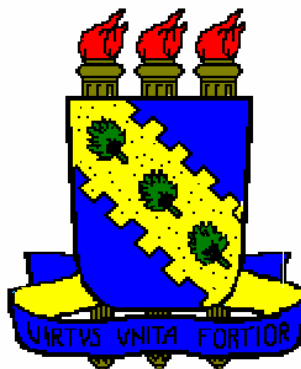




UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

GILMARA SILVA DE MELO SANTANA

**ESTUDO DA FENOTIPAGEM DE QUATRO ENZIMAS METABOLIZADORAS DE
FÁRMACOS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ**

FORTALEZA

2004

GILMARA SILVA DE MELO SANTANA

**ESTUDO DA FENOTIPAGEM DE QUATRO ENZIMAS
METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO
DO ESTADO DO CEARÁ**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

FORTALEZA

2004

GILMARA SILVA DE MELO SANTANA

**ESTUDO DA FENOTIPAGEM DE QUATRO ENZIMAS
METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO
DO ESTADO DO CEARÁ**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 30 de Janeiro de 2004

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. François Germain Noel
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Universidade Federal do Ceará - UFC

*A Deus, meu Senhor, por haver me criado,
ter me dado à oportunidade de aprender
aquilo que hoje sei e lembrar-me a cada dia
que ainda preciso ser uma pessoa melhor*

Ao meu marido Samuel por estar sempre ao meu lado e dividir comigo alegrias e tristezas. Perdão meu amor, pelas ausências, que tão carinhosamente suportastes durante todos estes anos.

*Ao meu filho Felipe. Tua existência me
ensinou a reavaliar muito dos meus valores.
Amo-te Filho*

*Aos meus pais Eliane e Toni por acreditarem
em mim e nunca se negarem a segurar as
pontas para nos ajudar. Amo muito vocês*

A Tita, Dinho e Beca meus queridos irmãos.

*Aos verdadeiros Amigos que passaram e
permanecem em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, minha orientadora, pelos sete anos de convivência, onde pude compartilhar de seus conhecimentos científicos e de sua amizade. Tenha sempre certeza de que a senhora contribuiu muito para que eu chegasse aonde cheguei.

Ao Dr Manoel Odorico de Moraes por acreditar no meu potencial, pelo exemplo, incentivo constante e pela doação de seus conhecimentos.

Ao Dr Fernando Antônio Frota Bezerra por sua inestimável ajuda na avaliação clínica dos nossos voluntários, bem como pelo respeito e amizade.

Ao Professor Dr Gilberto De Nucci por compartilhar suas idéias e despertar em mim o interesse pela fenotipagem de nossos voluntários. Serei sempre uma admiradora tanto dos seus conhecimentos científicos como da sua simplicidade como ser humano.

À Profa. Dra. Geanne Mattos de Andrade Cunha pelo apoio na validação das metodologias analíticas.

À Maria Tereza Rocha pelo carinho e incentivo durante todo a minha pós-graduação.

Aos amigos Francisco Evanir Gonçalves de Lima O e Adriano Nunes Cunha do laboratório analítico por dividir comigo seus conhecimentos práticos e teóricos no manuseio do HPLC.

Ao Dr René Fumeaux do Centro de Pesquisa da Nestlé (Lausanne – Suíça) que gentilmente nos cedeu o padrão do AFMU, sem o qual nossa etapa analítica não poderia acontecer.

Aos amigos estudantes da Unidade de Farmacologia Clínica: Luciana Bessa, Raquel, Suellen, Demétrius, Ismael, Giovanni, Ismênia, Marne, Fabrine e Aline pela amizade e carinho que construímos durante todo este período. Vocês moram no meu coração.

Aos amigos da Pós-Graduação e a todos que fazem o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Aos amigos da Igreja Cristã Evangélica Betel pelo carinho e apoio.

Aos voluntários da cafeína e demais voluntários da Unidade de Farmacologia Clínica, sem os quais seria impossível realizar esta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram contribuir com nosso trabalho, mesmo durante suas férias.

Ao Instituto Claude Bernard, à Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*Senhor! Oxalá que me abençoes muito e me alargues as fronteiras; que
seja comigo a tua mão e me preserves do mal; de modo que não me
sobrevenha mal algum!*
I Crônicas 4:9, 10.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	X
EPÍGRAFE	XII
ÍNDICE	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE FIGURAS	XIX
RESUMO	XXIII
ABSTRACT	XXV
INTRODUÇÃO	2
1 METABOLISMO DOS FÁRMACOS.....	3
1.1 REAÇÕES FASE I	4
1.1.1 <i>Oxidação</i>	5
1.1.1.1 Famílias do Citocromo P450	6
1.1.2 <i>Hidrólise</i>	8
1.1.3 <i>Redução</i>	9
1.2 REAÇÕES DA FASE II	9
1.2.1 <i>Glicuronidação</i>	9
1.2.2 <i>Acetilação</i>	10
1.2.3 <i>Metilação</i>	11
2 FARMACOGENÉTICA	11
2.1 POLIMORFISMO.....	12
2.1.1 <i>Polimorfismo de Acetilação</i>	14
2.1.2 <i>Polimorfismo de Oxidação</i>	15
2.1.3 <i>Polimorfismo na Hidrólise do Álcool</i>	18
2.2 MODELOS HEREDITÁRIOS.....	19
2.3 CONSEQÜÊNCIAS FARMACOLÓGICAS.....	20
2.3.1 <i>Conseqüências Farmacodinâmicas</i>	21
2.3.2 <i>Conseqüências Farmacocinéticas</i>	22
2.4 VARIAÇÕES ÉTNICAS.....	23
2.5 IMPACTO DA FARMACOGENÉTICA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	23
2.6 TÉCNICAS USADAS PARA AVALIAÇÃO DA FARMACOGENÉTICA	25
2.7 MEDICAMENTOS USADOS COMO FERRAMENTA FARMACOLÓGICA – “PROBE”	26
3 CAFEÍNA.....	27
3.1 FARMACOLOGIA	27
3.2 FARMACOLOGIA CLÍNICA	27

3.2.1	<i>Farmacocinética</i>	28
3.2.2	<i>Metabolismo</i>	29
3.3	TOXICOLOGIA	31
3.4	REAÇÕES ADVERSAS	31
3.4.1	<i>Efeitos Potencialmente Danosos à Vida</i>	31
3.4.2	<i>Overdose Aguda</i>	32
3.4.3	<i>Efeitos Adversos, Severos ou Irreversíveis</i>	32
3.4.4	<i>Efeitos Adversos Sintomáticos</i>	32
3.5	CAFEÍNA COMO FÁRMACO “PROBE”	32
4	JUSTIFICATIVA	33
	OBJETIVOS	36
1	GERAIS:	36
2	EPECÍFICOS	36
	MATERIAL	38
1	ETAPA CLÍNICA	38
2	ETAPA ANALÍTICA	39
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
	METODOLOGIA	43
1	ETAPA CLÍNICA – PROTOCOLO EXPERIMENTAL	43
1.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	43
1.2	SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS	43
1.3	EXAMES LABORATORIAIS	43
1.3.1	<i>Valores de referência dos exames laboratoriais</i>	44
1.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	44
1.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	44
1.6	CRITÉRIOS PARA RETIRADA DO ESTUDO	45
1.7	INTERNAMENTO	45
1.7.1	<i>Horários de jejum e de Alimentação:</i>	46
1.8	POSOLOGIA:	46
1.9	COLETA DE SANGUE	46
1.10	COLETA DE URINA	46
1.11	EFEITOS ADVERSOS	47
1.11.1	<i>Definições de efeitos adversos quanto à intensidade</i>	47
1.11.2	<i>Relacionamento suposto com a droga experimental</i>	47
1.12	ASPECTOS ÉTICOS	48
1.12.1	<i>Comitê de Ética</i>	48
1.12.2	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	48

1.12.3	Confidencialidade	49
2	ETAPA ANALÍTICA – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS METABÓLITOS.....	50
2.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS	50
2.1.1	Preparação de soluções padrão e reagentes.....	50
2.1.2	Preparação das amostras da curva de calibração.....	51
2.1.3	Extração das amostras de urina.....	52
2.1.4	Recuperação.....	52
2.1.5	Condições Cromatográficas.....	53
2.1.6	Precisão e Acurácia	53
2.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CYP1A2, NAT2, CYP2A6 E XO.....	54
2.3	AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP1A2, NAT2, CYP2A6 E XO.....	54
2.4	CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS VOLUNTÁRIOS	54
3	ETAPA ANALÍTICA – DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS.....	55
3.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA	55
3.1.1	Preparação de soluções padrão e reagentes.....	55
3.1.2	Preparação das amostras da curva de calibração.....	56
3.1.3	Extração das amostras de plasma.....	56
3.1.4	Recuperação.....	57
3.1.5	Condições Cromatográficas.....	57
3.1.6	Precisão e Acurácia	58
3.2	PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DETERMINADOS.....	58
4	COMPARAÇÃO COM OUTRO ESTUDO FARMACOCINÉTICO	59
4.1	ESCOLHA DO FÁRMACO	59
4.2	METODOLOGIA DE COMPARAÇÃO.....	59
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
	RESULTADOS.....	62
1	DADOS CLÍNICOS	62
1.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	62
1.1.1	Exame Cardiológico.....	62
1.1.2	Eventos Adversos.....	62
1.1.3	Exames de Patologia Clínica	63
2	DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS METABÓLITOS.....	66
2.1	MÉTODO ANALÍTICO	66
2.1.1	Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos metabólitos da cafeína (1U – 1-metilúrico; 17U – 1,7-dimetilúrico; 1X – metilxantina; 17X – 1,7-dimetilxantina e AFMU – 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil).....	66

