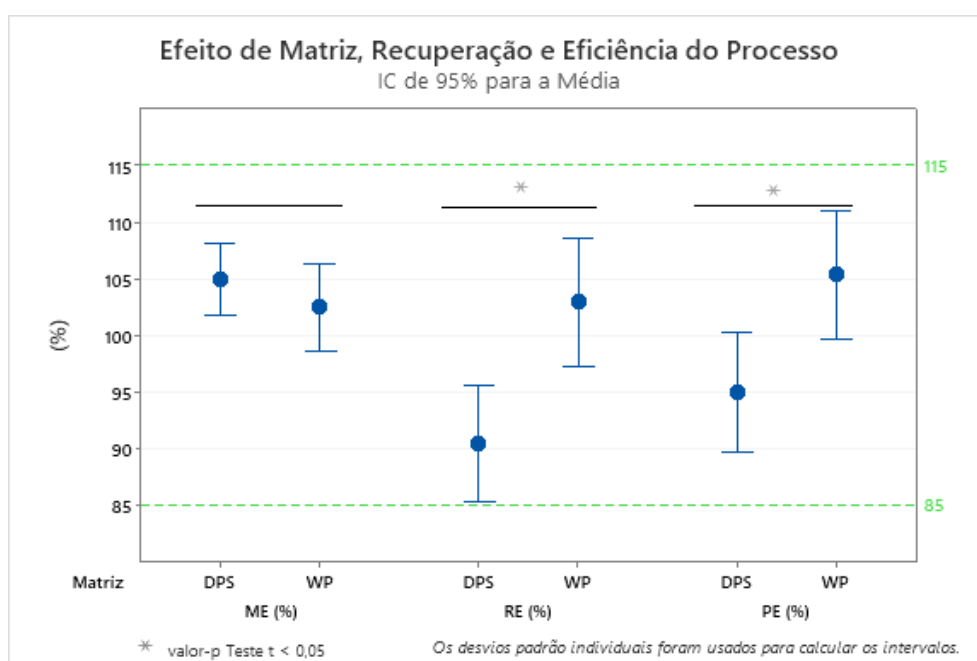


Figura 9 - Gráfico de intervalos para testes de efeito matriz, recuperação e eficiência do processo de talidomida em DPS e plasma úmido

NOTA: DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco. WP: plasma úmido.

4.2.5 Efeito residual (*Carryover*)

Nenhum efeito residual foi registrado, portanto o método foi considerado seguro quanto ao efeito residual entre injeções. O efeito residual estimado foi de 3,4 e 1,6 ng/mL com erro limite de 16,0 e 20,4 ng/mL, respectivamente para DPS e WP.

4.2.6 Estudo de interferentes

A quantificação de talidomida não sofre interferência de hidroxicloroquina ou prednisona. A recuperação de 89,4% observada para THD em amostras contendo alta concentração de hidroxicloroquina (1000 ng/mL) e alta concentração de prednisona (100 ng/mL).

4.2.7 Integridade da diluição

A integridade da diluição foi validada para $1/2$ da concentração nominal de 3200 ng/mL e apresentou acurácia (103,3%) e precisão (CV% 6,4 %), aceitáveis para DPS e 94,7% e CV% 9,1% para WP.

4.2.8 Estabilidade

A avaliação de estabilidade para THD, em diferentes condições de armazenamento, mostrou que a solução estoque padrão do analito (20.000 ng/mL) e do padrão interno permaneceram estáveis a -20°C por 30 dias, com recuperação na faixa de 95,1% a 98,5% e CV% máximo de 8%, considerando as concentrações de 150, 1100 e 1600 ng/mL e o preparo em DPS e WP.

Quando os extratos foram deixados no compartimento do amostrador automático (ajustado a 10°C), eles permaneceram estáveis por até quando preparados por DPS (recuperação de 98% a 117% e CV% máximo de 5%) e WP (recuperação de 97% a 108% e CV% máximo de 1%).

Considerando todos os ensaios de estabilidade para DPS e WP nos níveis de concentração de 150 e 1600 ng/mL, a concentração medida em cada condição comparada à concentração inicial apresentou média de recuperação adequada na faixa de 85 a 115% com CV% não maior que 15% para DPS (Figura 10) e WP (Figura 11).

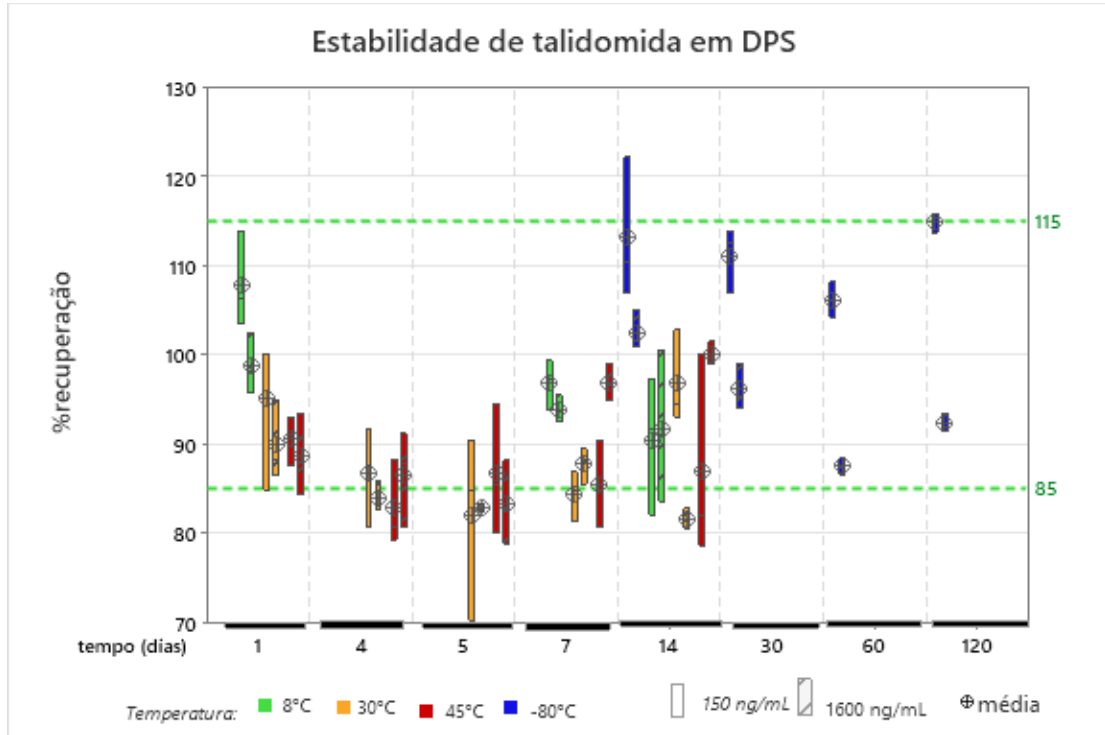


Figura 10 - Gráfico de boxplot da estabilidade de talidomida em DPS

NOTA: Temperatura: 8°C (2 a 8°C; refrigerador); 30°C (15 a 30°C; temperatura ambiente); 45°C (condição extrema); -80°C (freezer). Concentração: 150 ng/mL e 1600 ng/mL. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco.

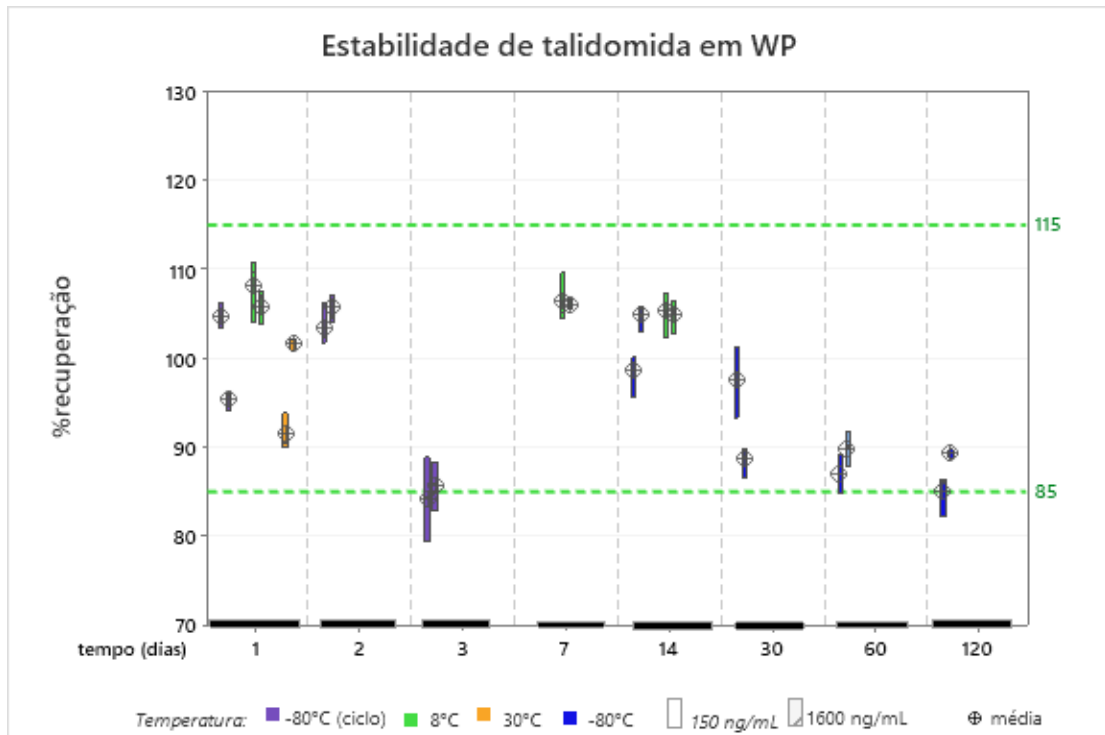


Figura 11 - Gráfico de boxplot da estabilidade de talidomida em plasma WP

NOTA: Temperatura: -80°C (ciclo de congelamento e descongelamento); 8°C (2 a 8°C; refrigerador); 30°C (15 a 30°C; temperatura ambiente); -80°C (freezer). Concentração: 150 ng/mL e 1600 ng/mL. WP: plasma úmido.

