

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JOÃO PAULO BIANCHI XIMENEZ

**Farmacocinética não compartimental e populacional do tamoxifeno
em pacientes em tratamento para o câncer de mama: estudo do
metabolismo, estado hormonal e polimorfismo genético**

RIBEIRÃO PRETO
2018

RESUMO

XIMENEZ, J.P.B. **Farmacocinética não compartimental e populacional do tamoxifeno em pacientes em tratamento para o câncer de mama: estudo do metabolismo, estado hormonal e polimorfismo genético.** 2018. 147f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

O tamoxifeno (TAM) é o tratamento referência para o câncer de mama sensível ao estrogênio. O TAM é metabolizado em aproximadamente 40 metabólitos, sendo o endoxifeno (END) 100 vezes mais potente do que o fármaco inalterado como antiestrogênico nas células mamárias cancerígenas. O presente estudo avalia a influência do estado hormonal (Capítulo 2) e do polimorfismo genético (Capítulo 3) na farmacocinética do TAM e seus metabólitos END, 4-hidroxitamoxifeno (4-HTAM) e N-desmetiltamoxifeno (NDTAM) em pacientes (n=40) em tratamento adjuvante para o câncer de mama com TAM (20 mg/dia) há mais de 80 dias e fenotipadas para o CYP2D6, CYP3A4/5 e P-gp. As amostras seriadas de sangue foram colhidas no intervalo de dose de 24 h de administração do TAM. O TAM e seus metabólitos foram analisados em plasma por LC-MS/MS (Capítulo 1). O método não apresentou efeito matriz e mostrou linearidades para o TAM e END no intervalo de 1-1250 ng/mL, para o 4-HTAM de 0,4-500 ng/mL e para o NDTAM de 2-2500 ng/mL de plasma. Os coeficientes de variação e os erros padrão relativos dos estudos de precisão e exatidão foram inferiores a 15%. No Capítulo 2, as pacientes foram divididas nos grupos pré-menopausa (n=20) e pós-menopausa (n=20) com o objetivo de avaliar a influência do estado hormonal na farmacocinética não compartimental do TAM. As pacientes em pré-menopausa mostraram menores valores (teste t de Student, $p < 0,05$) de C_{SS} para o metabólito ativo END (redução de 135%), para o TAM e para os metabólitos 4-HTAM e NDTAM (redução de 70-80%) quando comparadas às pacientes em pós-menopausa. Além do estado hormonal, a raça branca ou não branca também foi definida como uma variável para os valores de C_{SS} do END, enquanto o peso corporal foi definido como uma variável para os valores de C_{SS} do NDTAM. No Capítulo 3, foi desenvolvido e validado um modelo de farmacocinética populacional preciso e de capacidade preditiva para o TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM, empregando o modelo não linear de efeitos mistos para as 40 pacientes investigadas, com o objetivo de simular pacientes para a avaliação da influência de polimorfismos genéticos. As razões de C_{SS} para o TAM e seus principais metabólitos para as pacientes simuladas (n=100) com fenótipos PM e NM para o CYP2D6 e CYP3A4/5 mostram que o fenótipo PM do CYP2D6 não altera os valores de C_{SS} do TAM, 4-HTAM e NDTAM, mas reduz em aproximadamente 80% os valores de C_{SS} do metabólito ativo END, enquanto o fenótipo PM para o CYP3A4/5 aumenta em cinco vezes os valores de C_{SS} do TAM e reduz em 50% os valores de C_{SS} dos metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM. A variabilidade nas concentrações plasmáticas do metabólito ativo END pode ser inferida como multifatorial considerando que foram observadas concentrações menores que o limiar de 6 ng/mL para todas as pacientes simuladas com fenótipo PM para o CYP2D6 e para 5 entre as 40 pacientes investigadas fenotipadas como NMs ou IMs para o CYP2D6. Logo, o monitoramento das concentrações plasmáticas do END, e não o fenótipo do CYP2D6, pode ser inferido como bom candidato para orientar a estratégia de otimização do regime de dosagem do TAM no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Tamoxifeno. Endoxifeno. Farmacocinética. Câncer de mama. Estado hormonal. Polimorfismo genético.

Introdução Geral

O carcinoma mamário atinge mais de 1,7 milhões de novas mulheres em todo o mundo e resulta em aproximadamente 14% de óbitos por ano. No Brasil são estimados aproximadamente 60 mil novos casos da doença entre os anos de 2018 e 2019 (INCA, 2018).

O carcinoma mamário é dividido nos seguintes subtipos: luminal A, luminal B, HER-2 positivo (HER-2 +) e triplo negativo. Os subtipos luminal A e luminal B são os mais frequentes entre os carcinomas mamários e apresentam alta expressão de receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) (KITTANEH; MONTERO; GLÜCK, 2013; CORNEJO et al., 2014). O tratamento do carcinoma mamário é multidisciplinar com inclusão de cirurgia, radioterapia e/ou tratamento sistêmico (quimioterapia, terapia hormonal ou terapia alvo) (DEN HOLLANDER; SAVAGE; BROWN, 2013; TONG et al., 2018).

O tamoxifeno (TAM) constitui uma terapia hormonal amplamente empregada em pacientes com câncer de mama e com expressão significativa do ER (ER+), agindo como antagonista ER e descrito como modulador seletivo ER (SERM). Há mais de 40 anos é usado no tratamento do câncer de mama metastático e no tratamento do câncer de mama como terapia adjuvante pós operatória. Estudos clínicos reportam que o tratamento pós operatório com TAM durante 5 anos reduz em 39% o risco anual de recidiva da doença (DOWSETT et al., 2015; GOETZ et al., 2018; JUNG; LIM, 2014).

Os moduladores seletivos do ER, como o TAM, exibem efeitos agonistas ou antagonistas do ER dependendo do tecido. Nos tecidos mamários, o TAM exerce atividade antiestrogênica mediada pela inibição competitiva da ligação do 17-beta-estradiol (E2) aos receptores de estrogênio alfa e beta (ER α e ER β), resultando na supressão da atividade de transcrição do ER α e inibição do crescimento e proliferação

de células epiteliais malignas da mama dependentes de estrogênio (MARCATH et al., 2017; WU et al., 2009). No entanto, o TAM atua como um pró-fármaco já que seus metabólitos 4-hidroxitamoxifeno (4-HTAM) e endoxifeno (END) são até 100 vezes mais potentes como antiestrogênicos (JORDAN et al., 1977).

O TAM é eliminado essencialmente por metabolismo dependente de duas principais vias, 4-hidroxilação e N-desmetilação, ambas resultando na formação de metabólitos ativos. A 4-hidroxilação do TAM com formação do 4-HTAM, uma via que contribui com apenas 7% da eliminação do TAM, é dependente do CYP2D6, mas também de outras isoformas, tais como o CYP2C9, CYP3A4, CYP2B6 e 2C19. No entanto, o metabolismo do TAM a N-desmetiltamoxifeno (NDTAM), dependente do CYP3A4 e CYP3A5, contribui com aproximadamente 92% do metabolismo. O NDTAM, um fraco modulador seletivo ER, é sequencialmente oxidado a outros metabólitos, incluindo o END dependente do CYP2D6, o qual é o principal metabólito ativo do TAM (FOX et al., 2016; LIM et al., 2016).