2.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CYP1A2, NAT2, CYP2A6 E XO.....	71
2.3	AValiação DOS FENÓTIPOS DAS ENZIMAS ESTUDADAS	72
2.3.1	CYP1A2.....	72
2.3.2	CYP2A6.....	74
2.3.3	NAT2	76
2.3.4	XO	78
2.4	CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS VOLUNTÁRIOS	80
3	DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS.....	81
3.1	MÉTODO ANALÍTICO	81
3.1.1	<i>Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da cafeína no plasma.</i>	81
3.2	DETERMINAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DOS GRUPOS DE VOLUNTÁRIOS SELECIONADOS.....	83
3.2.1	<i>Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima CYP1A2</i>	83
3.2.2	<i>Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima NAT2.....</i>	85
3.2.3	<i>Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima XO.....</i>	88
3.2.4	<i>Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima CYP2A6</i>	90
4	COMPARAÇÃO COM OUTRO ESTUDO FARMACOCINÉTICO	92
4.1	AValiação DA DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS ASC DO PROPRANOLOL	92
	DISCUSSÃO	95
	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	GLOSSÁRIO	121
	ANEXO 1 - VALORES DE REFERÊNCIA DOS EXAMES LABORATORIAIS.	124
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	126
	ANEXO 3 - VALORES INDIVIDUAIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	128
	ANEXO 4 - ABREVIATURAS DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	131
	ANEXO 5 - DADOS FARMACOCINÉTICOS DOS VOLUNTÁRIOS	132
	ANEXO 6 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	164
	ANEXO 7 – OUTRAS PUBLICAÇÕES NO PERÍODO DO DOUTORADO.....	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Material utilizado na etapa clínica (incluindo: seleção, internamento e coleta de amostras de urina de 80 voluntários).....	38
Tabela 2 – Medicamento administrado na etapa clínica.....	39
Tabela 3- Equipamentos utilizados na etapa clínica.....	39
Tabela 4- Material utilizado na etapa analítica.....	40
Tabela 5- Equipamentos utilizados na etapa analítica.....	40
Tabela 6 - Componentes do HPLC Shimadzu.....	41
Tabela 7 - Padrões utilizados na etapa analítica.	41
Tabela 8 - Reagentes utilizados na etapa analítica.	42
Tabela 9 - Amostras biológicas utilizadas para quantificação analítica.....	42
Tabela 10. Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros hematológicos dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).	63
Tabela 11. Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros de função hepática dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).	64
Tabela 12- Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros de função renal dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).	65
Tabela 13- Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros de função metabólica dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).	65
Tabela 14 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 1U em urina por HPLC na faixa de concentração de 0,5 a 16µg/mL.	68
Tabela 15 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do AFMU em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.....	68
Tabela 16- Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 1X em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.	69

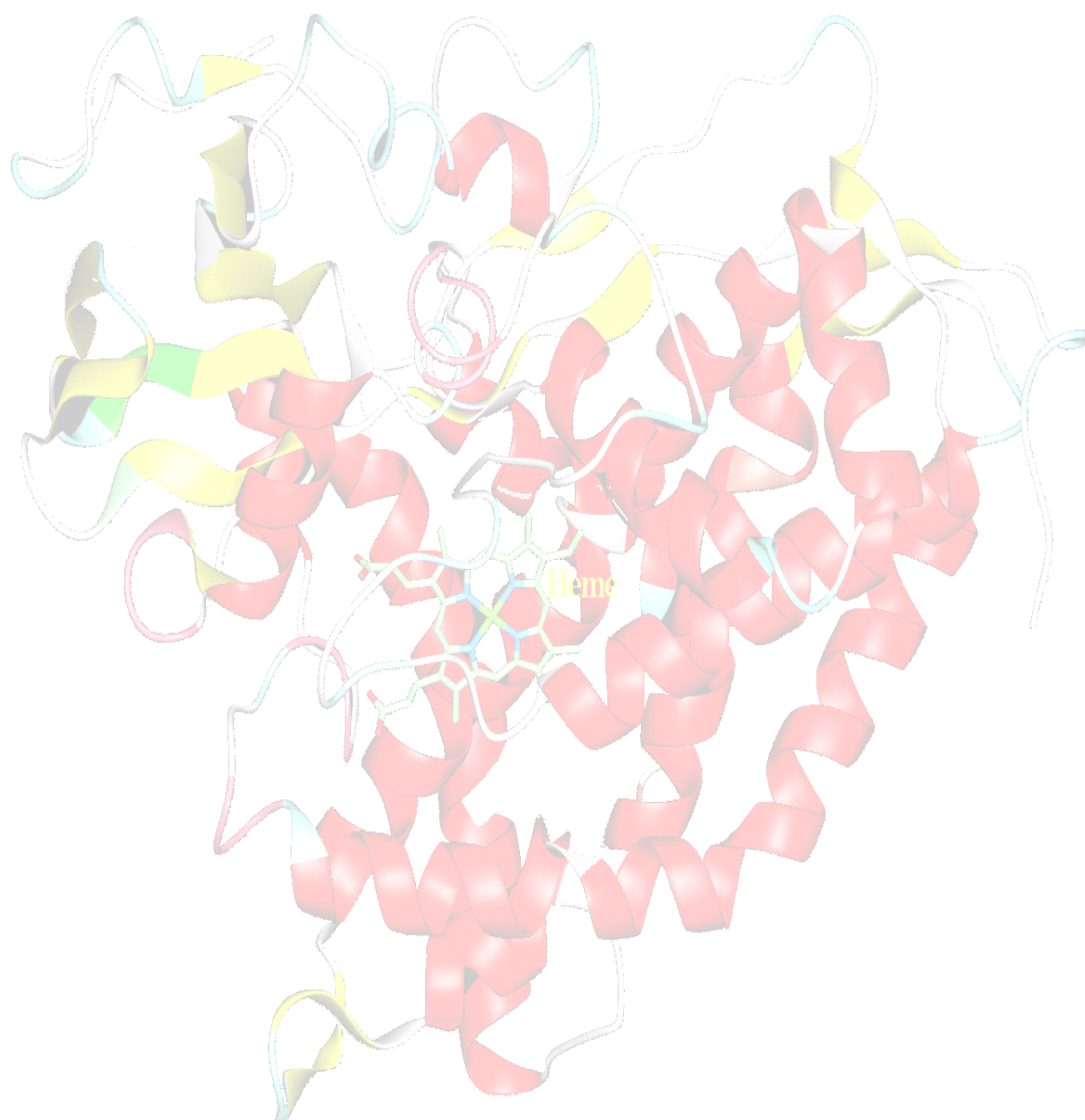
Tabela 17. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 17U em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.	70
Tabela 18 -Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 17X em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.	70
Tabela 19 – Média e Desvio padrão das atividades das enzimas CYP1A2 e CYP2A6 dos 79 voluntários.	71
Tabela 20 – Média e Desvio padrão das atividades das enzimas NAT2 e Xantina Oxidase dos 79 voluntários.	72
Tabela 21 - Relação dos voluntários classificados em cada grupo, de acordo com a atividade enzimática.	80
Tabela 22 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação da cafeína no plasma humano por HPLC na faixa de concentração de 0,5 e 8µg/mL.	82
Tabela 23 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8).	84
Tabela 24 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos NAT2-MA e NAT2-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8).	87
Tabela 25 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos XO-MA e XO-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8).	89
Tabela 26 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8).	91
Tabela 27- Valores de referência para a Análise Hematológica	124
Tabela 28 - Valores de referência para função hepática.....	124
Tabela 29 - Valores de referência para função hepática.....	125
Tabela 30 – Valores de referencia para função Renal	125
Tabela 31 - Valores individuais de atividade das enzimas CYP1A2, NAT2, XO e CYP2A6 dos 79 voluntários avaliados, a partir das razões entre os metabólitos da cafeína avaliados (AFMU, 1U, 1X, 17U, 17X). $CYP1A2 = (AFMU + 1X + 1U) / 17U$; $CYP2A6 = 17U / (AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U)$; $NAT2 = AFMU / (AFMU + 1X + 1U)$ e $XO = 1U / (1X + 1U)$	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura bioquímica da família de enzimas do citocromo P450; onde as helix estão representadas em vermelho e o grupo heme em verde. Fonte: www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/proLig/pdbEntries/1pha/index.gif	7
Figura 2. Via metabólica de desmetilação da cafeína, mostrando a retirada do radical metil nas posições 1, 3 e 7 que formarão a teobromina (37X), paraxantina (17X) e teofilina (13X), respectivamente	30
Figura 3. Vias de cascata metabólica da cafeína, mostrando as principais enzimas envolvidas no metabolismo e os principais metabólitos.....	30
Figura 4 - Cromatograma da urina repicada com os metabólitos: AFMU, 1U, 1X, 17U, 17X; e o padrão interno: Teobromina, após a extração com clorofórmio e isopropanol (4:1), mostrando o grau de separação entre as substâncias analisadas.....	66
Figura 5 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 1U em urina por HPLC na faixa de concentração entre 0,5 e 16µg/mL.....	67
Figura 6 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de AFMU em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32µg/mL.	68
Figura 7 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 1X em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32µg/mL.....	69
Figura 8 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 17U em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32µg/mL.....	69
Figura 9 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 17X em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32µg/mL.....	70
Figura 10 - Histograma dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. A curva indica a distribuição normal esperada.....	73
Figura 11 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais.....	73
Figura 12 - Gráfico da análise pelo teste Q-Q dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal.....	74
Figura 13- Histograma dos valores de atividade da enzima CYP2A6 de 81 voluntários A curva indica a distribuição normal esperada.....	75