Para DPS e WP a estabilidade é dada da seguinte forma (Tabela 11): estabilidade de um dia para WP e 14 dias para DPS em temperatura ambiente. A THD permaneceu estável, tanto no DPS quanto no WP por pelo menos 14 dias a 2-8°C e por 4 meses quando armazenados a -80°C. Quando submetido a procedimentos de congelamento-descongelamento, a talidomida mantém-se estável até 3 ciclos de congelamento-descongelamento no WP. Por fim, a estabilidade da talidomida em DPS foi testada em condições extremas de temperatura de 45°C, e a concentração de THD foi preservada por até 14 dias.

Tabela 11 - Estabilidade de talidomida em amostras DPS e WP

| Condição | DPS | | WP | |
|--------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | 150 (ng/mL) | 1600 (ng/mL) | 150 (ng/mL) | 1600 (ng/mL) |
| RT por 1 dia | 94,9 (9,3) | 89,8 (5,0) | 91,4 (2,3) | 101,7 (0,7) |
| RT por 14 dias | 96,7 (5,4) | 81,5 (1,4) | n/a | n/a |
| 2 a 8°C por 14 dias | 90,3 (8,5) | 91,7 (8,3) | 105,2 (2,5) | 104,8 (1,8) |
| -80°C por 4 meses | 114,9 (1,0) | 92,2 (1,2) | 84,9 (2,7) | 89,3 (0,6) |
| 45°C por 14 dias | 86,8 (13,2) | 100,0 (1,4) | n/a | n/a |
| 3 ciclos congela-descongela | n/a | n/a | 84,1 (5,7) | 85,7 (3,2) |

NOTA: Os dados são expressos como resultado médio de %Recuperação (CV, %). DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; n/a: não avaliado; RT: temperatura ambiente; WP: plasma úmido

4.2.9 Análise de amostras de pacientes

Amostras de plasma obtidas de oito pacientes com LEC sob tratamento com talidomida mostraram valores de mediana iguais ($p = 0,318$) para concentração em DPS e WP [257,1 (244,4-292,8) ng/mL vs. 269,3 (265,7-319,9 ng/mL)] com uma diferença absoluta entre a concentração de DPS e WP não maior que 11% para cada paciente (Tabela 12).

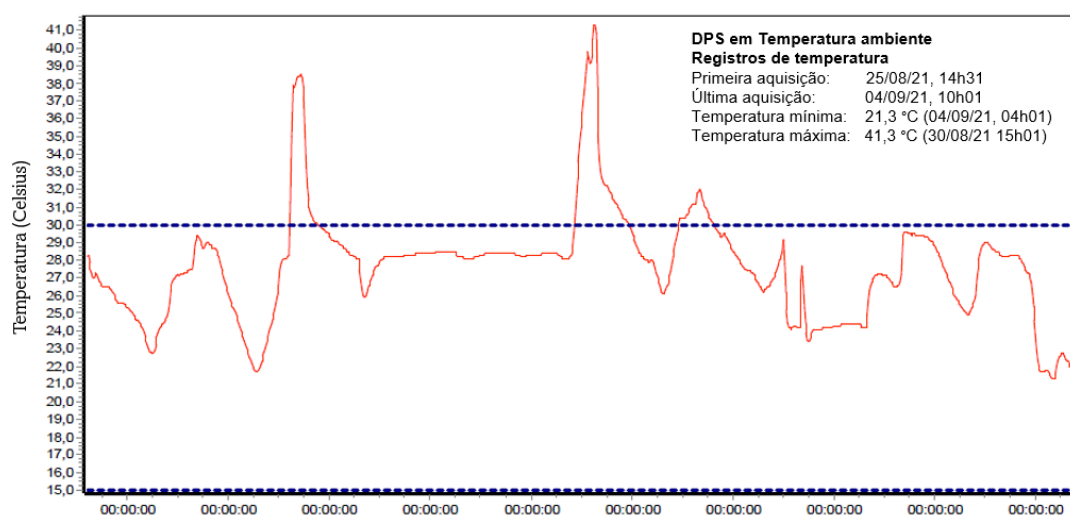
Tabela 12 - Níveis plasmáticos de talidomida de pacientes em tratamento preparada em DPS ou WP

| Paciente | THD em DPS (ng/mL) | THD em WP (ng/mL) | Diferença |
|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| #1 | 242,5 | 270,4 | -10,3 |
| #2 | 285,3 | 312,4 | -8,7 |
| #3 | 245,1 | 260,8 | -6,0 |
| #4 | 315,3 | 342,2 | -7,9 |
| #5 | 417,7 | 428,8 | -2,6 |
| #6 | 257,3 | 267,4 | -3,7 |
| #7 | 256,9 | 268,2 | -4,2 |
| #8 | 207,8 | 208,7 | -0,4 |
| Mediana (IQ25; IQ75) | 257,1 (244,4; 292,8) | 269,3 (265,7; 319,9) | -5,1 (-8,1; -3,5) |

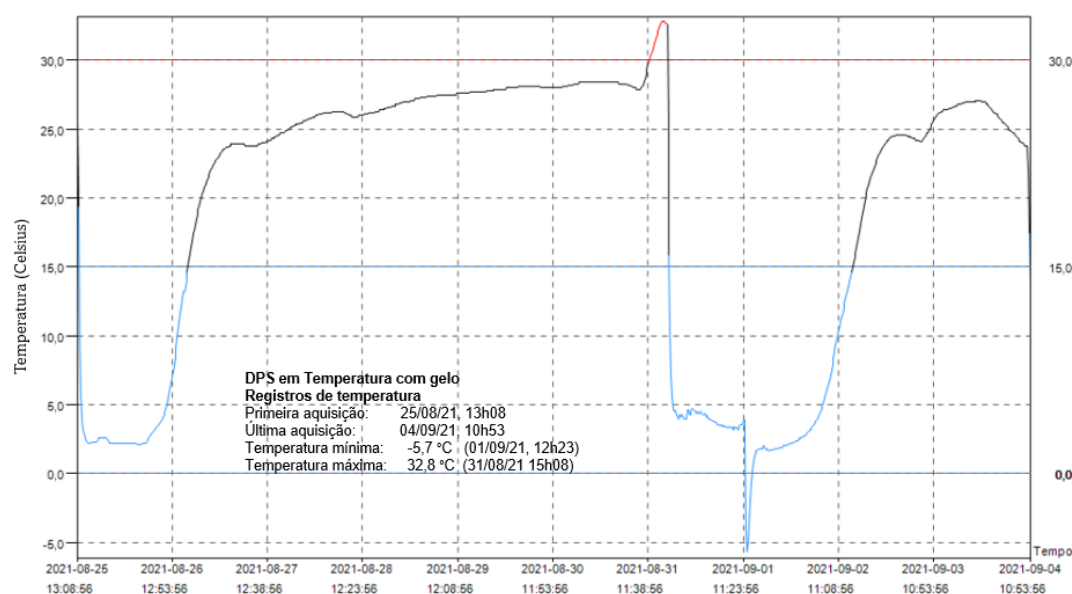
NOTA: A diferença é calculada como a concentração de DPS subtraída da concentração de WP, dividida pela concentração de WP. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; IQ25: interquartil 25; IQ75: interquartil 75; THD: talidomida; WP: wet plasma.