O END é um metabólito ativo mais relevante que o 4-HTAM em termos do bloqueio do receptor ER porque a sua concentração plasmática é 5-10 vezes maior do que aquela observada para o 4-hidroxitamoxifeno (JUNG; LIM, 2014; SALADORES et al., 2015). O TAM e seus metabólitos são inativados por reações de glucuronidação e sulfatação, com preponderância da glucuronidação (75%) (Figura 1) (KLEIN et al., 2013).

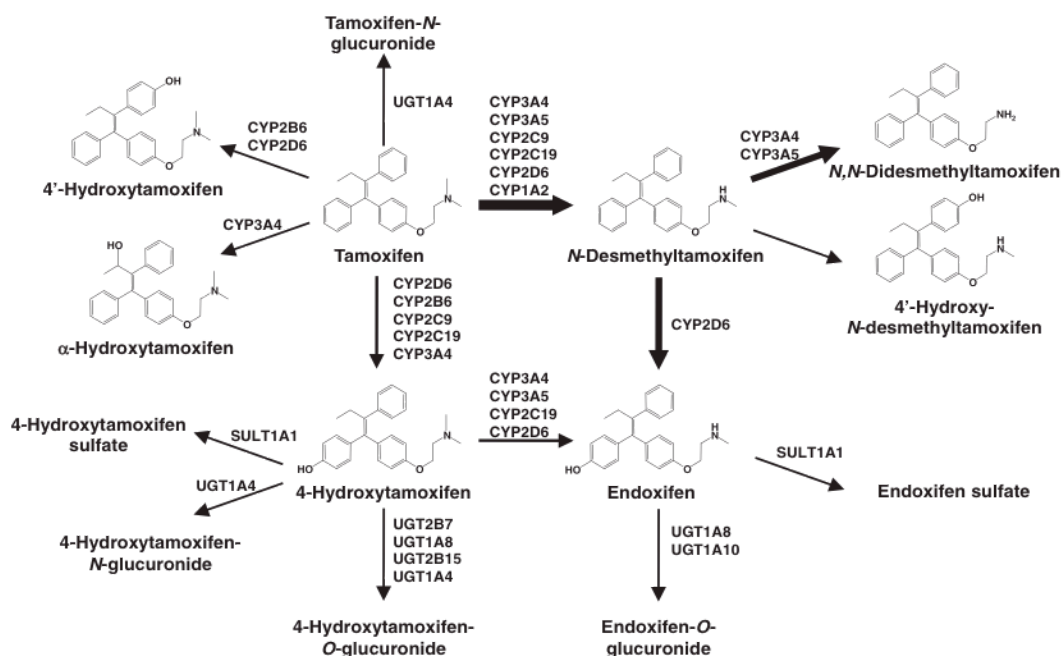


FIGURA 1 - Metabolismo do tamoxifeno. As principais vias metabólicas estão destacadas com setas em negrito. Adaptado de Kiyotani et al. (2013)

Apesar de aproximadamente 70% das pacientes ER-positivo com câncer de mama responderem inicialmente ao tratamento com TAM, aproximadamente 30 a 40% mostram recidiva da doença e, eventualmente, óbito (WESTBROOK; STEARNS, 2013). Entre as possíveis explicações sobre a variabilidade interindividual na eficácia terapêutica do TAM em pacientes tratadas para o câncer de mama, destacam-se a classificação do receptor de estrógeno, as variantes genéticas do *CYP2D6* (PROVINCE et al., 2014), *CYP3A* (TER HEINE et al., 2014) e do transportador *ABCB1* (CHOI; KANG, 2008), o estado hormonal (LIEN; ANKER; UELAND, 1995), a idade (PEYRADE et al., 1996), dentre outras. No entanto, os dados isolados são inconclusivos e dão margem à sugestão de influência multifatorial.

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência do estado hormonal na disposição cinética do TAM e seus metabólitos END, NDTAM e 4-HTAM em pacientes em tratamento adjuvante para o câncer de mama, previamente fenotipadas para o

CYP2D6, CYP3A e P-gp, empregando modelos de farmacocinética não compartimental e populacional.

Para isso o presente estudo foi dividido em três capítulos. O capítulo 1 aborda o desenvolvimento e a validação do método de análise do TAM, e seus metabólitos END, NDTAM e 4-HTAM em plasma com aplicação em estudos de farmacocinética. O capítulo 2 analisa por metodologia não compartimental a farmacocinética do TAM e seus metabólitos em pacientes em tratamento adjuvante para o câncer de mama com TAM 20mg/dia. O capítulo 3 relata a análise farmacocinética populacional do TAM e seus metabólitos na mesma população empregando técnicas de modelagem e simulação por modelo não linear de efeitos mistos.

REFERÊNCIAS

- CHOI, J. S.; KANG, K. W. Enhanced tamoxifen bioavailability after oral administration of tamoxifen in rats pretreated with naringin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 12, p. 1631–1636, nov. 2008.
- CORNEJO, K. M. et al. Theranostic and molecular classification of breast cancer. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 138, n. 1, p. 44–56, jan. 2014.
- DEN HOLLANDER, P.; SAVAGE, M. I.; BROWN, P. H. Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 250, jan. 2013.
- DOWSETT, M. et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. **The Lancet**, v. 386, n. 10001, p. 1341–52, jul. 2015.
- FOX, P. et al. Dose escalation of tamoxifen in patients with low endoxifen level: Evidence for therapeutic drug monitoring - The TADE study. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 13, p. 3164–3171, fev. 2016.
- GOETZ, M. P. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 103, n. 5, p. 770–777, maio 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimate/2018 – Cancer Incidence in Brazil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp>>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- JORDAN, V. C. et al. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. **Journal of Endocrinology**, v. 75, n. 2, p. 305–316, abr. 1977.
- JUNG, J.; LIM, H. Association between CYP2D6 genotypes and the clinical outcomes of adjuvant tamoxifen for breast cancer: a meta-analysis. **Pharmacogenomics**, v. 15, p. 49–60, set 2014.
- KIYOTANI, K. et al. Important and critical scientific aspects in pharmacogenomics analysis: lessons from controversial results of tamoxifen and CYP2D6 studies. **Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 6, p. 327–333, maio 2013.
- KITTANEH, M.; MONTERO, A. J.; GLÜCK, S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. **Biomarkers in cancer**, v. 5, p. 61–70, jan. 2013.
- KLEIN, D. J. et al. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 23, n. 11, p. 643–7, nov. 2013.
- LIEN, E. A.; ANKER, G.; UELAND, P. M. Pharmacokinetics of tamoxifen in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, n. 2, p. 229–231, nov. 1995.

- LIM, J. S. L. et al. Association of CYP2C19*2 and Associated Haplotypes with Lower Norendoxifen Levels in Tamoxifen-treated Asian Breast Cancer Patients. **British journal of clinical pharmacology**, jan. 2016.
- MARCATH, L. A. et al. Comprehensive assessment of cytochromes P450 and transporter genetics with endoxifen concentration during tamoxifen treatment. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 27, n. 11, p. 402–409, ago. 2017.
- PEYRADE, F. et al. Age-related difference in tamoxifen disposition. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 59, n. 4, p. 401–10, abr. 1996.
- PROVINCE, M. A. et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 95, n. 2, p. 216–27, fev. 2014.
- SALADORES, P. et al. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. **The pharmacogenomics journal**, v. 15, n. 1, p. 84–94, fev. 2015.
- TER HEINE, R. et al. Population pharmacokinetic modeling to assess the impact of CYP2D6 and CYP3A metabolic phenotypes on the pharmacokinetics of tamoxifen and endoxifen. **British journal of clinical pharmacology**, p. 1–30, abr. 2014.
- TONG, C. W. S. et al. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 227, jun. 2018.
- WESTBROOK, K.; STEARNS, V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 1, p. 1–11, jul. 2013.
- WU, X. et al. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. **Cancer research**, v. 69, n. 5, p. 1722–7, mar. 2009.