- Figura 14 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais..... 75
- Figura 15 - Gráfico da análise pelo teste Q-Q dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal..... 76
- Figura 16 - Histograma dos valores de atividade da enzima NAT2 de oitenta e um voluntários. A curva indica a distribuição normal esperada..... 77
- Figura 17 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima NAT2 de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais..... 77
- Figura 18 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima NAT2 de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal. 78
- Figura 19 - Histograma dos valores de atividade da enzima XO de oitenta e um voluntários. A curva indica a distribuição normal esperada..... 78
- Figura 20 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima XO de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais..... 79
- Figura 21 - Gráfico da análise pelo teste Q-Q dos valores de atividade da enzima XO de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal..... 79
- Figura 22 - Cromatograma referente à amostra de plasma branco, de voluntários sadios, repicado com cafeína e o padrão interno: Teobromina, após a extração com clorofórmio e isopropanol (4:1), mostrando o grau de separação entre as substâncias analisadas..... 81
- Figura 23 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de cafeína no plasma humano por HPLC na faixa de concentração entre 0,5 e 8µg/mL..... 82
- Figura 24 - Curvas de concentrações plasmáticas (µg/mL) *versus* tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo CYP1A2-MA e CYP1A2-ME (n = 8 em cada grupo). 85
- Figura 25 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) *versus* tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo NAT2-MA e NAT2-ME (n = 8 em cada grupo). 87

- Figura 26 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) *versus* tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo XO-MA e XO-ME (n = 8 em cada grupo). 89
- Figura 27 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) *versus* tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo CYP2A6-MA e CYP2A6-ME (n = 8 em cada grupo). 92
- Figura 28 – Histograma da distribuição de frequência das ASC_{0-t} de 48 voluntários após a administração de um comprimido de 40mg de propranolol. A curva demonstra a distribuição normal esperada. 92
- Figura 29 - Gráfico da análise pelo teste Quantil- Quantil (Q-Q) dos valores de ASC do Propranolol de 48 voluntários, após uma dose única de 40mg. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os valores individuais de ASC. 93
- Figura 30 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de ASC do Propranolol de 48 voluntários, aos uma dose única de 40mg. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal. 93



Resumo

RESUMO

ESTUDO DA FENOTIPAGEM DE QUATRO ENZIMAS METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ.

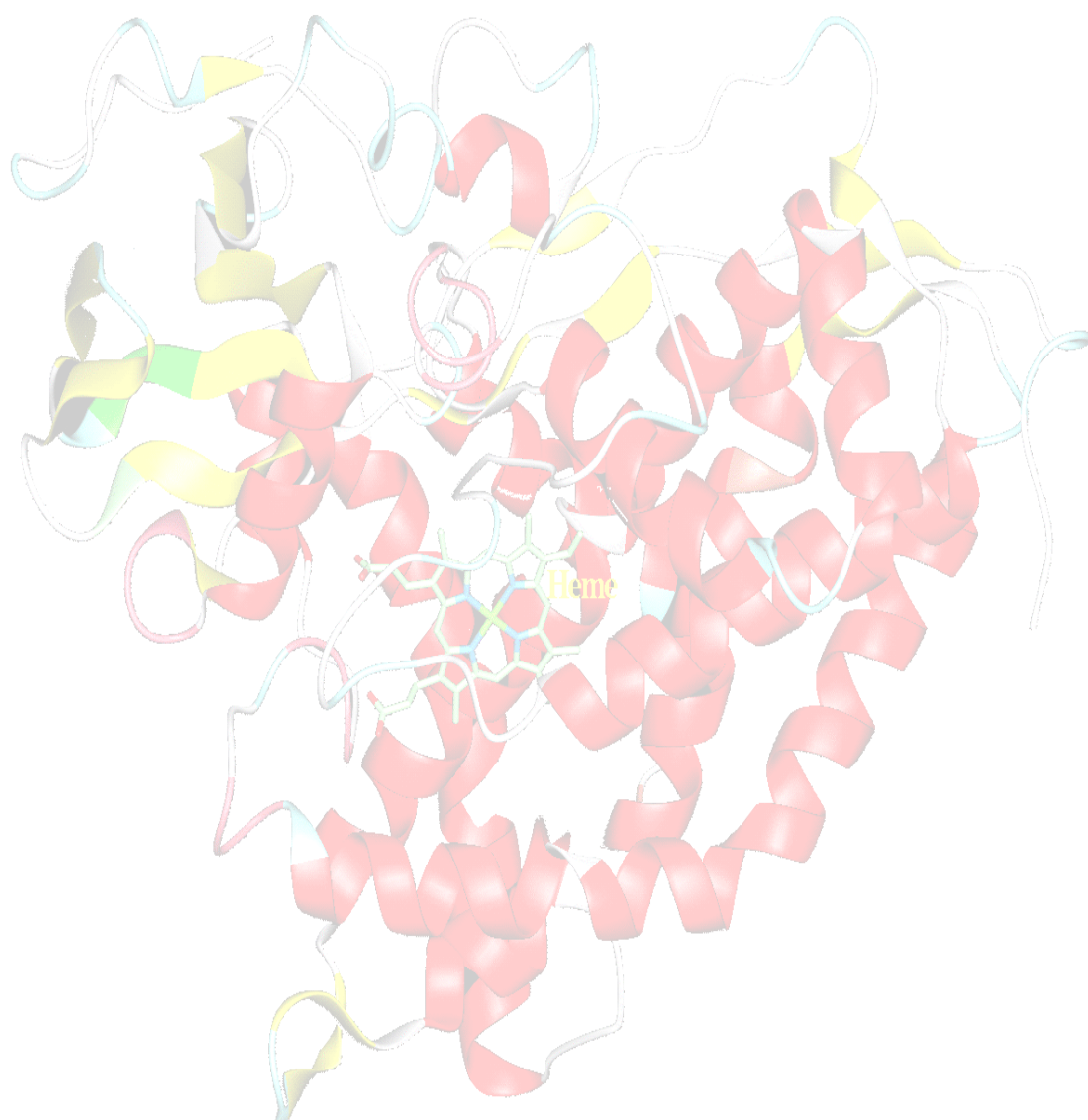
Gilmara Silva de Melo Santana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Janeiro/2004

A caracterização do fenótipo acetilador e oxidativo das atividades das enzimas metabolizadoras é de fundamental relevância para avaliação da resposta farmacológica aos vários agentes terapêuticos. Os estudos de fenotipagem e genotipagem têm como finalidade detectar e mensurar polimorfismos nestas enzimas. O estudo teve como objetivo determinar o perfil fenotípico da atividade metabolizadora das enzimas CYP1A2, CYP2A6, XO e NAT2 em uma amostra de oitenta voluntários saudáveis da população do estado do Ceará, utilizando a cafeína como fármaco “probe”. Os voluntários foram avaliados através de consulta médica para confirmação do estado de higiene; as funções metabólicas, hepática e renal foram avaliadas através de exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos. O protocolo clínico consistiu de um internamento onde os voluntários receberam um comprimido de 200mg de cafeína e coletas de sangue e urina. As amostras de sangue seguiram os seguintes intervalos a partir da administração: 0; 0:05; 0:15; 0:25; 0:35; 0:45; 1:00; 1:15; 1:30; 2; 4; 6; 8; 12 e 24 horas. A urina foi colhida em seu volume total durante as 10 horas após a administração, o volume urinário total foi quantificado e uma alíquota foi armazenada para determinação dos metabólitos. O protocolo analítico consistiu de dosagem por HPLC das concentrações plasmáticas de cafeína e das concentrações urinárias dos cinco principais metabólitos da cafeína: 1U – ácido 1-metilúrico; 17U – ácido 1,7-dimetilúrico; 1X – metilxantina; 17X – 1,7-dimetilxantina e AFMU – 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil. A partir das concentrações molares urinárias dos metabólitos foram determinadas as atividades das enzimas: $CYP1A2 = (AFMU + 1X + 1U) / 17U$; $CYP2A6 = 17U / (AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U)$; $NAT2 = AFMU / (AFMU + 1X + 1U)$ e $XO = 1U / (1X + 1U)$. Os valores das atividades enzimáticas foram submetidos a análise por estatística descritiva (histograma) não apresentando distribuição normal. Foram identificados pelo menos três fenótipos metabolizadores para as enzimas CYP1A2, NAT2 e XO. Com base na atividade de cada enzima os voluntários foram divididos em dez grupos organizados categoricamente. Os voluntários dos grupos de maior e menor atividade enzimática foram escolhidos para determinação dos parâmetros farmacocinéticos (ASC; $t_{1/2}$; k_e ; V_d/Kg ; CL). A comparação destes parâmetros (teste “t” de Student) entre os dois grupos apresentou diferenças significantes ($p < 0,05$). Nossos resultados sugerem a existência de polimorfismo nas enzimas estudadas de acordo com a heterogeneidade das atividades enzimáticas na amostra da população de voluntários saudáveis do estado do Ceará.