4.2.10 Estudo de transporte de amostras de plasma de pacientes preparadas em DPS

As amostras de plasma de pacientes preparadas em DPS foram submetidas a simulação de transporte logístico, sendo enviados por correio e completando o percurso São Paulo/SP:Barreira/BA, ida e volta, em 9 dias, passando por posto intermediário em Salvador/BA, totalizando 235 horas (Figura 2). Na maior parte do tempo as amostras foram mantidas em temperaturas ambiente entre 15°C e 30°C, sendo registradas temperaturas de 21,3°C a 41,3°C para as amostras acondicionadas sem gelo (Figura 11a) e de -5,7°C a 32,8°C para as amostras acondicionadas com gelo (Figura 11b).



(a)



(b)

Figura 12 - Temperaturas registradas das amostras DPS acondicionadas sem gelo (a) e com gelo (b) durante simulação de transporte logístico. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco
 NOTA: DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco.

Após quantificação da talidomida no retorno das amostras, registrou-se concentrações plasmáticas de talidomida próximos para os pares de amostras dos cinco pacientes (Figura 12).

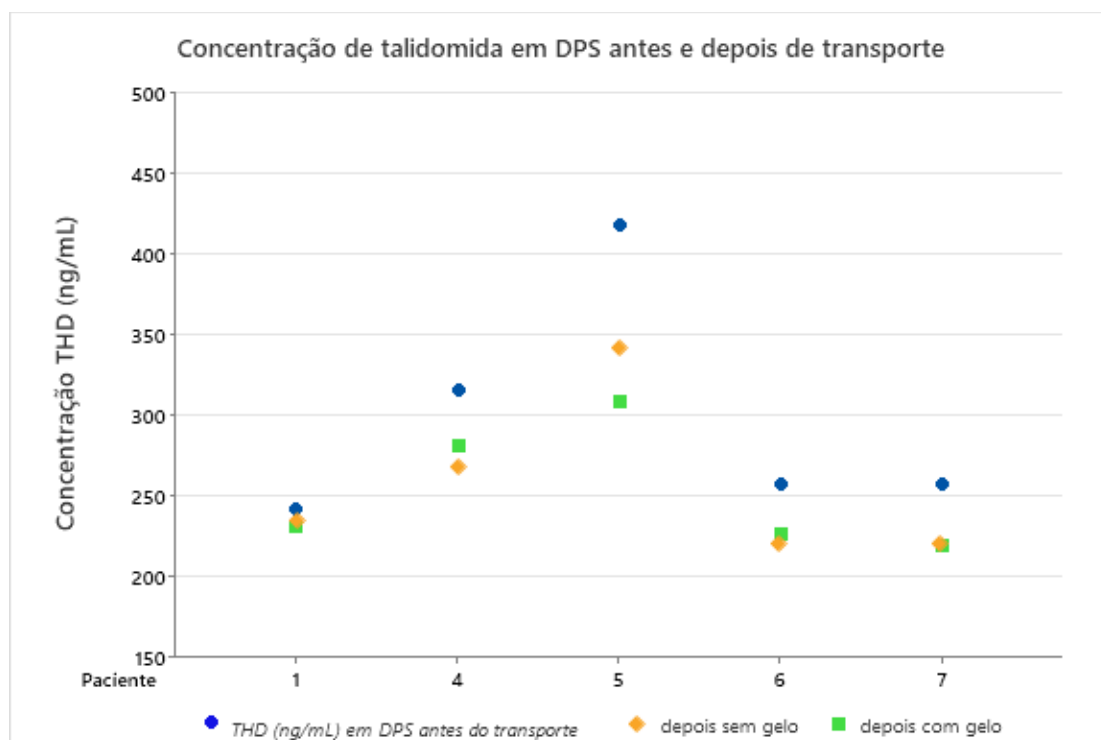


Figura 13 - Concentrações plasmáticas de talidomida em amostras de pacientes preparada em DPS antes e depois de simulação de transporte logístico com acondicionamento sem gelo e com gelo
NOTA: DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco.

Considerando a temperatura do transporte, amostras de plasma obtidas dos cinco pacientes mostraram valores semelhantes de concentração para as replicatas submetidas ao transporte acondicionadas sem gelo e com gelo [(234,8 (220,8-268,0) ng/mL vs. 231,6 (227,1-281,3)], $p=0,655$ com diferença (mediana) de 14,3 (14,1-15,0)% e 11,7 (10,8-14,5)%, respectivamente em relação à concentração de talidomida antes do transporte (Tabela 12).

Tabela 13 - Concentração plasmática de talidomida em amostras de pacientes preparada em DPS antes e depois da simulação de transporte logístico

| Paciente | THD em DPS (ng/mL) ⁽¹⁾ | | | % Diferença ⁽²⁾ | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | antes | depois sem gelo | depois com gelo | depois sem gelo | depois com gelo |
| #1 | 242,5 | 234,8 | 231,6 | 3,2 | 4,5 |
| #4 | 315,3 | 268,0 | 281,3 | 15,0 | 10,8 |
| #5 | 417,7 | 341,8 | 308,9 | 18,2 | 26,0 |
| #6 | 257,3 | 220,4 | 227,1 | 14,3 | 11,7 |
| #7 | 256,9 | 220,8 | 219,7 | 14,1 | 14,5 |
| Mediana | 257,3 | 234,8 | 231,6 | 14,3 | 11,7 |
| (IQ25-IQ75) | (256,9-315,3) | (220,8-268,0) | (227,1-281,3) | (14,1-15,0) | (10,8-14,5) |

NOTA: ⁽¹⁾ Concentração plasmática de talidomida antes e depois do transporte das amostras em DPS acondicionadas sem gelo e com gelo; ⁽²⁾ porcentagem da diferença absoluta de THD (ng/mL) das amostras em DPS depois do transporte em relação à concentração antes do transporte. DPS: dispositivo de amostragem de plasma seco; IQ25: interquartil 25; IQ75: interquartil 75. THD: talidomida;

5 DISCUSSÃO

Há necessidade de métodos bioanalíticos confiáveis e práticos para monitorar a talidomida no plasma com o objetivo de individualizar e otimizar o tratamento, além de superar as barreiras logísticas relacionadas ao acesso ao monitoramento terapêutico de fármaco (TDM). Neste trabalho, reportamos pela primeira vez o desenvolvimento e validação de um novo método de cromatografia líquida de ultra alta performance acoplado com espectrometria de massa e extração em fase sólida *online* para quantificar talidomida em amostras clínicas preparadas como amostras de plasma seco (*Dried Plasma Spot* - DPS). O método foi validado com sucesso de acordo com as diretrizes internacionais para validação de métodos bioanalíticos, e após validação clínica, mostrou ser uma ferramenta disponível para quantificar amostras de pacientes tratados com talidomida principalmente para CLE ativo e mieloma múltiplo, inclusive amostras enviadas de locais remotos.

O método aqui reportado é exato, preciso e confiável para a faixa clínica, com um limite de quantificação de 50 ng/mL para DPS e WP. A recuperação de DPS e WP foi superior a 85%, sem efeito matriz observado, nem efeito residual (*carryover*) significativo. Também reportamos uma notável estabilidade de 14 dias para amostras de DPS armazenadas em temperatura ambiente, e em condições de temperatura extrema (45°C). A estabilidade à temperatura ambiente reportada neste trabalho para DPS é de grande relevância pois permite o envio das amostras para regiões distantes, em temperatura ambiente. Concentrações elevadas de THD in DPS parecem apresentar menor estabilidade quando comparada com concentrações mais baixas, para critérios de aceitação para validação bioanalítica, considerando as diretrizes da FDA. Contudo, consideramos que esses valores encontram-se no limite de valor aceitável, e que não poderiam ser usados para refutar a estabilidade da talidomida nestes níveis.

O monitoramento terapêutico de fármaco, como rotina laboratorial, pode enfrentar limitações em alguns contextos pelo fato de alguns locais não terem acesso a laboratórios equipados com equipamentos mais especializados, como sistemas UPLC-MS/MS, que permite a quantificação do fármaco com alta seletividade e sensibilidade (Gaspar et al., 2021). Essas limitações são atualmente superadas pelo envio de amostras congeladas sob condições controladas (pelo menos 2 a 8°C) para laboratórios especializados remotos (Dinur et al., 2022). No entanto, este é um procedimento dispendioso que pode reduzir o volume da rotina de TDM dependendo do orçamento de alguns centros, principalmente em países em desenvolvimento (Jacques et al., 2022). Nesse contexto, o DPS tem sido

considerado uma alternativa promissora, uma vez que as amostras podem ser facilmente armazenadas em temperatura ambiente e enviadas em envelopes comuns por correio, com risco de contaminação minimizado e sem necessidade da cadeia fria (Capiou et al., 2019; Verougstraete; Stove, 2022). Além disso, a estratégia de amostragem no DPS supera problemas conhecidos de hematócrito na análise de dispositivos de amostragem de sangue seco - DBS (Iacuzzi, 2021).