CAPÍTULO I

Análise do tamoxifeno e seus metabólitos em plasma por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas: aplicação em estudo clínico

1 INTRODUÇÃO

O TAM pode ser considerado como um pró-fármaco que é extensamente metabolizado por várias enzimas polimórficas do citocromo P450 (CYP) em seus metabólitos ativos 4-HTAM e END. Resumidamente, o TAM é principalmente oxidado em NDTAM (o metabólito mais abundante no plasma humano) e 4-HTAM predominantemente pelo CYP3A4/5 e CYP2D6, respectivamente, seguido por formação de END a partir NDTAM, exclusivamente catalisada por CYP2D6 e a partir de 4-HTAM pelos CYP3A4/5 (SKAAR; DESTA, 2018).

O primeiro estudo que relata uma relação quantitativa entre as concentrações plasmáticas de END no estado de equilíbrio (C_{SS}) e a resposta farmacológica do TAM foi publicado por Madlensky et al. (2011), no qual os autores reportam que valores de C_{SS} de END iguais ou maiores que 6 ng/mL podem ser associados com redução de 26% do risco de recorrência do câncer de mama no tratamento adjuvante com TAM. Portanto, a C_{SS} do metabólito ativo END representa um importante preditor da eficácia do tratamento com TAM. Logo, qualquer fator que resulte em concentrações plasmáticas reduzidas de END poderia potencialmente comprometer a eficácia do tratamento com TAM. A enzima CYP2D6 é altamente polimórfica, e os polimorfismos que resultam em diminuição da atividade enzimática têm sido associados a desfechos clínicos mais desfavoráveis em pacientes tratadas com TAM (GOETZ et al., 2005; PROVINCE et al., 2014; SCHROTH et al., 2007, 2009).

Neste contexto, vários métodos analíticos foram publicados para o monitoramento do TAM e seus metabólitos em plasma humano, incluindo a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), a eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS) e a cromatografia

líquida com detecção por fluorescência (LC-fluorescência) ou acoplada a espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS).

Os primeiros estudos descritivos sobre métodos de análise do TAM e seus metabólitos em plasma datam da década de 80, e em sua maioria, empregam a cromatografia em fase gasosa (GC-MS) (BÁEZ et al., 2004; MIHAILESCU; ABOUL-ENEIN; EFSTATIDE, 2000; MURPHY et al., 1987a, 1987b). No entanto, a GC-MS não pode ser considerada ideal em função da falta de volatilidade dos referidos compostos e da conseqüente necessidade de introdução de uma etapa prévia de derivatização, um procedimento que aumenta o tempo de análise e reduz a precisão e a exatidão do método analítico.

A cromatografia líquida com detecção por fluorescência (LC-fluorescência) vem sendo usada com sucesso desde a década de 80 para a análise do TAM e seus metabólitos em plasma (CAMAGGI et al., 1983; ETIENNE et al., 1989; HEATH et al., 2014; LIM et al., 1993; MENDENHALL et al., 1978; STEVENSON; BRIGGS; MOULD, 1986; ZHU et al., 2008) em função de sua alta sensibilidade, especificidade e relativo baixo custo. Apesar dos métodos apresentarem um baixo limite de quantificação, os espectros de excitação e emissão do TAM e seus metabólitos são similares, fato que requer separação cromatográfica com boa resolução, resultando em prolongamento do tempo de corrida cromatográfica e inviabilizando a aplicação da metodologia em estudos de farmacocinética clínica que requerem um grande número de análises de amostras biológicas. Recentemente, Heath et al (2014) descreveram a análise do TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM em plasma empregando LC-fluorescência com tempo de corrida cromatográfica de aproximadamente 15 min e com sensibilidade comparável aos métodos que empregam LC-MS/MS. Os referidos autores reportam que a comparação dos métodos LC-fluorescência e LC-MS/MS

resultou em valores concordantes para o TAM, END e NDTAM, no entanto, os resultados para o 4-HTAM não foram concordantes. Ressalta-se ainda que a linearidade do NDTAM (4-250 ng/mL) não é suficiente para analisar as altas concentrações do metabólito em plasma de pacientes em tratamento com TAM 20 mg/dia.

A LC-MS/MS é a técnica atualmente mais empregada na análise do TAM e seus metabólitos em plasma em função da alta sensibilidade e da especificidade da técnica (GJERDE et al., 2005; JAGER et al., 2012; TCHU; LYNCH; WU, 2012; TEUNISSEN et al., 2011a). Nem todos os métodos que empregam LC-MS/MS analisam sequencialmente os principais metabólitos do TAM em amostras de plasma. Por exemplo, Gjerde et al. (2005) não analisam o metabólito ativo END, Tchu et al. (2012) não analisam o metabólito ativo 4-HTAM, enquanto Jager et al. (2012) não analisam o metabólito NDTAM. O método reportado por Teunissen et al. (2011a) analisa o TAM e seus principais metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM em plasma, mas empregam fase móvel com gradiente, um recurso que dificulta a análise de grande número de amostras em função da necessidade de equilíbrio da coluna com a fase móvel inicial a cada amostra.

O presente estudo reporta o desenvolvimento e a validação de um método de análise sequencial do TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM em plasma por LC-MS/MS empregando coluna de fase reversa com fase móvel isocrática. O método foi validado e aplicado na investigação de uma paciente tratada para o câncer de mama em seguimento com TAM 20 mg/dia.

6 CONCLUSÃO

1 - O método desenvolvido e validado de análise sequencial do TAM e seus metabólitos END, NDTAM e 4-HTAM em plasma empregando coluna de fase reversa com fase móvel isocrática e LC-MS/MS apresenta sensibilidade, linearidade, seletividade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudo de farmacocinética clínica do TAM em regime de dose múltipla.