Abstract

ABSTRACT

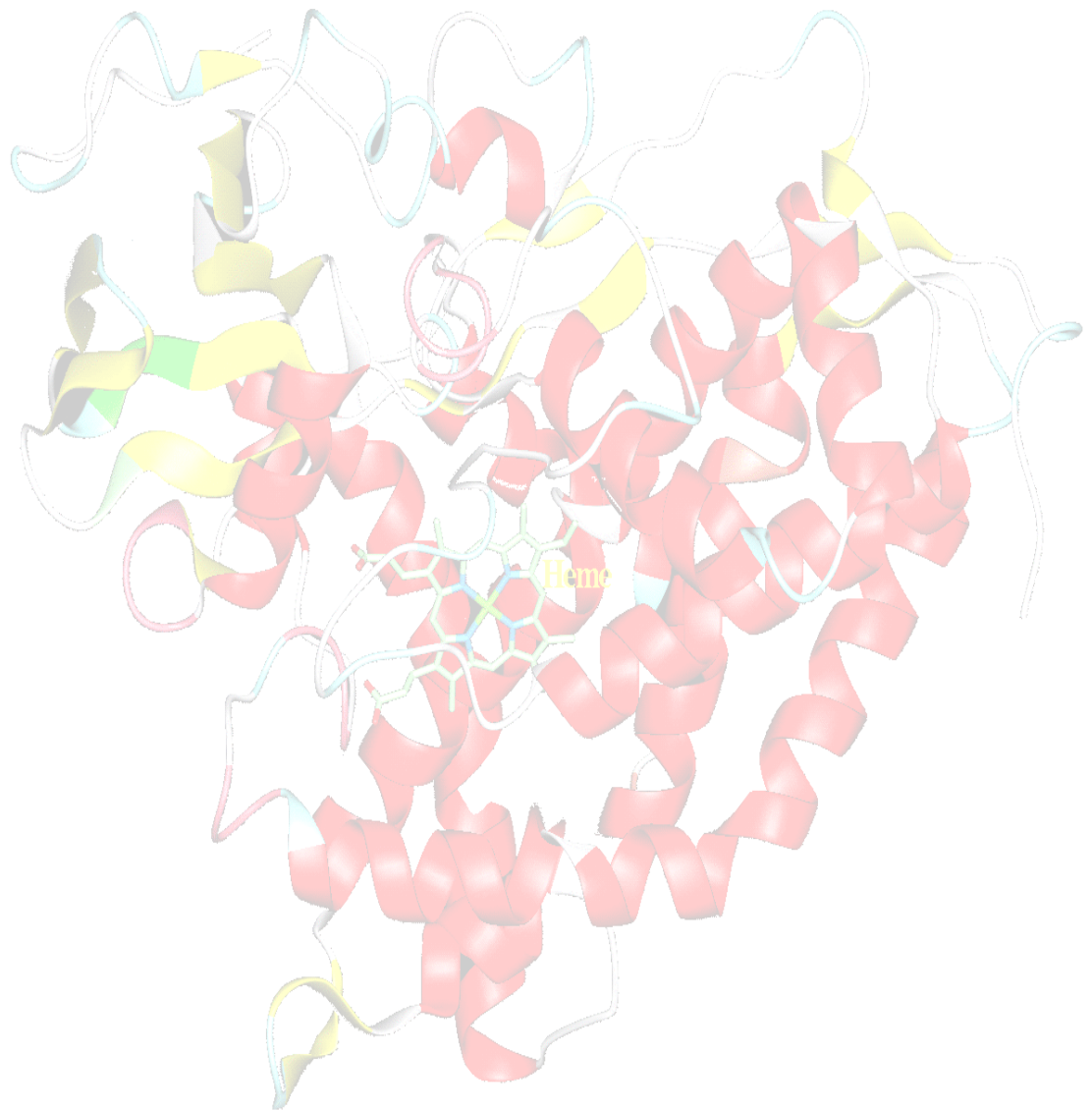
A POPULATION PHENOTYPING STUDY OF FOUR DRUG-METABOLIZING ENZYMES IN CEARÁ – BRAZIL.

Gilmara Silva de Melo Santana

Orientadora: Maria Elisabete Amaral de Moraes

Thesis presented for the degree of Doctor in Pharmacology by the Department of Pharmacology and Physiology of the Federal University of Ceará

Characterization of acetylator and oxidative metabolizers phenotypes is of clinical relevance, as it has been shown that the pharmacological response of several therapeutic agents. The studies of phenotype and genotype have as purpose to detect and to measure polymorphisms in these enzymes. In this study, we assessed *in vivo* activities of CYP1A2, CYP2A6, Xanthine Oxidase (XO) and NAT2 in sample of 82 volunteers (40 men and 42 women) from Ceará – Brazil using caffeine as probe. The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, gastrointestinal and hematological disease, as assessed by physical investigation, ECG and hematological and biochemical tests. The study was open, the volunteers were hospitalized, having already had a normal evening meal, and after an overnight fast they received a single 200 mg dose of caffeine tablet. Blood samples were collected in regular intervals (0; 5min; 15min; 25min; 35min; 45min; 1h; 1,25h; 1,5h; 2h; 4h; 6h; 8h; 12h and 24 hour) after the administration of caffeine. Urine was harvested in its total volume during the 10 hours after the administration of caffeine, the total urinary volume was quantified and an aliquot one was stored for determination of the metabolites. The caffeine was determined in human plasma and the metabolites were determined in human urinary by HPLC using theobromine as an internal standard. The metabolites assessed were: 1U – 1-methyluric acid; 17U – 1, 7-dimethyluric acid; 1X – 1-methylxanthine; 17X – 1, 7-1-dimethylxanthine e AFMU – 5-acetylamin-6-formylamino-3methyluracil. The following molar ratios were calculated as an index for CYP1A2 activity $[(AFMU + 1X + 1U) / 17U]$; CYP2A6 activity $[17U / (AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U)]$; NAT2 activity $[AFMU / (AFMU + 1X + 1U)]$ and Xanthine Oxidase activity $[1U / (1X + 1U)]$. The enzymatic activities were plotted in histogram. The frequency distributions of the CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT2 were not normally distributed, showing three phenotypes. Afterwards the volunteers were classified by enzymatic activities in ten groups, and the lowest and highest metabolizers groups were chosen to determine the following pharmacokinetic parameters: AUC_{0-24} , $t_{1/2}$, k_e , CL and Vd/Kg. The comparison of these parameters (test “t” de Student) between these two groups it showed significant differences ($p < 0.05$). Our findings may suggest that the heterogeneous population assessed (health volunteers from Ceará - Brazil) has shown polymorphism in the enzymatic activities of the CYP1A2, NAT2, XO and CYP2A6



Introdução

INTRODUÇÃO

Os seres humanos são diariamente expostos a uma grande variedade de compostos estranhos denominados xenobióticos. Algumas destas substâncias são inócuas, mas a grande maioria delas é capaz de promover respostas biológicas devido a suas propriedades químicas, sendo então denominados fármacos. A interação entre um fármaco e o organismo é didaticamente dividida em dois processos a farmacodinâmica que compõe a ação do fármaco sobre o organismo e a farmacocinética que contempla a ação do organismo sobre a droga. Os processos farmacocinéticos controlam a absorção, distribuição, biotransformação e a excreção dos fármacos e deste modo são importantes no delineamento dos esquemas terapêuticos.