Alguns métodos LC-MS/MS são reportados para a quantificação de THD em fluidos biológicos, incluindo plasma, soro e sêmen, mas nenhum em DS (Bai et al., 2013; Li et al., 2021; Roche et al., 2012; Shu et al., 2016; Teo et al., 2002). Para a preparação da amostra 100 μL de WP e 200 μL de DPS foram necessários no presente método. Essa quantidade pode ser facilmente obtida a partir de uma única punção venosa, mesmo em pacientes pediátricos (Howie, 2011). Reportamos no presente estudo, uma precipitação simples de proteínas seguida de extração em fase sólida em linha para o preparo de amostras de DPS e WP. O ajuste de pH ou evaporação durante a preparação da amostra não foi necessário. Por outro lado, os métodos reportados anteriormente aplicaram extração líquido-líquido (Bai et al., 2013; Li et al., 2021; Roche et al., 2012) ou extração em fase sólida convencional (Shu et al., 2016; Teo et al., 2002), como pré-tratamento da amostra. Ambas as técnicas de preparação de amostras normalmente requerem grandes quantidades de solvente orgânico e são demoradas, o que limita a rotina do laboratório quando um grande número de amostras é processado (Kole et al., 2011). A faixa de medição analítica de 50 a 2000 ng/mL observada no presente estudo foi semelhante à reportada em métodos anteriores (Bai et al., 2013; Li et al., 2021; Shu et al., 2016). Além disso, essa faixa é compatível com as faixas clínicas reportadas na literatura, permitindo identificar pacientes não aderentes e pacientes com provável risco de eventos tóxicos (Kakimoto et al., 2002; Yuki et al., 2021). O teste de diluição de amostras foi validado com sucesso, garantindo a quantificação precisa das amostras com concentrações maior que a faixa de trabalho (50 - 2000 ng/mL). A recuperação e o efeito matriz foram adequados tanto em DPS quanto em WP. Esses são parâmetros críticos em métodos que utilizam os dispositivos de amostragem seca (DS), uma vez que o hematócrito e a homogeneidade da amostra espalhada no papel podem impactar na robustez e reprodutibilidade dos resultados (Capiou et al., 2019). Vários experimentos durante o desenvolvimento do método, incluindo o planejamento de experimentos (*Design of Experiment* - DoE) para preparação de amostras em DPS, foram realizados com sucesso

para otimizar esses parâmetros, principalmente para DPS. Este efeito foi minimizado no presente estudo, pois foi empregado o DPS e não DBS. Além disso, toda a área de aplicação do dispositivo foi recortada para extração do fármaco. Efeito matriz mínimo (ME) e boa recuperação foram de fato observados.

A utilização de toda a área de aplicação do dispositivo DPS exigiu um aumento do volume do extrator, o que prejudicou o sinal de talidomida no espectrômetro de massas e o limite de quantificação, pois nenhuma etapa de evaporação foi considerada no pré-tratamento das amostras. Para superar esse problema, o volume de plasma para aplicar no cartão de DPS foi aumentado de 100 μ L para 200 μ L, produzindo um sinal de MS consistente no LLOQ (50 ng/mL). Isso poderia ser considerado uma limitação do método reportado, uma vez que essa quantidade de amostra poderia ser difícil de obter em alguns ambientes clínicos, como pacientes pediátricos, especialmente para os neonatos (De Rose et al., 2020), e considerando que o tempo total de secagem foi aumentado.

O uso de dispositivos DS provou aumentar a estabilidade dos analitos (Jantos et al., 2013) e pelo menos 7 dias de estabilidade à temperatura ambiente foi reportada anteriormente para muitos compostos (Nys et al., 2017). Demonstramos uma estabilidade notável de 14 dias em temperatura ambiente para talidomida em plasma preparado como DPS no presente estudo. Essa estabilidade ainda foi mantida quando as amostras foram armazenadas a 45°C, simulando uma condição extrema de transporte em países tropicais. Li e colegas (2020) reportaram semelhante estabilidade em amostras de DPS a 45°C para cloridrato de amantadina, o que corrobora nossos resultados, por outro lado, apenas 3 dias de estabilidade foram registrados para ácido valpróico em plasma preparado como DPS a 40°C (Li et al., 2021), sugerindo que a estabilidade em temperatura elevada pode depender das características físico-químicas do fármaco. Uma limitação do presente estudo é a falta de informações sobre a relevância do ácido cítrico no preparo de amostra por DPS para a estabilidade, uma vez que a adição do ácido cítrico é requerido para prevenir a degradação da talidomida em amostras de plasma convencional (Bai et al., 2013). Portanto, não podemos provar a superioridade de estabilidade da talidomida preparada em DPS em relação ao WP neste aspecto. Entretanto, o benefício do transporte de amostras em DPS, em temperatura ambiente é suportado pelos dados de estabilidade aqui apresentados.

Os resultados obtidos em amostras reais de pacientes tratados com THD relatados neste trabalho mostram concentrações semelhantes ($\Delta < 15\%$) após quantificação tanto em

plasma convencional (WP) como em DPS, e suportam a aplicabilidade do DPS para monitoramento terapêutico de talidomida no contexto clínico em que 200 µL de plasma podem ser obtidos. A simulação da “vida real” realizada neste estudo quanto ao transporte logístico reforça ainda mais o impacto destes achados considerando que concentrações semelhantes ($\Delta < 15\%$) foram registradas em amostras de pacientes tratados com talidomida, preparados como DPS e enviados pelo correio a mais de 3000 km de distância (São Paulo SP - Barreira/BA, ida e volta), totalizando 9 dias de viagem, em que a maior temperatura das amostras, registrada pelo monitor de temperatura durante o transporte foi $> 40^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente, não houve diferença na concentração de talidomida em amostras de DPS acondicionadas para o transporte (com gelo) e não acondicionada para o transporte (sem gelo), confirmando que a estabilidade da talidomida é preservada em DPS por vários dias independentemente da temperatura durante o transporte, como já observado nos ensaios de estabilidade durante a validação analítica do método. Entretanto, considerando o limitado número de amostras disponíveis para os testes, sendo 8 na comparação DPS x WP e 5 no estudo exploratório para avaliar a estabilidade das amostras submetidas a transporte e a amplitude dos resultados de níveis plasmáticos de talidomida, a comparação estatística das medidas pareadas fica comprometida. Contudo o estudo sugere que o transporte de amostras de pacientes em DPS pode ser viável para amostras acondicionadas em recipientes sem gelo, contribuindo para um transporte simples e seguro, mesmo entre regiões de longa distância, viabilizando acesso ao monitoramento terapêutico de pacientes de regiões remotas. O sucesso do método com DPS utilizado como matriz alternativa é um avanço importante, pois dá acesso ao monitoramento do fármaco talidomida para locais sem laboratórios equipados com equipamentos LC-MS/MS e pessoal treinado para realizar a análise. Assim, o DPS traz a possibilidade desses locais enviarem amostras para centros especializados sem preocupações, pois a integridade das amostras durante o transporte é suportada pela estabilidade comprovada neste trabalho para temperatura ambiente e para condições adversas de temperatura (ex: $> 40^{\circ}\text{C}$).

Não há ainda consenso atualmente sobre os benefícios do monitoramento terapêutico da talidomida. Isso se deve à falta de estudos clínicos robustos reportando níveis de talidomida em fluidos biológicos. Apenas dois estudos avaliaram a relação entre os níveis plasmáticos de talidomida, a eficácia e a toxicidade, sendo um dos estudos realizado pelo nosso grupo, e ambos os estudos incluindo um número pequeno de

pacientes (Kakimoto et al., 2002; Yuki et al., 2021b). Kakimoto e colaboradores avaliaram 26 pacientes com mieloma múltiplo refratário, tratados com alta dose de talidomida (100-400 mg) mostrando uma boa resposta geral em relação à malignidade, juntamente com eventos adversos mais elevados, incluindo neuropatia periférica, que foi observada predominantemente em pacientes com maior nível sérico de talidomida (> 2000 ng/mL). Embora essa associação não tenha sido observada no relato de Yuki et al. (2021b) em 12 pacientes com LEC sob menor dose de talidomida (≤ 100 mg), os autores sugeriram que a dosagem do fármaco pode ser útil como método direto para detectar os pacientes não aderentes à terapia medicamentosa. Um outro estudo reportou que concentrações de 10 a 250 ng/g de talidomida foram encontradas no sêmen de pacientes em tratamento (Teo et al., 2002). A dosagem foi realizada por LC-MS/MS e foi sugerido ser útil para reforçar o aconselhamento ao uso de contracepção de barreira nos pacientes em tratamento para reduzir o risco teratogênese nas gestantes parceiras.

6 CONCLUSÕES

1. O método desenvolvido e validado é exato e preciso para quantificar os níveis do fármaco em pacientes em tratamento com talidomida, tanto em plasma convencional, como em DPS, visando um monitoramento terapêutico do fármaco.
2. O DPS é adequado como estratégia de amostragem alternativa para superar limitações no acesso a laboratórios especializados para monitoramento terapêutico da talidomida em LC-MS/MS entre longas distâncias.
3. Estudos prospectivos adicionais serão necessários para definir a relevância da quantificação de talidomida e sua viabilidade no monitoramento em pacientes tratados com essa terapia para diferentes doenças.