2 - As razões metabólicas de AUC_{τ} para uma paciente em tratamento adjuvante para o câncer de mama com TAM (20 mg/dia), em pós-menopausa, fenotipada como NM para o CYP2D6, foram de 0,27 para TAM/NDTAM, 5,9 para TAM/END e 41,9 para TAM/4-HTAM.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012**, 2012.
- ARELLANO, C. et al. An UPLC-MS/MS method for separation and accurate quantification of tamoxifen and its metabolites isomers. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 100, p. 254–61, nov. 2014.
- BÁEZ, H. et al. Detection of tamoxifen metabolites by GC-MSD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, n. 10, p. 551–553, nov. 2004.
- BINKHORST, L. et al. Quantification of tamoxifen and three of its phase-I metabolites in human plasma by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 5, p. 1016–23, dez. 2011.
- BUZDAR, A. U. et al. Bioequivalence of 20-mg once-daily tamoxifen relative to 10-mg twice-daily tamoxifen regimens for breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 12, n. 1, p. 50–4, jan. 1994.
- CAMAGGI, C. M. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of tamoxifen and major metabolites in human plasma. **Journal of chromatography**, v. 275, n. 2, p. 436–42, jul. 1983.
- DAHMANE, E. et al. An ultra performance liquid chromatography-tandem MS assay for tamoxifen metabolites profiling in plasma: first evidence of 4'-hydroxylated metabolites in breast cancer patients. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 878, n. 32, p. 3402–14, dez. 2010.
- DAHMANE, E. et al. Quantitative monitoring of tamoxifen in human plasma extended to 40 metabolites using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry: new investigation capabilities for clinical pharmacology. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 11, p. 2627–40, abr. 2014.
- DROOGER, J. C. et al. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the quantification of tamoxifen and its main metabolites in human scalp hair. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 114, p. 416–25, out. 2015.
- ETIENNE, M. C. et al. Tamoxifen metabolism: pharmacokinetic and in vitro study. **British journal of cancer**, v. 60, n. 1, p. 30–5, jul. 1989.
- GJERDE, J. et al. Identification and quantification of tamoxifen and four metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1082, n. 1, p. 6–14, jul. 2005.
- GOETZ, M. P. et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9312–8, dez. 2005.

HEATH, D. D. et al. Evaluation of tamoxifen and metabolites by LC-MS/MS and HPLC methods. **British journal of biomedical science**, v. 71, n. 1, p. 33–9, jan. 2014.

JAGER, N. G. L. et al. Importance of highly selective LC-MS/MS analysis for the accurate quantification of tamoxifen and its metabolites: focus on endoxifen and 4-hydroxytamoxifen. **Breast cancer research and treatment**, v. 133, n. 2, p. 793–8, jun. 2012.

LIM, C. K. et al. High performance liquid chromatography of tamoxifen and metabolites in plasma and tissues. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 7, n. 6, p. 311–4, jan. 1993.

MADLENSKY, L. et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 5, p. 718–25, maio 2011.

MENDENHALL, D. W. et al. Clinical analysis of tamoxifen, an anti-neoplastic agent, in plasma. **Clinical Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 1518–1524, set. 1978.

MIHAILESCU, R.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; EFSTATIDE, M. D. Identification of tamoxifen and metabolites in human male urine by GC/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 14, n. 3, p. 180–183, maio 2000.

MURPHY, C. et al. Analysis of tamoxifen and its metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using selected ion monitoring (SIM). **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 547–55, maio 1987a.

MURPHY, C. et al. Analysis of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen levels in cytosol and KCl-nuclear extracts of breast tumours from tamoxifen treated patients by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using selected ion monitoring (SIM). **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 609–618, dez. 1987b.

PROVINCE, M. A. et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 95, n. 2, p. 216–27, fev. 2014.

SCHROTH, W. et al. Breast Cancer Treatment Outcome With Adjuvant Tamoxifen Relative to Patient CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5187–5193, nov. 2007.

SCHROTH, W. et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. **JAMA**, v. 302, n. 13, p. 1429–36, out. 2009.

SKAAR, T. C.; DESTA, Z. CYP2D6 and Endoxifen in Tamoxifen Therapy: A Tribute to David A. Flockhart. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 103, n. 3, p. 755–757, maio 2018.

STEVENSON, D.; BRIGGS, R.; MOULD, G. P. A bioavailability study of two preparations of tamoxifen after single doses. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 4, n. 2, p. 191–6, jan. 1986.

TCHU, S. M.; LYNCH, K. L.; WU, A. H. B. Therapeutic drug monitoring of tamoxifen using LC-MS/MS. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 902, p. 211–22, jan. 2012.

TER HEINE, R. et al. Population pharmacokinetic modeling to assess the impact of CYP2D6 and CYP3A metabolic phenotypes on the pharmacokinetics of tamoxifen and endoxifen. **British journal of clinical pharmacology**, p. 1–30, abr. 2014.

TEUNISSEN, S. F. et al. Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and the flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 877, n. 24, p. 2519–29, ago. 2009.

TEUNISSEN, S. F. et al. Development and validation of a quantitative assay for the determination of tamoxifen and its five main phase I metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 879, n. 19, p. 1677–85, jun. 2011a.

TEUNISSEN, S. F. et al. Investigational study of tamoxifen phase I metabolites using chromatographic and spectroscopic analytical techniques. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 3, p. 518–26, 1 jun. 2011b.

ZHU, Y.-B. et al. Optimizing high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for quantification of tamoxifen and two metabolites in human plasma: application to a clinical study. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 46, n. 2, p. 349–55, jan. 2008.

CAPÍTULO II

**Efeito do estado hormonal na farmacocinética
do tamoxifeno e seus principais metabólitos
em pacientes em tratamento para o câncer de
mama**

1 INTRODUÇÃO

O tamoxifeno (TAM) é usado há mais de 40 anos para tratar o câncer de mama sensível ao estrogênio, seja pré-operatório ou pós-operatório, e é, também, indicado para a prevenção do câncer de mama em mulheres saudáveis com alto risco de desenvolver um câncer invasivo. O TAM, classificado como um modulador seletivo de ER, é um dos agentes terapêuticos endócrinos mais comumente usados no tratamento do câncer de mama positivo para receptores de estrogênio (ER), atuando como um antagonista ou agonista de estrogênio dependendo do tipo do tecido (GOETZ et al., 2018). O tratamento adjuvante com TAM durante 5 anos reduz pela metade o risco anual de recorrência do câncer de mama e reduz em um terço a taxa de mortalidade (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG), 2011).

O efeito do TAM no tratamento do câncer de mama deve-se a seus dois metabólitos ativos: 4-hidroxitamoxifeno (4-HTAM) e endoxifeno (END), que apresentam efeito antiestrogênico 100 vezes maior que o composto original (JORDAN et al., 1977). Uma vez que as concentrações plasmáticas de END excedem as concentrações de 4-HTAM, o END é considerado o metabólito responsável pelo efeito clínico do TAM. Portanto, existe uma preocupação considerável em relação à variabilidade da exposição ao END e conseqüentemente ao resultado do tratamento (MADLENSKY et al., 2011).

O TAM é principalmente metabolizado pelo CYP3A4/5 em N-desmetiltamoxifeno (NDTAM) e é subsequentemente oxidado a END pelo CYP2D6. Como uma via minoritária, o TAM é oxidado pelo CYP2C9 e pelo CYP2D6 em 4-HTAM, que é posteriormente convertido em END pelo CYP3A4/5 (DESTA et al., 2004;

MÜRDTER et al., 2011). O TAM e seus metabólitos oxidados são posteriormente metabolizados por enzimas de fase II, como SULTs e UGTs (KLEIN et al., 2013).

Apesar do envolvimento do CYP2D6 na formação dos metabólitos ativos do TAM, até o momento ainda permanece como inconclusiva se a genotipagem do CYP2D6 contribui na eficácia da terapia com TAM (BERRY, 2013; ZHANG et al., 2015). Os alelos do CYP2D6 *1, *2, *33 e *35 (*wild type*) resultam em fenótipo NM (*normal metabolizer*), já os alelos *3, *4, *5 e *6 (*null alleles*, proteína sem atividade) estabelecem um fenótipo PM (*poor metabolizer*), enquanto os alelos *10, *17 e *41 (proteína com reduzida ação) determinam um fenótipo IM (*intermediate metabolizer*). A duplicação dos alelos *wild type* resulta no fenótipo UM (*ultra-rapid metabolizer*) (HOSKINS; CAREY; MCLEOD, 2009; HERTZ et al., 2015).