As propriedades farmacocinéticas dos fármacos são influenciadas por fatores ligados à formulação e ao indivíduo. Dentre os fatores ligados ao indivíduo destacam-se os componentes genéticos, étnicos, ambientais e dietéticos. A literatura médica é rica em exemplos de fármacos que apresentam farmacocinética alterada em resposta a fatores étnicos. Estas variações envolvem a biodisponibilidade da substância, a distribuição tecidual, a eliminação e principalmente o metabolismo. Dentre estas as que envolvem o metabolismo parecem ser as mais importantes, tendo em vista que o metabolismo lança mão de inúmeras proteínas e enzimas distintas envolvidas nos processos de reconhecimento, recaptação, distribuição e eliminação das drogas. Com base nestes conceitos é fácil entender como o polimorfismo genético entre diferentes grupos étnicos pode influenciar fortemente nas propriedades farmacocinéticas de um composto terapêutico.(WOOD; ZHOU, 1991; FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

O processo de eliminação de um fármaco do organismo se desenvolve por duas vias principais: a biotransformação e a excreção. A biotransformação pode ser afetada pela dose administrada, interações com outros fármacos e principalmente a integridade da função hepática. O mecanismo de excreção renal é de fundamental importância para garantir que a atividade biológica cesse, principalmente em se tratando de substâncias de pequeno peso molecular e acentuada ionização no pH fisiológico. A grande maioria dos fármacos necessita ser ionizada para que seja eliminada com maior eficácia.

1 METABOLISMO DOS FÁRMACOS

O termo metabolismo pode ser definido como o conjunto de reações químicas para a biotransformação de substâncias endógenas e exógenas (RITSHEL, 1982). De uma forma geral é o fígado o principal sítio metabólico de fármacos, no entanto, existem outros órgãos que têm uma atividade considerável como metabolizadores tais como: o trato gastrointestinal, os pulmões, a pele e os rins (CORREIRA; CASTAGNOLI, 1984).

Ao serem absorvidos no trato gastrointestinal para a corrente sangüínea, os fármacos são inicialmente transportados, pela circulação porta hepática, para o fígado, onde uma fração significativa é captada e metabolizada pelos hepatócitos ou ainda pelas células de Kupffer. Este fenômeno de extração ou eliminação de um fármaco da corrente sangüínea durante sua passagem inicial pela mucosa intestinal e pelo fígado se denomina metabolismo de primeira passagem. (BENET; KROETZ et al., 1996).

As reações metabólicas têm como função principal fornecer energia para manutenção e funcionamento do corpo. Essas reações estão divididas em três grandes grupos: as reações de anabolismo, que realizam biossíntese de moléculas complexas a partir de substâncias mais simples; as reações de catabolismo, que simplificam estruturas químicas pela sua decomposição e as reações de conversão ou biotransformação de compostos xenobióticos em substâncias mais polares para que estas possam ser eliminadas mais facilmente (RITSCHER, 1982).

O catabolismo tem uma importância relevante no metabolismo dos fármacos uma vez que exerce grande influência na duração do efeito farmacológico produzido por um determinado medicamento, bem como na produção de metabólitos, que de modo geral têm uma atividade menor que o fármaco original, podendo inclusive ser inativo (detoxificação).

Eventualmente, ocorre o fenômeno inverso, onde a biotransformação forma um metabólito farmacologicamente mais ativo. Nestes casos a substância original é chamada de precursor inativo ou pró-fármaco. Em suma, os metabólitos de um fármaco podem ter uma ação farmacológica diferente da ação do composto original, esta ação não necessariamente constitui um efeito terapêutico, mas também efeitos tóxicos como: mutagenicidade,

teratogenicidade e carcinogenicidade (CORREIRA; CASTAGNOLI, 1984; BENET KROETZ et al, 1996).

As pró-drogas são compostos farmacologicamente inativos destinados a aumentar a quantidade da forma ativa que atinge o seu local de ação. As pró-drogas inativas são convertidas rapidamente em metabólitos com atividade biológica, geralmente por hidrólise de uma ligação éster ou amida (GOODMAN & GILMAN, 10ª ed).

No processo de biotransformação, grande parte das moléculas orgânicas com atividade farmacológica são substâncias lipofílicas, podendo ou não ser ionizadas ou são ionizadas de modo parcial em pH fisiológico. Tais características possibilitam uma forte ligação com as proteínas plasmáticas, dificultando sua filtração glomerular, além do que substâncias de natureza lipofílica são facilmente reabsorvidas nos túbulos renais. Desta forma, se a inativação dos fármacos dependesse apenas da excreção renal a grande maioria deles teria um tempo de atividade bastante prolongado (GOLDSTEIN; ARONOW and KALMAN, 1974).

O metabolismo dos fármacos pode ocorrer por reações químicas espontâneas ou catalisadas por enzimas celulares específicas. Estas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias, ou na membrana plasmática nuclear (BENET; KROETZ et al., 1996).

Em geral as reações de biotransformação de fármacos são classificadas como reações de funcionalização da Fase I e reações biossintéticas da Fase II. Os sistemas enzimáticos envolvidos nas reações da fase I localizam-se no retículo endoplasmático, assim como vários sistemas enzimáticos de conjugação da fase II ficam no citoplasma ou ainda nos microsomas. Geralmente, os fármacos biotransformados por uma reação da fase I do retículo endoplasmático são conjugados na fração citosólica da mesma célula.

1.1 Reações Fase I

Esta fase é responsável pela funcionalização dos xenobióticos, nela ocorre introdução ou exposição de um grupo funcional ao fármaco, este grupo funcional é relativamente reativo,

originando um composto mais polar e, portanto, mais suscetível à excreção. (IYER; SINZ, 1999).

Estas reações estão divididas em oxidação (microssomal, mitocondrial e em outras organelas), redução e as reações hidrolíticas. De uma forma geral o grupo introduzido se constituirá um grupo de ataque para o sistema de conjugação da fase II. Se não forem rapidamente excretados na urina os produtos das reações de biotransformação da fase I podem interagir com compostos endógenos para formar conjugados altamente hidrossolúveis. (GOODMAN & GILMAN, 10ª ed.).

Essa fase pode aumentar, diminuir ou manter inalterada a atividade farmacológica, mas em geral ocorre perda de atividade farmacológica. Em raros casos o metabolismo está associado a uma alteração da atividade farmacológica (GOODMAN & GILMAN, 10ª ed.).

As principais enzimas da fase I de biotransformação são as isoenzimas das famílias do citocromo P450 e as isoformas da flavina monooxigenase (IYER; SINZ, 1999).

1.1.1 Oxidação

As reações de oxidação da fase I podem ser microssomais, onde pode haver acréscimo de um átomo de oxigênio ao substrato ou ainda uma oxidação primária para reestruturação molecular com perda de uma porção da molécula original (CORREIRA; CASTAGNOLI, 1984).

A oxidação mitocondrial é catalisada pelas enzimas monoaminoxidase e deaminoxidase; que têm a função de desaminar oxidativamente várias aminas naturais assim como uma série de fármacos. Os produtos de reação são alquil aril aldeídos que são oxidados por outras enzimas até ácidos carboxílicos. A monoaminoxidase é uma enzima encontrada especialmente no fígado, no rim, no intestino e no tecido nervoso. Seus substratos incluem a feniletilamina, a tiramina, as catecolaminas e os derivados do triptofano. A deaminoxidase transforma as aminas em aldeídos na presença de oxigênio. Entre os seus substratos se encontram a histamina e as polimetilendiaminas (BENET; KROETZ et al., 1996).

Existem ainda as oxidações de metais que têm importância na farmacologia incluindo a conversão do arsênio da forma trivalente a pentavalente e o ferro da forma ferrosa a férrica. Os sulfúricos são oxidados a sulfatos e os compostos disulfídricos a ésteres do ácido sulfúrico ou ácidos sulfônicos. Os produtos oxidados são menos tóxicos e são excretados rapidamente (CORREIRA; CASTAGNOLI, 1984).

As enzimas da família da xantina oxidase apresentam como cofator o molibdênio e um grupamento Fe_2S_2 ; elas são responsáveis pela hidroxilação oxidativa de vários compostos aromáticos heterocíclicos e aldeídos nas reações que envolvem a quebra de uma ligação C-H. A xantina oxidase é uma importante fonte de radicais livres derivados de oxigênio e está também implicada no metabolismo de drogas como a 6-mercaptopurina. Sabe-se que ela catalisa a 8-hidroxilação da metilxantina *in vitro* e *in vivo*. (KISKER, SCHINDELIN and REES, 1998).

As biotransformações oxidantes que são catalisadas pelas monooxigenases do citocromo P450 incluem: a hidroxilação da cadeia aromática bilateral; N-desalquilação, O-desalquilação, S-desalquilação; N-oxidação; Sulfoxidação; N-hidroxilação; desalogenização e dessulfuração. (WILKINSON, 2001).

1.1.1.1 Famílias do Citocromo P450

A família de enzimas do citocromo P450 é o principal catalisador das reações de biotransformação dos fármacos. As enzimas do citocromo P450 (designadas pela sigla CYP) são proteínas da membrana que contém o grupamento heme e estão localizadas no retículo endoplasmático liso de inúmeros tecidos.

As enzimas do citocromo P450 são hemoproteínas que ativam o oxigênio molecular para o metabolismo oxidativo de uma grande variedade de constituintes químicos orgânicos e lipofílicos. Nas células eucariontes as P450 existem como hemoproteínas ligadas às membranas, cada uma contendo aproximadamente 500 aminoácidos e tendo o ferro-porfirínico como grupo prostético. Apresentam uma molécula de cisteína localizada próxima à terminação carboxi da proteína, fornecendo um grupo tiol que é essencial para o ferro heme

já que altera a densidade eletrolítica do anel porfirínico, determinando um centro eletrolítico para ativação do oxigênio molecular. (HASLER, ESTABROOK et al., 1999).