7 ANEXOS

Anexo A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

PROJETO TEMÁTICO: AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE DROGAS UTILIZADAS EM DOENÇAS AUTOIMUNES REUMATOLÓGICAS NO ACOMPANHAMENTO DA SEGURANÇA/EFICÁCIA DA TERAPIA, ATIVIDADE DE DOENÇA E ADERÊNCIA À TERAPÊUTICA.

SUBPROJETO: AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DO LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO COM TALIDOMIDA: FATORES CLÍNICOS, LABORATORIAIS E HISTOLÓGICOS ASSOCIADOS À RESPOSTA CLÍNICA E EFEITOS ADVERSOS.

2. PESQUISADOR PRINCIPAL:

ELOISA BONFA

Cargo/ Função: Profa. Titular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina do HC-FMUSP.

Inscrição no Conselho Regional Nº: 42.708

Unidade do HC-FMUSP: Disciplina de Reumatologia do HCFMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

INTRODUÇÃO: Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa por ter lúpus eritematoso, que, nesse momento, está causando manchas inflamadas na sua pele, apesar de você já estar recebendo remédios para o lúpus, como a prednisona e/ou hidroxicloroquina e/ou dapsona e/ou remédios imunossupressores (que abaixam a imunidade). As informações sobre o estudo estão detalhadas nesse documento e lhe serão explicadas pelos pesquisadores, que responderão qualquer dúvida. Pedimos a você que leia este termo com atenção e se sinta livre para fazer qualquer pergunta que lhe surgir a respeito do mesmo.

PROPÓSITO DO ESTUDO: O lúpus eritematoso é uma doença cuja causa ainda não é bem conhecida e que pode causar inflamação em vários órgãos do corpo, inclusive na pele, levando ao aparecimento de manchas que pioram com a luz do sol. Em alguns casos, essas manchas de pele podem ser muito graves e difíceis de tratar, levando ao aparecimento de feridas e podendo deixar cicatrizes. O objetivo dessa pesquisa é estudar a resposta de um medicamento chamado Talidomida no tratamento da inflamação de pele de difícil controle causada pelo lúpus. Esse medicamento já tem eficácia comprovada para o tratamento da doença, sendo principalmente utilizado para os quadros cutâneos graves. Um dos efeitos colaterais mais comuns da Talidomida é a polineuropatia periférica (doença que afeta vários nervos das pernas e braços). O que nós desejamos estudar é se o exame que dosa o nível sanguíneo (e também na saliva) dessa medicação pode ajudar a "prever" quais pacientes responderão melhor ao tratamento e quais deles poderão desenvolver efeitos colaterais. Também pretendemos estudar se a biópsia de pele (ou seja, a análise ao microscópio de um pequeno pedaço de pele) pode ajudar a "prever" quais pacientes terão melhores resultados com o uso da medicação e quais deles desenvolverão efeitos colaterais (alteração dos nervos).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: Poderão participar desse estudo pacientes adultos com lúpus eritematoso que, no momento da entrada na pesquisa, estejam apresentando manchas inflamadas na pele e que necessitem de tratamento. A sua participação é voluntária e se o Sr.(a) não desejar participar, ou quiser sair do estudo, isso não mudará em nada o seu seguimento no Hospital. Serão aceitos no estudo apenas os pacientes que concordarem em assinar esse documento. Além disso, como a Talidomida é uma medicação teratogênica (ou seja, pode causar malformações fetais), somente serão incluídos:

1. Homens adultos, que concordem em usar camisinha em todas as relações sexuais durante o período do estudo e até um mês após a parada a medicação (13 meses no total), mesmo que já tenham feito vasectomia. Nota: as camisinhas serão fornecidas gratuitamente pelos pesquisadores.
2. Mulheres que estejam "na menopausa" há mais de um ano (e pediremos exames de sangue para comprovar a "menopausa"), ou que tenham certeza de ter feito laqueadura das trompas.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: Não poderão participar do estudo:

1. Qualquer mulher que tenha risco de engravidar, mesmo que esteja tomando medicação anticoncepcional ou faça uso de DIU.
2. Pacientes masculinos que não concordem em usar camisinha conforme explicado acima.
3. Pacientes com história de neuropatia periférica (doença que afeta os nervos das pernas e braços), trombose, embolia pulmonar ou alcoolismo.

PROCEDIMENTOS A SEGUIR: Ao entrar no estudo, cada paciente deverá coletar exames de sangue e passar por uma consulta médica. A seguir, os pacientes serão submetidos a duas biópsias de pele, sendo uma delas no local afetado (inflamado) pela doença e a outra na pele da coxa (não inflamada). Por fim, será realizado um exame chamado Eletro-neuromiografia, que serve para estudar o funcionamento dos nervos das pernas e braços (nesse exame, são colocadas pequenas agulhas nos braços e nas pernas, para ver se os nervos estão funcionando direito, com duração de cerca de meia hora). As biópsias de pele são feitas com anestesia local, sendo retirado um pequeno pedaço (cerca de 6 milímetros para exame). Caso não haja nenhuma contraindicação (alteração de nervos) nessas avaliações, daremos início ao tratamento com Talidomida por via oral na dose de 1 comprimido de

100 mg uma vez ao dia. Nota: Serão mantidos os remédios que você já estiver tomando pelo lúpus. A dose de talidomida e de prednisona serão progressivamente diminuídas, se houver melhora das lesões cutâneas.

Durante o estudo, todos os pacientes participantes serão avaliados periodicamente para determinar os efeitos da medicação e as possíveis reações colaterais (que estão explicadas abaixo). A primeira reavaliação deverá ocorrer dentro de duas semanas, a segunda em 1 mês e, a partir de então, a cada 3 meses, até completar 1 ano de acompanhamento. Em cada uma dessas avaliações, o paciente vai passar por consulta médica e coleta de exames de sangue. Também será solicitado que o Sr.(a) cuspa um pouco em um tubo, para a coleta da saliva.

Depois de 6 meses de acompanhamento, os pacientes deverão passar por uma nova biópsia de pele da perna e uma segunda Eletroneuromiografia. Por fim, completados os 12 meses do estudo, uma terceira Eletroneuromiografia será realizada.

Nota: Se não houver resposta clínica até 2 meses do uso de talidomida, essa medicação será suspensa (saída do estudo) e será continuado o seguimento do paciente conforme a rotina dos ambulatórios de Reumatologia e Dermatologia do HC-FMUSP.

RISCOS E DESCONFORTOS: A Talidomida é considerada uma medicação bastante eficaz para o tratamento dos problemas de pele causados pelo lúpus, que já vem sendo usada há muitos anos no tratamento dessa doença. Apesar disso, alguns pacientes podem desenvolver efeitos colaterais com o uso dessa medicação, sendo a neuropatia periférica um dos mais comuns. Essa reação, que pode ocorrer em cerca de 25% dos pacientes, é caracterizada por dor, formigamento e/ou perda de sensibilidade nas pernas e braços. Quando isso acontece, o tratamento com a Talidomida deve ser interrompido o quanto antes, pois esse problema pode ser irreversível. Por esse motivo, o Sr.(a) será reavaliado frequentemente pelo médico pesquisador e também realizará a Eletroneuromiografia periodicamente e também poderá entrar em contato conosco nos telefones abaixo. Se o Sr.(a) desenvolver sintomas ou sinais de neuropatia nesse exame, nós suspenderemos imediatamente a Talidomida e o Sr.(a) continuará sendo seguido no ambulatório de lúpus e serão utilizados os medicamentos conforme as rotinas desse ambulatório. Além disso, para diminuir os possíveis efeitos colaterais, usaremos baixas doses do medicamento (no máximo 1 comprimido de 100 mg ao dia) (e essa dose será diminuída, quando as manchas na pele estiverem melhores, para meio comprimido por dia e, depois, para um quarto de comprimido por dia) e por no máximo 12 meses (pois a neuropatia periférica, quando aparece, em geral é após 1 ano de tratamento com a Talidomida). Outros efeitos colaterais possíveis são: sonolência, "intestino preso", dor de cabeça, inchaço, tontura, aumento do apetite, enjôo, coceira e ganho de peso. Para diminuir a sonolência, a Talidomida deverá ser "tomada" à noite. As biópsias de pele e a Eletroneuromiografia também podem causar um pouco de dor ou desconforto.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA/ SAÍDA DO ESTUDO: A sua participação é completamente voluntária, ou seja, o Sr.(a) pode decidir participar ou não deste estudo e também é livre para deixar o estudo a qualquer momento, sem que exista qualquer prejuízo ou perda de seus direitos de seguimento e tratamento no Hospital.

Se o Sr.(a) decidir participar, deve assinar esse consentimento informado (última folha) e rubricar (fazer uma pequena assinatura) em todas as outras folhas. Uma via será fornecida ao Sr.(a) e a outra será guardada pelo pesquisador. Se decidir não participar do estudo, ou sair dele, essa decisão não terá nenhuma influência sobre seus futuros cuidados médicos.