O potencial papel da avaliação do genótipo do CYP2D6 em determinar se pacientes com câncer de mama devem receber TAM é controverso. Muitos estudos (GOETZ et al., 2005; PROVINCE et al., 2014; SCHROTH et al., 2007, 2009) mostram que o resultado clínico do tratamento adjuvante com TAM é influenciado pelo genótipo do CYP2D6, uma vez que as pacientes fenotipadas como PMs têm um risco maior de recorrência do câncer de mama em comparação com as fenotipadas como NMs. No entanto, outros ensaios clínicos, incluindo o ATAC (RAE et al., 2012), BIG1-98 (REGAN et al., 2012) e ABCSG8 (GOETZ et al., 2013) exibem dados conflitantes de análises prospectivas de cinco anos de tratamento com TAM na associação entre o fenótipo do CYP2D6 e o desfecho clínico.

Baseado em estudos recentes (GOETZ et al., 2018), espera-se que as pacientes fenotipadas para o CYP2D6 como NMs ou UMs atinjam as concentrações plasmáticas terapêuticas de END após a administração da dose padrão de 20 mg/dia de TAM. No entanto, para as pacientes fenotipadas para o CYP2D6 como IMs e PMs,

a dose de TAM recomendada é de 40 mg/dia. No último caso, também pode ser considerada a possibilidade de um tratamento alternativo, tal qual um inibidor da aromatase (AI) para mulheres na pós-menopausa ou AI juntamente com a supressão da função ovariana em mulheres na pré-menopausa (GOETZ et al., 2018).

Estudos clínicos vem associando as concentrações plasmáticas de END com a eficácia do TAM, uma vez que concentrações plasmáticas de END < 6 ng/mL mostraram-se associadas ao pior resultado clínico em uma coorte com pacientes pré- e pós-menopausa (MADLENSKY et al., 2011) e também em um estudo com inclusão apenas de pacientes na pré-menopausa (SALADORES et al., 2015). Ressalta-se que um estudo *in vitro* mostrou que o END pode bloquear o crescimento de células cancerígenas de mama na presença de altas concentrações de estrogênio, uma situação que simula pacientes na pré-menopausa (MAXIMOV et al., 2014).

Além dos efeitos farmacogenéticos, há especulações sobre a associação entre o estado hormonal das pacientes com câncer de mama e o resultado do tratamento com o TAM. Já que o metabolismo de medicamentos pode estar associado ao estado hormonal (GUSTAVSON; BENET, 1994; HARRIS et al., 1996; NAZIR; IQBAL; NASIR, 2016; SINGH; LICHTMAN, 2015), as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos do TAM, especialmente o END, poderiam ser influenciadas pelo estado hormonal das pacientes.

Em mulheres na pós-menopausa, o TAM e seus metabólitos ocupam quase todos os ERs disponíveis, sugerindo que as variações na exposição ao END teriam pouca função no bloqueio da sinalização de estrogênio (DOWSETT; HAYNES, 2003). No entanto, a exposição ao END pode ser considerada crítica para saturar os ERs em mulheres na pré-menopausa, nas quais o TAM e seus metabólitos ocupam aproximadamente 90 a 95% dos ERs disponíveis (DOWSETT; HAYNES, 2003).

Ressalta-se ainda a importância do transportador de efluxo intestinal P-gp na eficácia do tratamento com TAM, pois embora os metabólitos NDTAM e o 4-HTAM não sejam considerados substratos da P-gp, o fármaco inalterado TAM e o seu principal metabólito ativo END são substratos da P-gp, e portanto o polimorfismo genético e as interações de fármacos podem alterar a atividade da P-gp e consequentemente a eficácia do TAM (TEFT; MANSELL; KIM, 2011). Estudos *in vitro* ainda mostram que o TAM é um modulador dose dependente da P-gp, pois em baixas concentrações (0,02 μM) em células Caco-2 (adenocarcinoma humano) age como indutor, enquanto em altas concentrações (1,6 μM) age como inibidor do transportador. Logo, o TAM é inibidor ou indutor da P-gp dependendo da dose administrada e da sua concentração nos sítios de expressão do transportador (DARVARI et al., 2004). Um estudo posterior em ratos tratados durante 11 dias com TAM (1 mg/kg) mostrou que a atividade da P-gp do miocárdio foi reduzida em 60% do nível basal (DARVARI; BOROUJERDI, 2005).

A P-gp (*Multiple-Drug Resistance* - MDR), pertencente à família ABC (*ATP-binding cassette*), é uma proteína transportadora de efluxo responsável pela resistência ao tratamento com TAM, através do efluxo do medicamento da célula cancerosa. Seu gene *ABCB1* exibe vários SNPs (*single-nucleotide polymorphism*), tais como 2677 G>A, 2677 G>T, 1236 C>T e 3435 C>T, embora sem relatos de associação significativa com a resposta clínica da terapia com TAM (KIYOTANI et al., 2013).

A idade destaca-se como um fator importante na variabilidade da eficácia clínica do TAM. Peyrade et al. (1996) na investigação de pacientes em pós-menopausa (n=247) ou em pré-menopausa (n=59) em tratamento com TAM observaram que aquelas com idade inferior a 40 anos apresentavam menores

concentrações plasmáticas do metabólito ativo END quando comparadas àquelas com idade maior que 80 anos. Os estudos de Lien et al. (2013) e Teft et al. (2013) também reportam que as concentrações plasmáticas do metabólito ativo END aumentam com a idade da pacientes em tratamento com TAM.

O cenário atual aponta para a necessidade de análises farmacocinéticas e farmacogenéticas combinadas em ambos os grupos, pré-menopausa e pós-menopausa, uma vez que muitos dos estudos relataram resultados de apenas um grupo de estado hormonal. Este estudo é realizado com o objetivo de investigar a influência do estado hormonal na farmacocinética do TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência do estado hormonal na farmacocinética do TAM e seus metabólitos (END, 4-HTAM e NDTAM) em pacientes com câncer de mama, genotipadas ou fenotipadas para o CYP2D6, CYP3A e P-gp.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

.3.1. Casuística

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (anexo A) e do HCFMRP (anexo B), respectivamente, nos dias 17 de dezembro de 2014 e 11 de dezembro de 2014. A seleção das pacientes submetidas ao tratamento cirúrgico para o câncer de mama e em regime adjuvante com TAM foi realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da

6 CONCLUSÃO

- 1- O estado hormonal influencia a farmacocinética do TAM e seus metabólitos em pacientes em tratamento adjuvante para o câncer de mama. As pacientes em pré-menopausa exibem menores valores de C_{SS} para o END (redução de 135%), para o TAM e para os metabólitos 4-HTAM e NDTAM (70-80%) quando comparadas às pacientes em pós-menopausa. Além do estado hormonal, a raça branca ou não branca também foi definida como uma variável para os valores de C_{SS} do END, enquanto o peso corporal também foi definido como uma variável para os valores de C_{SS} do NDTAM.
- 2- Os menores valores de AUC_{0-12} da fexofenadina observados para as pacientes do grupo pré-menopausa permitem sugerir que a maior atividade da P-gp intestinal poderia resultar em menor biodisponibilidade do TAM e conseqüentemente explicar os menores valores de C_{SS} do TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM.
- 3- Todas as pacientes investigadas em pós-menopausa em tratamento com TAM (20 mg/dia) apresentaram valores de C_{SS} para o END acima do limiar de referência de 6 ng/mL para a eficácia do tratamento, enquanto 25% das pacientes investigadas em pré-menopausa não atingiram o referido limiar. Portanto, as concentrações plasmáticas de END devem ser monitoradas principalmente na condição pré-menopausa, a fim de manter as concentrações plasmáticas de END acima do valor do limiar de eficácia