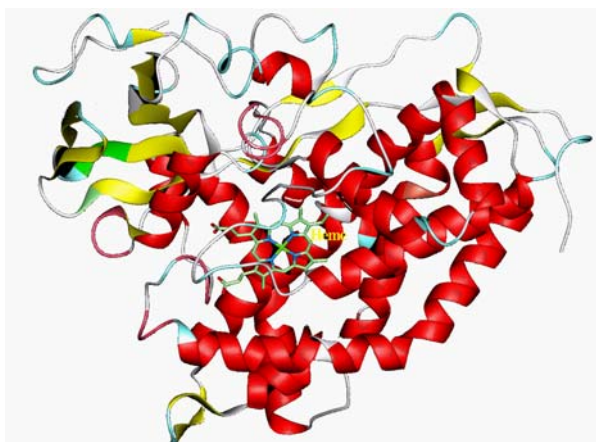


Figura 1 – Estrutura bioquímica da família de enzimas do citocromo P450; onde as helix estão representadas em vermelho e o grupo heme em verde. Fonte: www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/proLig/pdbEntries/1pha/index.gif

As reações oxidantes catalisadas pelo sistema de monooxigenases microssômicas necessitam da hemoproteína no citocromo P450, da NADPH citocromo redutase, do NADPH e do oxigênio molecular. A primeira etapa consiste da reação do substrato xenobiótico com a forma oxidada do citocromo P450 (Fe^{+3}) para formar um complexo enzima-substrato. Em seguida a citocromo P450 redutase recebe um elétron do NADPH (que reduz o complexo oxidativo citocromo P450-xenobiótico). Em seguida o complexo citocromo P450 reduzido (Fe^{+2}) reage com o oxigênio molecular e com um outro elétron do NADPH que foi doado através da mesma flavoproteína redutase para deste modo formar uma espécie de oxigênio ativado. Nas etapas finais um átomo de oxigênio é liberado como água e o outro é transferido para o substrato. Após a liberação do substrato oxidado a enzima citocromo P450 oxidada é regenerada. (WILKINSON, 2001).

A expressão celular das P450 é regulada por fatores de transcrição os quais tornam-se ativados durante a exposição a vários agentes químicos. A capacidade de uma substância química para servir como indutor de transcrição está, geralmente, ligada a uma família do CYP 450, deste modo os hidrocarbonetos aromáticos, por exemplo, induzirão um tipo de P450 diferente daquela que os barbitúricos são capazes de induzir. (HASLER, ESTABROOK et al., 1999).

Foram identificadas cerca de 12 famílias de genes do citocromo P450 no homem e em muitos casos observa-se a presença de vários tipos de enzimas do P450 na mesma célula. O sistema de classificação padrão da família multigênica do citocromo P450 baseia-se na semelhança da sequência de proteínas individuais. Para que as enzimas sejam consideradas da mesma família devem possuir mais de 40% de aminoácidos semelhantes. Uma família divide-se em subfamílias, e as enzimas são classificadas em diferentes subfamílias quando apresentam uma semelhança de sequência inferior a 60% (WILKINSON, 2001; HASLER, ESTABROOK et al., 1999).

Dentre as 12 famílias conhecidas, as famílias 1, 2 e 3 do citocromo P450 (CYP1, CYP2 e CYP3) codificam as enzimas metabolizadoras da maioria dos fármacos e as demais famílias estão envolvidas na biotransformação de compostos endógenos como os esteróides e os ácidos graxos.

1.1.2 Hidrólise

No retículo endoplasmático do fígado, do intestino e de outros tecidos humanos foram identificadas inúmeras estearases e amidases inespecíficas. As reações de hidrólise de ésteres e amidas expõem grupos álcoois ou aminas que serão substratos adequados para as reações de conjugação da fase II. (WILKINSON, 2001).

A epóxido hidrolase microssômica pode ser encontrada no retículo endoplasmático de praticamente todos os tecidos e em geral é considerada uma enzima de desintoxicação, pois hidrolisa os aneróxidos produzidos pelas reações de oxidação do citocromo P450 que são altamente reativos; estes anaeróxidos são hidrolisados a metabólitos inativos e hidrossolúveis (WILKINSON, 2001).

As proteases e peptidases se distribuem nos tecidos e participam da biotransformação dos fármacos polipeptídicos. A oferta dessas drogas através de membranas biológicas requer a inibição das enzimas ou a indisponibilidade de seus substratos (WILKINSON, 2001).

As enzimas hidrolíticas conhecidas como estearases e amidases se encontram no plasma sanguíneo, fígado, rim e outros tecidos. Fármacos como a procainamida, lidocaína e

indometacina têm suas amidas hidrolisadas. Já a procaína, succinilcolina, ácido acetilsalicílico, clofibrato e o metilfenidato são substratos farmacológicos de esterases. (GOLDSTEIN, ARONOW and KALMAN, 1974; RITSCHER, 1982).

1.1.3 Redução

As reduções metabólicas dos fármacos, estão presentes no metabolismo do prontosil, tartrazina, nitrobenzeno, cloranfenicol, metirapona, metadona e do naloxone (GOLDSTEIN, ARONOW and KALMAN, 1974; RITSCHER, 1982).

1.2 Reações da Fase II

Nesta fase ocorrem reações de conjugação entre o fármaco ou o seu metabólito produzido na fase I (BENET; KROETZ et al., 1996; CORREIRA; CASTAGNOLI, 1984; GOLDSTEIN, ARONOW and KALMAN, 1974; RITSCHER, 1982), onde o fármaco é ligado com o ácido glicurônico, sulfato, glutatona, aminoácidos ou acetato. O conjugado, resultante dessa ligação é, geralmente, farmacologicamente inativo, com lipossolubilidade inferior à do precursor e altamente polar, o que determina uma rápida excreção renal, biliar ou fecal. Dentre essas reações temos a glicuronidação, a acetilação, a sulfatação e a metilação.

Alguns fármacos são metabolizados quase completamente por uma via, entretanto, a grande maioria dos fármacos sofre a ação de diversas vias metabólicas. Nesses casos, a porcentagem ou a quantidade metabolizada por diferentes vias podem variar individualmente e, segundo as espécies (WEBER, 1986).

As principais enzimas envolvidas nas reações de fase II são a glutatona-S-transferase, sulfotransferases, Uridina difosfato glucuronil transferases (UDP-glucuronil transferases), N-acetiltransferases e as metiltransferases (IYER; SINZ, 1999).

1.2.1 Glicuronidação

A glicuronidação ocorre quando o ácido glicurônico se liga aos fenóis, álcoois, aminas aromáticas e ácidos carboxílicos formando seus correspondentes glicuronídicos. As UDP-glucuronil transferases são as enzimas responsáveis por estas reações e podem ser encontradas no fígado e em outros tecidos. (GOLDSTEIN; CASTAGNOLI, 1974; RITSCHHEL, 1982).

A glicuronidação é a reação quantitativamente mais importante na fase II. A UDP-glucuronil transferase catalisa a transferência de uma molécula de ácido glicurônico ativada para álcoois aromáticos e alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas e grupos sulfidrilas livres de compostos exógenos para formarem conjugados O-, N- e S-glicuronato (WILKINSON, 2001).

1.2.2 Acetilação

A acetilação constitui-se uma reação de conjugação onde a acetilcoenzima age como doadora de um grupo acetil. A coenzima A, por meio de seu grupo sulfidril livre, reage com a forma ativa de um ácido carboxílico formando o derivado acetil-CoA; e em seguida o grupo acetil é transferido para um receptor apropriado (como uma amina aromática). As enzimas responsáveis são as N-acetiltransferases hepáticas e da mucosa gastrointestinal (citosol). No fígado encontram-se células reticuloendoteliais que acetilam as hidrazinas, arilaminas, sulfonamidas. Ao contrário do que ocorre com a maioria dos fármacos, os metabólitos acetilados são menos hidrossolúveis que os fármacos originais e esta característica prolonga o seu tempo de eliminação (RITSCHHEL, 1982 e WILKINSON, 2001).

A acetilação ocorre por meio de um mecanismo de “ping-pong”, onde o substrato oscila entre a forma livre e a acetilada. Nesta reação existem dois substratos e dois produtos. Inicialmente, ocorre a transferência de um grupo acetil, vindo da acetil-CoA, para a enzima N-acetiltransferase (NAT) para formar um intermediário enzima-acetil (Ac-NAT) unido por ligação covalente (reação 1). Na segunda fase a acetilação do substrato é efetivada com a regeneração da enzima livre (reação 2) (MEYER, ZANGER et al., 1990 e WEBER, 1986).