BENEFÍCIOS: Conforme já mencionado acima, a Talidomida é uma medicação bastante eficaz no tratamento dos problemas de pele causados pelo lúpus eritematoso. Portanto, o principal benefício será a possível melhora das manchas na sua pele com o uso deste remédio. Não existem benefícios financeiros nem para o Sr.(a), nem para os pesquisadores. O Sr.(a) será informado de todos resultados de exames.

CONFIDENCIALIDADE: Essa pesquisa é confidencial e seus dados pessoais não serão revelado, em qualquer hipótese a outras pessoas. O sigilo do estudo só será quebrado nos casos em que houver autorização legal para fazê-lo. Os resultados desse estudo poderão ser apresentados em congressos ou em publicações científicas, mas a sua identidade será sempre preservada. Os dados coletados nesse estudo serão utilizados apenas para essa pesquisa.

INTERESSES COMERCIAIS: O estudo será gratuito. Como não existem interesses econômicos ou financeiros por parte das instituições participantes, não se espera que você, sua família ou qualquer um dos pesquisadores recebam pagamento algum por participar do mesmo.

MAIS INFORMAÇÕES: Esse consentimento foi aprovado pelo Comitê de Ética, Ensino e Pesquisa dessa instituição. Se você tiver perguntas adicionais referentes à pesquisa ou quaisquer outras dúvidas ou sintomas, por favor, entre em contato com:

Profa. Dra. Eloisa Bonfa, Dra. Emily Figueiredo V. Neves ou Dra. Sandra G. Pasoto, nos endereços e telefones abaixo:

- Endereço: Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, N° 455 – 3º andar, sala 3150. Cerqueira César, São Paulo/SP. CEP: 01246-903
- Telefones: (11) 3061-7492 / (11) 3061-7490 (Secretaria da Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da USP)
(11) 2661-6105 (Ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP)
- Email: reumato@usp.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética dessa pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (C.E.P.) no seguinte endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar. Tel: (11) 2661-7585, 2661-1548, 2661-1549. E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DO LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO COM TALIDOMIDA: FATORES CLÍNICOS, LABORATORIAIS E HISTOLÓGICOS ASSOCIADOS À RESPOSTA CLÍNICA E EFEITOS ADVERSOS”**.

Eu discuti com a **Profa. Dra. Eloisa Bonfa** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse Serviço.

Assinatura do paciente/ representante legal

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data: ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desse paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____ / ____ / ____

Anexo B - Aprovação do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE DROGAS UTILIZADAS EM DOENÇAS AUTOIMUNES REUMATOLÓGICAS NO ACOMPANHAMENTO DA SEGURANÇA/EFICÁCIA DA TERAPIA, ATIVIDADE DE DOENÇA E ADERÊNCIA À TERAPÊUTICA

Pesquisador: ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39705014.6.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.922.444

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores vão estudar a relevância do monitoramento dos níveis sanguíneos e salivares de drogas utilizadas em doenças autoimunes reumatológicas no acompanhamento da aderência à terapêutica. O projeto está claro e apresenta relevância na área médica. O protocolo experimental será realizado através de 4 subprojetos de acordo com o medicamento utilizado e não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores apresentam como proposta de estudo, a avaliação do papel das dosagens dos níveis séricos de fármacos no seguimento de pacientes com doenças reumáticas autoimunes. O estudo será desenvolvido em quatro subprojetos de acordo com as medicações estudadas: a hidroxiquina; talidomida; agentes biológicos e glicocorticoides. O desenho do estudo está bem definido e apresenta grande relevância na especialidade médica e no acompanhamento da eficácia da terapêutica utilizada..

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa, apesar de incluir a coleta de duas

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.922.444

amostras de pele do paciente que participar do estudo.No entanto, a implantação de uma nova metodologia em nosso centro permitirá a avaliação e acompanhamento dos efeitos dos glicocorticoides, talidomida e hidroxicloroquina em pacientes com LES, trazendo um benefício imediato para esses pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância na área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLES para os respectivos subprojetos obedecem as normas desta comissão.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_853392 E2.pdf | 31/01/2017 19:49:45 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEValidacaoTalidomida.docx | 30/01/2017 16:45:47 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEFarmacocinetica02_01_17.docx | 30/01/2017 16:43:46 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEProjeto4_GLICOCORTICOIDES02_01_17.doc | 30/01/2017 16:42:19 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEProjeto2_TALIDOMIDA02_01_17.docx | 30/01/2017 16:41:56 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLESubprojeto1C_HIDROXICLOROQUINA02_01_17.docx | 30/01/2017 16:41:31 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / | TCLESubprojeto1B_HIDROXICLOROQUINA02_01_17.docx | 30/01/2017 16:41:06 | ELOISA SILVA DUTRA DE | Aceito |

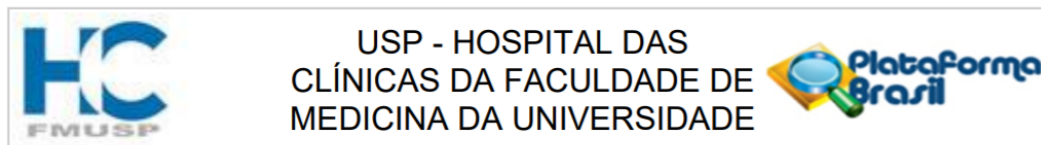
Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.922.444

| | | | | |
|---|--|------------------------|--|--------|
| Justificativa de Ausência | TCLESubprojeto1B_HIDROXICLOROQUINA02_01_17.docx | 30/01/2017 16:41:06 | OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLESubprojeto1A_HIDROXICLOROQUINA02_01_17.docx | 30/01/2017 16:40:37 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhaRostoAssinada_2a_emenda.pdf | 27/01/2017 17:30:13 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CadastroPesquisaAssinado.pdf | 13/01/2017 00:50:26 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | AprovacaoCAPPesqProjeto3Biologicos_2aAprovacao.pdf | 13/01/2017 00:46:41 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | AprovacaoCAPPesqProjeto3Biologicos.pdf | 13/01/2017 00:45:45 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CartaAnuenciaEletroneuromiografia.docx | 13/01/2017 00:44:32 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CartaAnuenciaDepartamentoPatologia.pdf | 13/01/2017 00:43:59 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CartaAnuenciaDermatologia.docx | 13/01/2017 00:43:28 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CartaAnuenciaOftalmologia.pdf | 13/01/2017 00:43:01 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CartaAnuenciaValdemirMCarvalho.pdf | 13/01/2017 00:42:08 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | FormularioSubmissaoEmenda02_01_2017assinado.pdf | 13/01/2017 00:03:53 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | CARTA_JUSTIFICATIVA_EMENDA_02_01_2017_ASSINADA.pdf | 13/01/2017 00:01:37 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | TermoResponsabilidade2TALIDOMIDA.doc | 13/01/2017 00:01:03 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Outros | TermoResponsabilidade1TALIDOMIDA.doc | 13/01/2017 00:00:25 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de | Termo_de_Assentimento_GLICOCORTICOIDES.doc | 12/01/2017 23:58:59 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010**UF:** SP **Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.922.444

| | | | | |
|---|--|------------------------|--|--------|
| Ausência | Termo_de_Assentimento_GLICOCORTI COIDES.doc | 12/01/2017 23:58:59 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_de_Assentimento_1C_HIDROXI CLOROQUINA.doc | 12/01/2017 23:58:34 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_de_Assentimento_1B_HIDROXI CLOROQUINA.doc | 12/01/2017 23:57:42 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_de_Assentimento_1A_HIDROXI CLOROQUINA.doc | 12/01/2017 23:57:12 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEProjeto3_BIOLOGICOS.doc | 12/01/2017 23:53:32 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoTematicoVersao02_01_17CAPPe sq.doc | 12/01/2017 23:49:29 | ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