REFERÊNCIA

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012**, 2012.
- BEDADA, S. K.; BOGA, P. K. The influence of piperine on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-glycoprotein substrate, in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 343–349, dez. 2017.
- BERRY, D. CYP2D6 genotyping and the use of tamoxifen in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 17, p. 1267–9, set. 2013.
- BOSILKOVSKA, M. et al. Geneva Cocktail for Cytochrome P450 and P-glycoprotein Activity Assessment Using Dried Blood Spots. **Clinical pharmacology and therapeutics**, abr. 2014.
- CHEN, M. L. Ethnic or racial differences revisited: Impact of dosage regimen and dosage form on pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 10, p. 957–964, out. 2006.
- CHOI, J. S.; KANG, K. W. Enhanced tamoxifen bioavailability after oral administration of tamoxifen in rats pretreated with naringin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 12, p. 1631–1636, dez. 2008.
- DARVARI, R. et al. Concentration dependency of modulatory effect of amlodipine on P-glycoprotein efflux activity of doxorubicin – a comparison with tamoxifen **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 985–991, fev. 2004.
- DARVARI, R.; BOROUJERDI, M. Investigation of the influence of modulation of P-glycoprotein by a multiple dosing regimen of tamoxifen on the pharmacokinetics and toxicodynamics of doxorubicin. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 497–509, nov. 2005.
- DESTA, Z. et al. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 310, n. 3, p. 1062–1075, set. 2004.
- DOWSETT, M.; HAYNES, B. P. Hormonal effects of aromatase inhibitors: Focus on premenopausal effects and interaction with tamoxifen. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 255–263, set. 2003.
- DUPONT, W.; JR, W. P. Power and sample size calculations: a review and computer program. **Controlled clinical trials**, v. 11, n. 2, p. 116–28, abr. 1990.
- DUPONT, W.; JR, W. P. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. **Controlled clinical trials**, v. 19, n. 6, p. 589–601, dez. 1998.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 771–784, ago. 2011.

ETIENNE, M. C. et al. Tamoxifen metabolism: pharmacokinetic and in vitro study. **British journal of cancer**, v. 60, n. 1, p. 30–5, jul. 1989.

FRIEDRICH, D. C. et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110691, jan. 2014.

GAEDIGK, A. et al. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 234–42, fev. 2008.

GAEDIGK, A. et al. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 69–76, jan. 2017.

GOETZ, M. P. et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9312–8, 20 dez. 2005.

GOETZ, M. P. et al. CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian breast and colorectal cancer study group trial (ABCSCG) 8. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 2, p. 500–507, jan. 2013.

GOETZ, M. P. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 103, n. 5, p. 770–777, maio 2018.

GUERRIERI-GONZAGA, A. et al. Correlation between tamoxifen elimination and biomarker recovery in a primary prevention trial. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 10, n. 9, p. 967–970, set. 2001.

GUO, D. et al. Measurement of fexofenadine concentration in micro-sample human plasma by a rapid and sensitive LC-MS/MS employing protein precipitation: Application to a clinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 3, p. 335–341, jul. 2010.

GUSTAVSON, L. E.; BENET, L. Z. Menopause: pharmacodynamics and pharmacokinetics. **Experimental gerontology**, v. 29, n. 3–4, p. 437–44, ago. 1994.

HARRIS, R. Z. et al. The effects of menopause and hormone replacement therapies on prednisolone and erythromycin pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 59, n. 4, p. 429–435, abr. 1996.

HERTZ, D. L. et al. In vivo assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. **British journal of clinical pharmacology**, abr. 2015.

HOFFMEYER, S. et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3473–8, mar. 2000.

HOFMANN, U. et al. Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 766, n. 2, p. 227–33, jan. 2002.

HOSKINS, J. M.; CAREY, L. A; MCLEOD, H. L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 8, p. 576–86, ago. 2009.

İŞLEYEN, E. A. Ö. et al. Quantitative Determination of Fexofenadine in Human Plasma by HPLC-MS. **Chromatographia**, v. 66, n. S1, p. 109–113, set. 2007.

JABOR, V. A. P. et al. A highly sensitive LC-MS-MS assay for analysis of midazolam and its major metabolite in human plasma: applications to drug metabolism. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 822, n. 1–2, p. 27–32, ago. 2005.

JIN, Y. et al. CYP2D6 Genotype, Antidepressant Use, and Tamoxifen Metabolism During Adjuvant Breast Cancer Treatment. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 1, p. 30–39, jan. 2005.

JORDAN, V. C. et al. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. **Journal of Endocrinology**, v. 75, n. 2, p. 305–316, nov. 1977.

KIYOTANI, K. et al. Lessons for pharmacogenomics studies: association study between CYP2D6 genotype and tamoxifen response. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n. 9, p. 565–8, set. 2010.

KIYOTANI, K. et al. Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 27, n. 1, p. 122–31, jan. 2012.

KIYOTANI, K. et al. Important and critical scientific aspects in pharmacogenomics analysis: lessons from controversial results of tamoxifen and CYP2D6 studies. **Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 6, p. 327–333, maio 2013.

KLEIN, D. J. et al. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 23, n. 11, p. 643–7, nov. 2013.

LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 10, p. 1271–94, nov. 2002.

LASH, T. L. et al. CYP2D6 inhibition and breast cancer recurrence in a population-based study in Denmark. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 6, p. 489–500, mar. 2011.

LIEN, E. A. et al. Serum concentrations of tamoxifen and its metabolites increase with age during steady-state treatment. **Breast cancer research and treatment**, v. 141, n. 2, p. 243–8, set. 2013.

- LIEN, E. A.; ANKER, G.; UELAND, P. M. Pharmacokinetics of tamoxifen in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, n. 2, p. 229–231, nov. 1995.
- LIEN, E. A.; SOLHEIM, E.; UELAND, P. M. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. **Cancer research**, v. 51, n. 18, p. 4837–44, set. 1991.
- LØNNING, P. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Endocrine Agents Used in Advanced Breast Cancer. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 22, n. 5, p. 327–358, maio 1992.
- MA, J. D. et al. Evaluation of in vivo P-glycoprotein phenotyping probes: a need for validation. **Clinical pharmacokinetics**, v. 49, n. 4, p. 223–37, abr. 2010.
- MACCALLUM, J. et al. Concentrations of tamoxifen and its major metabolites in hormone responsive and resistant breast tumours. **British journal of cancer**, v. 82, n. 10, p. 1629–35, maio 2000.
- MADLENSKY, L. et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 5, p. 718–25, mar. 2011.
- MAXIMOV, P. Y. et al. Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 24, p. 5624–5635, dez. 2014.
- MUPPAVARAPU, R. et al. Sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous determination of montelukast and fexofenadine in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 8, p. 1048–1056, jan. 2014.
- MÜRDTER, T. E. et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 5, p. 708–717, maio 2011.
- NAZIR, S.; IQBAL, Z.; NASIR, F. Impact of Menopause on Pharmacokinetics of Rosuvastatin Compared with Premenopausal Women. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 41, n. 5, p. 505–509, jun. 2016.
- NOWELL, S. A. et al. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 91, n. 3, p. 249–258, jun. 2005.
- PEYRADE, F. et al. Age-related difference in tamoxifen disposition. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 59, n. 4, p. 401–10, abr. 1996.
- Pharmacogene Variation Consortium**. Disponível em: <<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>>. Acesso em: maio. 2018.