1.2.3 Metilação

A metilação ocorre por uma via onde a S-adenosilmetionina age como doador de grupo metila para formar os derivados N-metil, O-metil (ou metox) e S-metil. As reações de metilação são catalisadas por diversas transmetilases que se encontram no citosol e seus substratos incluem as catecolaminas, o fenol, as aminas e a histamina. Geralmente a metilação ocorre na posição meta (GOLDSTEIN, 1974; RITSCHER, 1982).

A metilação e a conjugação com os aminoácidos glicina, glutamina e taurina são reações menos comuns quando se trata de metabolismo de fármacos, no entanto, representa uma importante etapa do metabolismo de compostos endógenos (WILKINSON, 2001).

2 FARMACOGENÉTICA

Embora se tenha reconhecido durante anos que as diferenças genéticas dos indivíduos podem modificar suas respostas às drogas, somente durante as duas últimas décadas estudos sistemáticos foram feitos para avaliar a importância dos caracteres genéticos na eficácia do fármaco e em suas reações adversas. O estudo científico da variabilidade individual geneticamente determinada no metabolismo do fármaco e das reações não usuais é chamado Farmacogenética.

Os chamados distúrbios farmacogenéticos constituem variações na resposta de um determinado fármaco causado por erros inatos no seu metabolismo enzimático, esses erros podem envolver tanto as modificações na sequência genética que irá gerar a enzima (como no caso das enzimas do sistema do citocromo P450 (CYP P450)) ou ainda na quantidade destas enzimas (como no caso dos polimorfismos das N-acetiltransferases).

As alterações genéticas encontradas nas diferentes populações exercem importante influência sobre o metabolismo e a resposta clínica dos fármacos. As diferentes respostas clínicas encontradas entre determinadas populações podem ser resultado de modificações no metabolismo ou de fatores geneticamente relacionados. A observação acerca da variação e descontinuidade no efeito produzido por alguns compostos constitui um ponto de partida da farmacogenética.

Fatores farmacogenéticos podem ser detectados por pesquisa na população, efetuando-se medidas farmacológicas em vários indivíduos, a fim de determinar se as respostas coletadas seguem uma distribuição unimodal, bimodal ou multimodal. A distribuição normal, ou unimodal ocorre quando a população estudada possui características homogêneas. A bimodalidade sugere a possibilidade de existência de duas subpopulações distintas, indicando a existência de diferenças genéticas entre os dois grupos. No caso da multimodalidade, reflete a possibilidade de existência de mais de duas subpopulações distintas.

Quando se trata de metabolismo de um determinado fármaco; a ocorrência de distribuições não normais sejam elas bimodais ou multimodais pode identificar a existência de polimorfismo na sequência genética que determina a enzima metabolizadora. O polimorfismo é definido como uma característica monogênica ou mendeliana que se expressa na população em pelo menos dois fenótipos, onde nenhum deles tem frequência inferior a 1% (LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001).

2.1 Polimorfismo

O polimorfismo denota uma herança, característica, que é controlada por um *locus* gênico com 2 alelos. Tal alteração está presente em cerca de 1% da população. Esta incidência pode aumentar quando se trata de um grupo com mutações espontâneas. O polimorfismo genético vem se desenvolvendo durante a evolução, podendo ocorrer como resultados de processos variados como as mutações pontuais, conversões gênicas, deleções e inserções (NEBERT et al., 1997 e GULLSTÉN, 2000).

O conhecimento do polimorfismo genético, envolvendo o metabolismo de fármacos, de uma forma geral, pode ajudar a desvendar graves problemas clínicos, tais como a ausência de respostas terapêuticas, efeitos adversos e toxicidade medicamentosa. O perfil metabólico da administração desses medicamentos tem revelado muitos casos de polimorfismo na população.

Conforme Weinshilboum (1984, apud SPILKER, 1991, p.662) estudos utilizando eletroforese protéica demonstraram que aproximadamente 25% de todas as enzimas humanas

estudadas são polimórficas. Deste modo, há um enorme potencial teórico no estudo da influência das diferenças genéticas no metabolismo de medicamentos, bem como no aumento da incidência ou da severidade das reações adversas. Alguns polimorfismos genéticos representam um importante impacto sobre funções orgânicas essenciais, podendo muitas vezes constituir fatores de risco como no caso do aumento da predisposição ao desenvolvimento de cânceres. Outros polimorfismos podem funcionar, por exemplo, ainda como mecanismos de defesa contra malária e tuberculose (LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001).

As primeiras evidências com respeito à base genética do polimorfismo no metabolismo surgiram a partir do estudo do metabolismo da isoniazida em humanos, onde Mitchell e colaboradores em 1958 mostraram que as variações na inativação da isoniazida poderiam estar sob controle genético. Mais tarde estudos posteriores demonstraram que a distribuição das frequências de ocorrência das formas acetilada e inalterada de isoniazida na urina e no plasma apresentavam características de uma distribuição bimodal (MITCHELL, RIEMENSNIDER et al., 1958; NERI, 1993).

O Polimorfismo na hidroxilação da debrisoquina tem sido associado com diferenças pessoais. Os investigadores relatam que hidroxiladores lentos tem alta vitalidade, são menos alerta, mais eficientes e apresentam falta de iniciativa. Os autores especulam que debrisoquina hidroxilase ainda está envolvida no metabolismo de substâncias endógenas, importantes para a função do SNC. A atividade da monoaminoxidase plaquetária também tem sido associada com peculiaridades individuais.

O conhecimento da predisposição genética para toxicidade a um medicamento permitirá que os médicos possam evitar muitas reações adversas em pacientes geneticamente susceptíveis. Isto já tem ocorrido em alguns pacientes que receberam suxametônio durante a cirurgia, cuja determinação pré-operatória da atividade plasmática da colinesterase foi satisfatória; outros, ainda através da determinação *in vitro* da susceptibilidade farmacogenética para toxicidade aos metabólicos dos medicamentos.

Os polimorfismos são detectados através da observação das diferenças entre indivíduos ou populações quanto à função enzimática (fenótipo) e da avaliação do gene que codifica a enzima (genótipo). Nos estudos de fenotipagem *in vivo*, geralmente um fármaco

“probe” é administrado aos voluntários e o metabolismo do fármaco é avaliado pela determinação da razão entre as concentrações do fármaco mãe e dos metabólitos encontrados no sangue ou na urina. Alternativamente, se as amostras de tecido estiverem disponíveis a fenotipagem pode incluir a determinação da atividade da enzima microsomal para substratos específicos, detecção de níveis da enzima do citocromo P450 por métodos imunológicos, pela mensuração dos níveis do RNAm que codifica as CYPs através do método de hibridização de vários ácidos nucléicos ou pelo uso da transcriptase reversa acoplada à reação de polimerase (RT-PCR). Nos estudos de genotipagem as mutações nos genes são usualmente detectadas com reações de polimerase (PCR) (HASLER, ESTABROOK et al., 1999).

Em alguns casos, no entanto, variações genéticas estão sendo identificadas e a elas não se tem associado nenhuma significância funcional, destacando assim a importância de estabelecer uma ligação entre a variação genética e as possíveis variações fenotípicas. (HASLER, ESTABROOK et al., 1999)

2.1.1 Polimorfismo de Acetilação

O polimorfismo da N-acetilação é uma das variações genéticas mais comuns na biotransformação de fármacos e compostos químicos em geral. Este polimorfismo é determinado pelas enzimas da família das N-acetiltransferases presentes no fígado e no coração. Deste modo, o polimorfismo da N-acetilação está envolvido nos efeitos terapêuticos e reações adversas de diversos fármacos que possuem aminas em sua composição. (BLUM, DEMIERRE et al., 1991; LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001)

Do ponto de vista genético, a explicação das referidas diferenças no metabolismo por acetilação de alguns fármacos está na ocorrência de três genótipos para esta reação: os acetiladores lentos são homozigotos recessivos (rr), enquanto os acetiladores rápidos são homozigotos (RR) ou heterozigotos (Rr). O polimorfismo genético é controlado por dois genes alélicos autossômicos com um *locus* único identificado por R (rápidos) e r (lentos). (CLARK, 1985; EVANS, MANLEY and MCKUSICK, 1960; HERBERT; WEBER, 1986; JENNE, 1960; MEYER, ZANGER et al., 1990; NERI, 1993; SUNAHARA, URANO and AGAMA, 1961).

Estudos têm demonstrado que a velocidade de acetilação é intensamente influenciada pela raça e pouco sofre influência do sexo e da idade. Os acetiladores rápidos predominam entre os esquimós e japoneses, enquanto os acetiladores lentos apresentam uma frequência maior e

entre os caucasianos do norte da África, escandinavos e judeus. (LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001)

O conhecimento do polimorfismo genético da enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2) constitui uma importante ferramenta na prática clínica; já que a alta incidência do fenótipo de acetiladores lentos determina uma redução significativa na velocidade de eliminação de aminas e hidrazinas aumentando assim o tempo de exposição do corpo aos agentes químicos, podendo constituir um dos fatores responsáveis pela toxicidade destes fármacos. Os acetiladores lentos apresentam um maior risco de desenvolvimento de câncer de bexiga, enquanto os acetiladores rápidos apresentam um maior risco de desenvolvimento de câncer colorretal, além do que nos acetiladores rápidos não raramente observa-se ineficácia da terapêutica com tuberculostáticos e anti-hipertensivos (BLUM, DEMIERRE et al., 1991; LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001 e MA, WOO and McLEOD, 2002).