8 REFERENCIAS

- Anderson M. How the COVID-19 pandemic is changing clinical trial conduct and driving innovation in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2021;13(5):1195-203.
- Bai N, Cui XY, Wang J, Sun CG, Mei H-K, Liang BB, Cai Y, Song X-J, Gu J-K, Wang R. Determination of thalidomide concentration in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Exp Ther Med*. 2013;5(2):626-30.
- Ball L. Storage and transportation of biological materials: The importance of a sample management plan. *BioProcess J*. 2010;9(1):50-1.
- Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nature Rev Cancer*. 2004;4(4):314-22.
- Bastuji-Garin S, Ochonisky S, Bouche P, Romain K Gherardi, Corinne Duguet, Zaya Djerradine, Florence Poli, Jean Revuz; Thalidomide Neuropathy Study Group. Incidence and risk factors for thalidomide neuropathy: A prospective study of 135 dermatologic patients. *J Invest Dermatol*. 2002;119(5):1020-6.
- Capiau S, Veenhof H, Koster RA, Bergqvist Y, Boettcher M, Halmingh O, Keevil BG, Koch BCP, Linden R, Pistos C, Stolk LM, Touw DJ, Stove CP, Alffenaar JWC. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and validation of dried blood spot-based methods for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2019;41(4):409-30.
- Carey R, Anderson F, George H, Hartmann A, Janzen V, Kallner A, Levine J, Schiffgens J, Srinivasan A, Tholen D. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006. (CLSI document EP15-A2, 25(17)).
- Chasset F, Tounsi T, Cesbron E, Barbaud A, Francès C, Arnaud L. Efficacy and tolerance profile of thalidomide in cutaneous lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(2):342-50.e4.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach, approved guideline. NCCLS Document EP6-A; 2003. (23(6)).
- Cortés-Hernández J, Torres-Salido M, Castro-Marrero J, Vilardell-Tarres M, Ordi-Ros J. Thalidomide in the treatment of refractory cutaneous lupus erythematosus: Prognostic factors of clinical outcome. *Br J Dermatol*. 2012;166(3):616-23.
- Cuadrado MJ, Karim Y, Sanna, G., Smith, E, Khamashta MA, Hughes GR V. Thalidomide for the treatment of resistant cutaneous lupus: Efficacy and safety of different therapeutic regimens. *Am J Med*. 2005;118(3):246-50.
- Delahaye L, Veenhof H, Koch BCP, Alffenaar JWC, Linden R, Stove C. Alternative sampling devices to collect dried blood microsamples: State-of-the-Art. *Ther Drug Monit*. 2021;43(3):310-21.

De Rose DU, Cairoli S, Dionisi M, Santisi A, Massenzi L, Goffredo BM, Dionisi-Vici, C, Dotta A, Auriti C. Therapeutic drug monitoring is a feasible tool to personalize drug administration in neonates using new techniques: An overview on the pharmacokinetics and pharmacodynamics in neonatal age. *Int J Mol Sci* 2020;21(16):5898.

Demirev PA. Dried blood spots: Analysis and applications. *Anal Chem*. 2013;85(2):779-89.

Dinur T, Bauer P, Beetz C, Kramp G, Cozma C, Iuraşcu M-I, Becker-Cohen M, Istiti M, Rolfs A, Zimran A, Revel-Vilk S. Gaucher disease diagnosis using Lyso-Gb1 on dry blood spot samples: time to change the paradigm? *Int J Mol Sci*.2022;23(3):1627.

Donald H. Chace DH, Barr JR, Duncan MW, Matern D, Morris MR, Palmer-Toy DE, Rockwood AL, Siuzdak G, Urbani A, Yergey AL, Chan YM. Mass spectrometry in the clinical laboratory: General principles and guidance; proposed guideline. *Clinical and Laboratory Standards*; 2007. (27(3)).

Eliasson E, Lindh JD, Malmström RE, Beck O, Dahl ML. Therapeutic drug monitoring for tomorrow. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69(Suppl 1):25-32.

Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, Cervera R, Doria A, Gordon C, Govoni M, Houssiau F, Jayne D, Kouloumas M, Kuhn A, Larsen JL, Lerstrøm K, Moroni G, Mosca M, Schneider M, Boumpas DT. 2019 Update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Practice Guideline. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(6):736-45.

FDA. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); 2018. (FDA 1043).

Filali-Ansary A, Lunven C, Turpault S, Beyer Y-J, O'Brien A, Delfolie A, Boyanova N, Sanderink G-J, Baldinetti F. Dried blood spot methodology in combination with liquid chromatography/tandem mass spectrometry facilitates the monitoring of teriflunomide. *Ther Drug Monit*. 2016;38(4):471-82.

Frankel HC, Sharon VR, Vleugels RA, Merola JF, Qureshi AA. Lower-dose thalidomide therapy effectively treats cutaneous lupus erythematosus but is limited by neuropathic toxicity. *Int J Dermatol*. 2013;52(11):1407-9.

Gaspar V, Ibrahim S, Zahedi R, Borchers C. Utility, promise, and limitations of liquid chromatography-mass spectrometry-based therapeutic drug monitoring in precision medicine. *J Mass Spectrom*. 2021;56(11):e4788.

Gordon JN, Goggin PM. Thalidomide and its derivatives: Emerging from the wilderness. *Postgrad Med J*. 2003;79(929):127-32.

Howie SR. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ*. 2011;89(1):46-53.

- Iacuzzi V, Posocco B, Zanchetta M, Gagno S, Poetto AS, Guardascione M, Toffoli G. Dried blood spot technique applied in therapeutic drug monitoring of anticancer drugs: a review on conversion methods to correlate plasma and dried blood spot concentrations. *Pharm Res.* 2021;38(5):759-78.
- Ito T, Handa H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenit Anom (Kyoto)*.2012;52(1):1-7.
- Jacques ALB, Santos MK, Gorziza RP, Limberger RP. Dried matrix spots: an evolving trend in the toxicological field. *Forensic Sci Med Pathol.* 2022;18(1):86-102.
- Jantos R, Vermeeren A, Sabljic D, Ramaekers JG, Skopp G. Degradation of zopiclone during storage of spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int J Legal Med.* 2013;127(1):69-76.
- Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S, Sato N, Kamata T, Yamaguchi M, Morita K, Yamada T, Takayama N, Uchida H, Shimada N, Tanigawara Y, Ikeda Y. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: Association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93(9):1029-36.
- Kodama T, Abe M, Iida S, Ozaki S, Sakai A, Sawamura M, Shimazaki C, Miyata A, Wakayama T, Murakami H. A pharmacokinetic study evaluating the relationship between treatment efficacy and incidence of adverse events with thalidomide plasma concentrations in patients with refractory multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9(2):154-9.
- Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr.* 2011;25(1-2):199-217.
- Li W, Tse FLS. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr.* 2010;24(1):49-65.
- Li Y, Jiang Y, Cao H, Lin H, Ren W, Huang J, Zhang J. Therapeutic drug monitoring of valproic acid using a dried plasma spot sampling device. *J Mass Spectrom.* 2021;56(4):e4603.
- Li Y, Jiang Y, Lin T, Wan Q, Yang X, Xu G, Huang J, Li Z. Amantadine hydrochloride monitoring by dried plasma spot technique: High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based clinical assay. *J Sep Sci.* 2020;43(12):2264-9.
- López-Ruiz R, Romero-González R, Garrido Frenich A. Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019;118:170-81.
- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75(13):3019-30.

- Naha U, Miller A, Patetta MJ, Barragan Echenique DM, Mejia A, Amirouche F, Gonzalez MH. The interaction of diabetic peripheral neuropathy and Carpal Tunnel Syndrome. *Hand (NY)*. 2023;18(1_suppl):43S-47S.
- Nys G, Kok MGM, Servais AC, Fillet M. Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications. *TrAC Trends Anal Chem*. 2017;97:326-32.
- Qu Y, Brady K, Apilado R, O'Malley T, Reddy S, Chitkara P, Ibarra C, Alexander RV, Dervieux T. Capillary blood collected on volumetric absorptive microsampling (VAMS) device for monitoring hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;140:334-41.
- Ribatti D, Vacca A. Therapeutic renaissance of thalidomide in the treatment of haematological malignancies. *Leukemia*. 2005;19(9):1525-31.
- Roche S, Sewell L, Meiller J, Pedersen K, Rajpal R, O'Gorman P, Clynes M, O'Connor, R. Development, validation and application of a sensitive LC-MS/MS method for the quantification of thalidomide in human serum, cells and cell culture medium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;902:16-26.
- Samsoen M, Grosshans E, Basset A. [Thalidomide in the treatment of discoid lupus erythematosus (D.L.E.)]. *Ann Dermatol Venereol*. 1980;107(6):515-23.
- Seger C, Salzmann L. After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clin Biochem*. 2020;82:2-11.
- Shipkova M, Svinarov D. LC-MS/MS as a tool for TDM services: Where are we? *Clin Biochem*. 2016;49(13-14):1009-23.
- Shu C, Zeng T, Gao S, Xia T, Huang L, Zhang F, Chen W. LC-MS/MS method for simultaneous determination of thalidomide, lenalidomide, cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone and adriamycin in serum of multiple myeloma patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1028:111-9.
- Silveira LP, Pádua CAM, Drummond PLM, Malta JS, Santos RMM, Costa NL, Machado, TRL, Hauck LM, Reis AMM. Adherence to thalidomide in patients with multiple myeloma: A cross-sectional study in a Brazilian metropolis. *J Oncol Pharm Pract*. 2022;28(2):373-80.
- Singhal S, Inghal S, Ayesh J, Ehta M, Aman R, Esikan D, Yers AA, Aula P, Oberson R, Aul P, Ddlemon E, Unshi IM, Lias E, Naissie A, Ilson AW, Adhav M, Hodapkar D, Erome J, Eldis Z, Arlogie AB. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1565-71.
- Soares R, Singh AK, Kedor-Hackmann ERM, Santoro MIRM. Determination of atropine enantiomers in ophthalmic solutions by liquid chromatography using a Chiral AGP® column. *J AOAC Int*. 2009;92(6):1663-72.