PROVINCE, M. A. et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 95, n. 2, p. 216–27, fev. 2014.

RAE, J. M. et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 6, p. 452–460, mar. 2012.

RAMÓN Y CAJAL, T. et al. Impact of CYP2D6 polymorphisms in tamoxifen adjuvant breast cancer treatment. **Breast cancer research and treatment**, v. 119, n. 1, p. 33–8, jan. 2010.

RAO, U. S.; FINE, R. L.; SCARBOROUGH, G. A. Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein. **Biochemical pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 287–92, jul. 1994.

REGAN, M. M. et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 6, p. 441–51, mar. 2012.

SALADORES, P. et al. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. **The pharmacogenomics journal**, v. 15, n. 1, p. 84–94, fev. 2015.

SCHROTH, W. et al. Breast Cancer Treatment Outcome With Adjuvant Tamoxifen Relative to Patient CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5187–5193, nov. 2007.

SCHROTH, W. et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. **JAMA**, v. 302, n. 13, p. 1429–36, out. 2009.

SILVA, F. G. DA. **Influência do Diabetes mellitus e da insuficiência renal crônica em tratamento dialítico na farmacocinética e farmacodinâmica do carvedilol em pacientes hipertensos**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.

SINGH, J. C.; LICHTMAN, S. M. Effect of age on drug metabolism in women with breast cancer. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 757–766, maio 2015.

SOHN, D. R. et al. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. **Therapeutic drug monitoring**, v. 14, n. 3, p. 184–9, jun. 1992.

STEARNS, V. et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 23, p. 1758–64, dez. 2003.

TEFT, W. A. et al. CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. **Breast cancer research and treatment**, v. 139, n. 1, p. 95–105, maio 2013.

TEFT, W. A.; MANSELL, S. E.; KIM, R. B. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 39, n. 3, p. 558–62, mar. 2011.

VANHOVE, T. et al. Fexofenadine, a Putative In Vivo P-glycoprotein Probe, Fails to Predict Clearance of the Substrate Tacrolimus in Renal Recipients. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 102, n. 6, p. 989–996, abr. 2017.

WEGMAN, P. et al. Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. **Breast cancer research : BCR**, v. 7, n. 3, p. R284-90, jun. 2005.

WEGMAN, P. et al. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 9, n. 1, p. R7, fev. 2007.

ZHANG, X. et al. Association of CYP2D6*10, OATP1B1 A388G, and OATP1B1 T521C polymorphisms and overall survival of breast cancer patients after tamoxifen therapy. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 563–9, jan. 2015.

CAPÍTULO III

**Farmacocinética populacional do tamoxifeno e
seus principais metabólitos em pacientes em
tratamento para o câncer de mama**

1 INTRODUÇÃO

A análise de dados farmacocinéticos usando abordagem populacional (PopPK) oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais compartimentais em função do seu potencial de simular algoritmos para a personalização do regime de dosagem de medicamentos para pacientes adultos, crianças ou idosos, portadores de diferentes doenças em diferentes graus de progressão ou ainda em tratamento com medicamentos associados (KÜMMEL et al., 2018).

A análise farmacocinética populacional empregando modelos não lineares de efeitos mistos foi originalmente proposta para ser utilizada em dados oriundos de amostras clínicas rotineiramente coletadas, de forma escassa, dispersa e em população heterogênea. No entanto, estes modelos estão sendo atualmente aplicados em estudos clínicos controlados para gerar informações farmacocinéticas e farmacodinâmicas a partir de amostragens esparsas ou frequentes, em grandes ou pequenas populações e em todas as fases do desenvolvimento de fármacos (DENG; PLAN; KARLSSON, 2016).

A análise farmacocinética populacional quantifica a variabilidade (*random effect*) nos parâmetros farmacocinéticos (*fixed effect*) fazendo uso de modelo não linear de efeitos mistos (*Non Linear Mixed Effects* - NLME), o qual leva em consideração os diferentes tipos de variabilidade (interindividual, intraindividual, interocasiões e residual) para descrever de maneira precisa um indivíduo dentro de uma população (BUIL-BRUNA et al., 2016).

No caso de um modelo PopPK, a variável dependente é a concentração plasmática do medicamento e/ou seus metabólitos, enquanto as variáveis independentes são a dose e o tempo e, possivelmente, a idade e o peso do paciente como covariáveis. A inclusão e quantificação de covariáveis específicas facilita a

compreensão da relação dose-exposição-resposta e ajuda a determinar se a personalização da dose baseada em covariáveis é necessária para normalizar a exposição e minimizar a variabilidade nos resultados terapêuticos ou eventos adversos em uma população (JOERGER, 2012).

Os modelos farmacocinéticos podem ser usados para explicar, com bom nível de precisão, as alterações na relação dose-exposição-resposta em diferentes cenários. As simulações usam as informações do modelo de farmacocinética populacional visando prever com razoável precisão o que acontecerá com a relação dose-exposição-resposta para um mesmo paciente ou diferentes pacientes em diferentes condições clínicas (HARNISCH et al., 2013; OLIVIER; SWAT; MONÉ, 2016).

O TAM é um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), atuando como anti-estrogênio em células de câncer de mama e bloqueando a expressão gênica mediada por estrogênio, resultando na inibição do crescimento do tumor. É importante ressaltar que o TAM pode ser considerado como um pró-fármaco bioativado para os metabólitos END e 4-HTAM (concentração inibitória mínima, respectivamente, 3 e 7 nmol/L), os quais são antagonistas do ER mais potentes que o fármaco inalterado (concentração inibitória mínima 250 nmol/L). Como o END excede em dez vezes as concentrações plasmáticas de 4-HTAM, as pesquisas atuais focam o END como primordial na eficácia do TAM (KLOPP-SCHULZE et al., 2017).

Várias enzimas CYP estão envolvidas no extenso metabolismo do TAM a aproximadamente 40 metabólitos (DAHMANE et al., 2014). O metabólito ativo END é predominantemente formado pelo CYP2D6 e CYP3A. Parte das variabilidades interindividual e intrarindividual na exposição ao END pode ser explicada por variações genéticas do CYP2D6 e pela alta variabilidade do CYP3A também

dependente de variações genéticas e de fatores ambientais (GOETZ et al., 2018; SALADORES et al., 2015; TER HEINE et al., 2014).

A literatura disponível cita apenas um modelo PopPK para o TAM e seu principal metabólito END em pacientes em tratamento para o câncer de mama (TER HEINE et al., 2014). No referido estudo, os autores identificaram as atividades dos CYP2D6 e CYP3A4/5 como covariáveis na farmacocinética do TAM e do END, fornecendo uma estrutura para quantificar e explicar as fontes de variabilidade do modelo. Porém, os citados autores não analisaram os metabólitos NDTAM e o 4-HTAM, precursores do metabólito ativo END.

O presente estudo propõe o desenvolvimento de um modelo de farmacocinética populacional do TAM e seus metabólitos NDTAM, 4-HTAM e END em pacientes em tratamento adjuvante com TAM para o câncer de mama, empregando modelo não linear de efeitos mistos. As concentrações plasmáticas do TAM e seus metabólitos NDTAM, 4-HTAM e END, assim como os demais dados das pacientes como genótipo e fenótipo, são oriundos da Casuística e Resultados descritos no Capítulo 2.

2 OBJETIVOS

Desenvolver o modelo de farmacocinética populacional do TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM em pacientes em tratamento para o câncer de mama, empregando modelo não linear de efeitos mistos, empregando o programa NONMEN (*Non-linear mixed effect level*).

6 CONCLUSÃO

- 1- O modelo de farmacocinética populacional para o TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM em pacientes em tratamento adjuvante com TAM (20 mg/dia) para o câncer de mama, empregando modelo não linear de efeitos mistos, é preciso e possui capacidade preditiva adequada.
- 2- As razões de C_{ss} para o TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM para as pacientes simuladas (n=100) com fenótipos PM e NM para o CYP2D6 mostram que a atividade do CYP2D6 não altera os valores de C_{ss} do TAM, 4-HTAM e NDTAM, mas reduz em aproximadamente 80% os valores de C_{ss} do metabólito ativo END. Assim, todas as pacientes simuladas com fenótipo PM para o CYP2D6 apresentam concentrações plasmáticas do metabólito ativo END menores que 6 ng/mL.
- 3- As razões de C_{ss} para o TAM e seus metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM para as pacientes simuladas (n=100) com fenótipos PM e NM para o CYP3A4/5 mostram que o fenótipo PM aumenta em cinco vezes os valores de C_{ss} do TAM e reduz em 50% os valores de C_{ss} dos metabólitos END, 4-HTAM e NDTAM. No entanto, todas as pacientes simuladas com fenótipo PM para o CYP3A4/5 apresentam concentrações plasmáticas do metabólito ativo END maiores que 6 ng/mL.
- 4- Das 40 pacientes investigadas, fenotipadas como NMs ou IMs para o CYP2D6, 5 pacientes mostraram concentrações plasmáticas do metabólito ativo END

menores que 6 ng/mL, inferindo que a variabilidade nas concentrações plasmáticas do metabólito ativo END é multifatorial.

- 5- O monitoramento das concentrações plasmáticas do END é um bom candidato para orientar a estratégia de otimização do regime de dosagem do TAM.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A et al. Endoxifen, a new cornerstone of breast cancer therapy: demonstration of safety, tolerability, and systemic bioavailability in healthy human subjects. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 88, n. 6, p. 814–7, dez. 2010.
- ASTRAZENECA. **NOLVADEX: Summary of Paediatric Data Submitted to the FDA; Paediatric Working Group**. 2005. Disponível em: <<http://www.mhra.gov.uk/home/groups/plp/documents/websiteresources/con009660.pdf>>. Acesso em: fev. 2017
- BUIL-BRUNA, N. et al. Bringing Model-Based Prediction to Oncology Clinical Practice: A Review of Pharmacometrics Principles and Applications. **The Oncologist**, v. 21, n. 2, p. 220–232, fev. 2016.
- DAHMANE, E. et al. Quantitative monitoring of tamoxifen in human plasma extended to 40 metabolites using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry: new investigation capabilities for clinical pharmacology. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 11, p. 2627–40, abr. 2014.
- DENG, C.; PLAN, E. L.; KARLSSON, M. O. Approaches for modeling within subject variability in pharmacometric count data analysis: dynamic inter-occasion variability and stochastic differential equations. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 43, n. 3, p. 305–314, jun. 2016.
- DESTA, Z. et al. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 310, n. 3, p. 1062–1075, set. 2004.
- DICKSCHEN, K. et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of tamoxifen and its metabolites in women of different CYP2D6 phenotypes provides new insight into the tamoxifen mass balance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 MAY, n. May, p. 1–15, maio 2012.
- ETIENNE, M. C. et al. Tamoxifen metabolism: pharmacokinetic and in vitro study. **British journal of cancer**, v. 60, n. 1, p. 30–5, jul. 1989.
- GOETZ, M. P. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 103, n. 5, p. 770–777, maio 2018.
- HARNISCH, L. et al. Modeling and simulation as a tool to bridge efficacy and safety data in special populations. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, v. 2, n. November 2012, p. e28, fev 2013.
- JERLING, M. et al. Population pharmacokinetics of nortriptyline during monotherapy and during concomitant treatment with drugs that inhibit CYP2D6-an evaluation with the nonparametric maximum likelihood method. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 453–462, nov. 1994.

JOERGER, M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. **The AAPS journal**, v. 14, n. 1, p. 119–32, mar. 2012.

KLOPP-SCHULZE, L. et al. Exploiting Pharmacokinetic Models of Tamoxifen and Endoxifen to Identify Factors Causing Subtherapeutic Concentrations in Breast Cancer Patients. **Clinical Pharmacokinetics**, p. 1–14, 24 maio 2017.

KÜMMEL, A. et al. Confidence and Prediction Intervals for Pharmacometric Models. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 7, n. 6, p. 360–373, jun. 2018.

LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 10, p. 1271–94, nov. 2002.

LIEN, E. A. et al. Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. **Cancer research**, v. 49, n. 8, p. 2175–83, abr. 1989.

MADLENSKY, L. et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 5, p. 718–25, maio 2011.

MÜRDTER, T. E. et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 89, n. 5, p. 708–17, maio 2011.

OLIVIER, B. G.; SWAT, M. J.; MONÉ, M. J. Modeling and Simulation Tools: From Systems Biology to Systems Medicine. **Methods in molecular biology**, v. 1386p. 441–463, nov. 2016.

REGAN, M. M. et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 6, p. 441–51, mar. 2012.

SALADORES, P. et al. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. **The pharmacogenomics journal**, v. 15, n. 1, p. 84–94, fev. 2015.

SOHN, D. R. et al. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. **Therapeutic drug monitoring**, v. 14, n. 3, p. 184–9, jun. 1992.

TER HEINE, R. et al. Population pharmacokinetic modeling to assess the impact of CYP2D6 and CYP3A metabolic phenotypes on the pharmacokinetics of tamoxifen and endoxifen. **British journal of clinical pharmacology**, p. 1–30, abr. 2014.

WU, A. H. B. et al. Estimation of tamoxifen metabolite concentrations in the blood of breast cancer patients through CYP2D6 genotype activity score. **Breast cancer research and treatment**, v. 133, n. 2, p. 677–83, jun. 2012.

XIMENEZ, J. P. B. Farmacocinética não compartimental e populacional do tamoxifeno em pacientes em tratamento para o câncer de mama: **estudo do metabolismo, estado hormonal e polimorfismo genético.**2018. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

ERRATA

Folha	Parágrafo/linha	Onde se lê	Leia-se
40	3/3	Tabela 10	Tabela 6
58	1/1	Figura 2	Figura 10
58	3/11	Quadro 1	Quadro 2