Stevens RJ, Andujar C, Edwards CJ, Ames PRJ, Barwick AR, Khamashta MA, Hughes GRV. Thalidomide in the treatment of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus: Experience in sixteen consecutive patients. *Br J Rheumatol*. 1997;36(3):353-9.

Teo SK, Chandula RS, Harden JL, Stirling DI, Thomas SD. Sensitive and rapid method for the determination of thalidomide in human plasma and semen using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;767(1):145-51.

Trifonova OP, Maslov DL, Balashova EE, Lokhov PG. Evaluation of dried blood spot sampling for clinical metabolomics: Effects of different papers and sample storage stability. *Metabolites*. 2019;9(11):277.

Uhl K, Cox E, Rogan R, Zeldis JB, Hixon D, Furlong LA, Singer S, Holliman T, Beyer J, Woolever W. Thalidomide use in the US: Experience with pregnancy testing in the S.T.E.P.S.® programme. *Drug Saf*. 2006;29(4):321-9.

Verougstraete N, Stove CP. Volumetric absorptive microsampling as a suitable tool to monitor tyrosine kinase inhibitors. *J Pharm Biomed Anal*. 2022;207:114418.

Wilhelm AJ, den Burger JCG, Swart EL. Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: Progress to date and future directions. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(11):1053.

Yang C, Singh P, Singh H, Le ML, El-Matary W. Systematic review: Thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(11):1079-93.


Yuki EFN, Silva CA, Aikawa NE, Romiti R, Heise CO, Bonfá E, Pasoto SG. Thalidomide and lenalidomide for refractory systemic/cutaneous lupus erythematosus treatment: A narrative review of literature for clinical practice. *J Clin Rheumatol*. 2021a;27(6):248-59.

Yuki EFN, Soares R, Kupa L VK, Heise CO, Aikawa NE, Arnone M, Romiti R, Pedrosa TN, Silva CAA, Bonfa E, Pasoto SG. One-year prospective nerve conduction study of thalidomide neuropathy in lupus erythematosus: Incidence, coasting effect and drug plasma levels. *Lupus*. 2021b;30(6):956-64.

Zhou L, Yang H, Wang J, Liu Y, Xu Y, Xu H, Feng Y, Ge W. The therapeutic potential of antioxidants in chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Evidence from preclinical and clinical studies. *Neurotherapeutics*. 2023;Feb 3. doi: 10.1007/s13311-023-01346-8. (ahead of print).

LINK PARA ARTIGO PUBLICADO

Yuki EFN, Soares R, Kupa LVK, Heise CO, Aikawa NE, Arnone M, Romiti R, Pedrosa TN, Silva CAA, Bonfa E, Pasoto SG. One-year prospective nerve conduction study of thalidomide neuropathy in lupus erythematosus: Incidence, coasting effect and drug plasma levels. *Lupus*. 2021b;30(6):956-64. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203321998433?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub_0pubmed. doi: 10.1177/0961203321998433. PMID: 33657919. [Epub ahead of print].



[Advanced](#)
[User Guide](#)

> *Lupus*. 2021 Mar 3;961203321998433. doi: 10.1177/0961203321998433. Online ahead of print.

One-year prospective nerve conduction study of thalidomide neuropathy in lupus erythematosus: Incidence, coasting effect and drug plasma levels

Emily Figueiredo Neves Yuki¹, Renata Soares², Léonard de Vinci Kanda Kupa², Carlos Otto Heise³, Nadia Emi Aikawa¹, Marcelo Arnone⁴, Ricardo Romiti⁴, Tatiana do Nascimento Pedrosa¹, Clovis Artur Almeida da Silva¹, Eloisa Bonfa¹, Sandra Gofinet Pasoto¹

Affiliations [+ expand](#)

PMID: 33657919 DOI: 10.1177/0961203321998433

Abstract

Background: Few prospective studies in cutaneous and systemic lupus erythematosus (CLE/SLE) assessed thalidomide-induced peripheral neuropathy (TiPN) incidence/reversibility, and most have not excluded confounding causes neither monitored thalidomide plasma levels.

Objectives: To evaluate TiPN incidence/reversibility, coasting effect and its association with thalidomide plasma levels in CLE/SLE.

Methods: One-year prospective study of thalidomide in 20 CLE/SLE patients without pregnancy potential, with normal nerve conduction study (NCS), and excluded other PN causes. Thalidomide levels were determined by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.

Results: Twelve patients (60%) developed TiPN: 33.3% were symptomatic and 66.6% asymptomatic. Half of this latter group developed coasting effect (TiPN symptoms 1-3 months after drug withdrawal). The main predictive factors for TiPN were treatment duration ≥ 6 months ($p = 0.025$) and cumulative dose ($p = 0.023$). No difference in plasma thalidomide levels between patients with/without TiPN was observed ($p = 0.464$). After drug withdrawal, 75% symptomatic TiPN patients improved their symptoms. Seven TiPN patients underwent an additional NCS after drug withdrawal: 42.8% worsened NCS, 14.2% was stable, and 42.8% had improved NCS.

Conclusion: Our data provides novel evidence of coasting effect in half of asymptomatic patients with TiPN. The irreversible nature of this lesion in 25% of TiPN patients reinforces the relevance of early NCS monitoring, and suggests thalidomide use solely as a bridge for other effective therapy for refractory cutaneous lupus patients.

Keywords: Lupus erythematosus; coasting effect; nerve conduction study; peripheral neuropathy; thalidomide; thalidomide plasma level.

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

 [Cite](#)

 [Favorites](#)

SHARE





PAGE NAVIGATION


< [Title & authors](#)

[Abstract](#)


[Similar articles](#)

[LinkOut - more resources](#)

Novellino RS, Chalom MY, Romano P, Ebner PAR, Seraphim JC, Amaral ACS, Duarte NJC, Pedrosa TN, Yuki EFN, Aikawa NE, Pasoto SG, Silva CAA, Carvalho VM, Bonfá E, Kupa LVK. Thalidomide measurement in plasma and dried plasma spot by SPE combined with UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring. *Bioanalysis*. 2022. 14(15):1039-1050. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36125034/>. DOI: 10.4155/bio-2022-0077. PMID: 36125034. [Epub ahead of print]



[Advanced](#)
[User Guide](#)



> *Bioanalysis*. 2022 Aug;14(15):1039-1050. doi: 10.4155/bio-2022-0077. Epub 2022 Sep 20.

Thalidomide measurement in plasma and dried plasma spot by SPE combined with UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring

Renata Soares Novellino ^{1 2}, Marc Yves Chalom ², Paschoalina Romano ^{2 3}, Persio de Almeida Rezende Ebner ^{2 3}, Julia Celestino Seraphim ¹, Ana Carolina Silva do Amaral ¹, Nilo Jose Coelho Duarte ^{2 3}, Tatiana Do Nascimento Pedrosa ¹, Emily Figueiredo Neves Yuki ¹, Nadia Emi Aikawa ¹, Sandra Gofinet Pasoto ¹, Clovis Artur Almeida da Silva ¹, Valdemir Melechco Carvalho ⁴, Eloisa Bonfá ¹, Léonard de Vinci Kanda Kupa ^{1 2}

Affiliations [+ expand](#)

PMID: 36125034 DOI: 10.4155/bio-2022-0077

Abstract

Aims: To validate an SPE-ultra-HPLC-MS/MS method for thalidomide (THD) measurement in dried plasma spot (DPS). **Methods:** Extraction included acetonitrile/water clean-up and online SPE. The LOD, LLOQ, linearity, precision, accuracy, recovery, matrix effect, process efficiency, carryover, stability, drug interference and dilution integrity were assessed. **Results:** The method was linear from 50 to 2000 ng/ml with a LOD of 20 ng/ml and LLOQ of 50 ng/ml. The coefficient of variation for precision was 0.4-7.9% for intra-assay and 1.3-8.9% for interassay, and accuracy was 81.4-97.1%. Adequate matrix effect (100.6-107.0%), recovery (88.7-105.0%) and process efficiency (91.3-109.3%) were registered. DPS was stable for 14 days at room temperature and 45°C, and for 4 months at -80°C. The method was applied to quantify THD in both wet plasma and DPS from patients with cutaneous lupus receiving THD treatment. The difference between THD wet plasma and DPS concentration was <15%. **Conclusion:** The method is suitable to quantify THD in DPS.

Keywords: dried plasma spot; liquid chromatography; mass spectrometry; method validation; thalidomide.

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

[Cite](#)

[Favorites](#)

SHARE



PAGE NAVIGATION

[< Title & authors](#)

[Abstract](#)

[Similar articles](#)

[MeSH terms](#)

[Substances](#)

[Related information](#)

[Grant support](#)

[LinkOut - more](#)