A atividade da expressão de NAT2 pode ser determinada pela fenotipagem de indivíduos usando os chamados fármacos “probe” como substratos, a fim de explorar a capacidade metabólica de sistemas enzimáticos. Dentre outros fármacos como a sulfatetazina, hidralazina, procainamida e isoniazida; a cafeína é amplamente utilizada como “probe” para determinar o fenótipo acetilador (EVANS, MANLEY and MCKUSICK, 1960; LADERO, ANDRES et al, 1993; MINERS, BIRKETT 1996 e LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001).

Em termos gerais, a bimodalidade do metabolismo pela acetilação nos seres humanos é comum para um número considerável de fármacos (BRATTON; MARSHALL, 1939; CHAPRON, KRAMER and MERCIK, 1980; EVANS, 1989).

2.1.2 Polimorfismo de Oxidação

O polimorfismo do metabolismo de fármacos divide a população em pelo menos dois fenótipos: os metabolizadores insuficientes (MI) ou lentos e os metabolizadores extensos (ME) ou rápidos; denotando uma distribuição de frequência de característica bimodal (MEYER, 1994 e HASLER, ESTABROOK et al., 1999).

Polimorfismos têm sido detectados em diversas enzimas metabolizadoras de fármacos, incluindo as enzimas do citocromo P450 (CYP). As enzimas do CYP que apresentam polimorfismo genotípico e / ou fenotípico descritos incluem: CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4. Dentre estes, os que estão mais bem caracterizados são o polimorfismo da debrisoquina 4-hidroxilase (CYP2D6) e da S-mefenitoína hidroxilase (CYP2C19) (KUPFER, ROBERTS, et al., 1981; KUPFER; PREISING, 1984; LARES-ASSEFF; TRUJILLO-JIMÉNEZ, 2001; WILKINSON, 2001).

A CYP2D6 tem sido associada com o metabolismo de mais de 50 fármacos utilizados na terapêutica. Vários estudos, realizados com a população européia e caucasiana, têm demonstrado que a capacidade do fármaco “probe” de metabolizar a conversão da debrisoquina em 4-hidroxidebrisoquina apresenta uma distribuição bimodal. Sabe-se que a enzima responsável é a CYP2D6, caracterizando desta forma um polimorfismo na enzima (MEYER, 1994 e FROMM, KROEMER and EICHELBAUM, 1997).

Os estudos de fenotipagem da enzima CYP2D6, em caucasianos, têm mostrado consistentemente que 5 a 10% da população são metabolizadores insuficientes (MI), apresentando índices elevados da razão entre o fármaco “probe” e seu metabólito. No oriental apenas 1 % da população apresenta este fenótipo (MI). Estudos na população africana têm demonstrado uma variabilidade maior na prevalência de MI, que se estende de 0 a 19%. Esta variação pode ser explicada pela heterogeneidade étnica existente no continente africano (MEYER, 1994; BERTILSSON, DAHL, 1996; KROEMER and EICHELBAUM, 1997 e MASIMIREMBWA; HASLER, ESTABROOK et al., 1999).

Muitos carcinógenos são metabolizados pelas enzimas CYP1A1 e CYP1A2. Estes substratos são principalmente hidrocarbonetos aromáticos, como por exemplo, benzopireno, dimetilbenzantraceno e p-nitrocrisene. Quatro alelos polimórficos de CYP1A1: CYP1A1*2A, CYP1A1*2B, CYP1A1*3, CYP1A1*4 já foram identificados. A frequência de ocorrência destes alelos em diferentes populações é variável sendo de 2,7 a 5,1% em caucasianos; 10 a

15% em japoneses; 13,6 a 25,5% em africanos e 2,7 a 22% em afro-americanos. Algumas variantes de genótipo da CYP1A1 têm sido identificadas como fator de risco para a ocorrência de câncer de pulmão, especialmente quando estão acompanhadas pelo efeito sinérgico do p53 mutado (WORMHOUDT, COMMANDEUR and VERMEULEN, 1999 e GULLSTÉN, 2000).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são os principais substratos da CYP1A2. A cafeína é outro importante substrato e a sua desmetilação é usada para avaliar a atividade da enzima (CYP1A2) *in vivo*. Estudos anteriores demonstraram que a CYP1A2 é induzida pelo cigarro e pelo omeprazol. Outros estudos têm demonstrado a existência de variações interindividuais, cujas bases genéticas ainda não estão bem elucidadas (NEBERT, PETERSEN and PUGA, 1991; SWANSON; BRADFIELD, 1993; TANG; KALOW, 1996; ZEVIN; BENOWITZ, 1999).

Estudos *in vitro* com microsossomos do fígado humano e estudos de fenotipagem *in vivo* têm demonstrado uma clara variação interindividual quanto à atividade da enzima CYP2A6. Nos estudos iniciais de fenotipagem da CYP2A6 a cumarina foi utilizada como “probe”, sendo substituída posteriormente pela nicotina, que apresentou bons resultados (RAUTIO, KRAUL et al., 1992; CHOLERTON, IDLE et al., 1992; PELKONEN; RAUNIO, 1995; NUNOYA, YOKOI et al., 1996; NUNOYA, YOKOI et al., 1999; NAKAJIMA, YAMAMOTO et al., 1996a; NAKAJIMA, YAMAMOTO et al., 1996b; SHIMADA, YAMAZAKI and GUENGERICH, 1996; NAKAJIMA, YAMAGISHI et al., 2000).

A subfamília CYP2C contém três enzimas polimórficas: CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19. A enzima CYP2C9 está envolvida no metabolismo do S-warfarina, fenitoína, tolbutamida. Algumas drogas antiinflamatórias não esteroidais também são substratos dessa enzima, como por exemplo, o diclofenaco, piroxicam, tenoxicam, ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico. A variabilidade individual no metabolismo da tolbutamina e da fenitoína tem sido observada em estudos clínicos; onde têm sido relatados dois alelos variantes (CYP2C9*2 e CYP2C9*3). A frequência de ocorrência dos genótipos alterados é de 6 a 19% em caucasianos, 0 a 2,6% em orientais e 0,5 a 1% em afro-americanos. (WORMHOUDT, COMMANDEUR and VERMEULEN, 1999 e HIRVONEN, 1999)

A CYP2C19, também conhecida como mefenitoína 4-hidroxilase, metaboliza várias drogas como a S-mefenitoína, omeprazol, diazepam, imipramina e propranolol, dentre outros. Os principais alelos variantes são CYP2C19*2, CYP2C19*3 e CYP2C19*4. Vários estudos têm mostrado claramente a ocorrência dos fenótipos de MI e de Metabolizadores extensos (ME) para a atividade desta enzima. Além da variabilidade interindividual ocorre uma variabilidade inter-étnica. A frequência de MI em caucasianos é de 2,5 a 6%; 18 a 23% em japoneses e 15 a 17% em chineses (MEYER; ZANGER, 1997; GARCIA-BARCELO, CLOW et al., 1999; INGELMAN-SUNDBERG, 1999; WORMHOUDT, COMMANDEUR and VERMEULEN, 1999 e ITOH, INOUE et al., 2000).

2.1.3 Polimorfismo na Hidrólise do Álcool

A eliminação do álcool parece estar sob o controle genético, embora a natureza dos fatores envolvidos ainda não esteja totalmente esclarecida. As enzimas hepáticas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase são as responsáveis pela oxidação do etanol; sendo a álcool desidrogenase responsável pela oxidação de aproximadamente 90% do álcool no corpo. Sua estrutura é controlada por três loci de genes autossômicos, ADH1, ADH2 e ADH3. Tanto o ADH1 quanto o ADH3 estão ativos durante a vida fetal, enquanto o ADH2 é responsável pela atividade da álcool desidrogenase em adultos. (SMITH, HOPKINSON and HARRIS, 1971; KHANNA; ISRAEL, 1980)

Já se tem conhecimento de pelo menos duas formas da álcool desidrogenase, a chamada atípica e a usual, que são distinguidas entre si pela atividade catalítica, pH ótimo e por parâmetros farmacocinéticos. A forma atípica tem maior atividade oxidante do álcool e está polimorficamente distribuída na população. Além disso, há diferenças inter-étnicas na frequência dessas formas; os japoneses e chineses têm uma frequência muito maior do alelo atípico (85 a 90%) que os caucasianos (5%) (WATBURG, PAPENBERG and AEBI, 1965; EDWARDS; EVANS, 1967; WATBURG; SCHÜRCH, 1968; SMITH, HOPKINSON and HARRIS, 1971).

Sabe-se que os orientais são mais sensíveis aos efeitos adversos do álcool; esta característica parece estar correlacionada com o aumento das concentrações do acetaldeído em indivíduos suscetíveis. A habilidade para metabolizar o acetaldeído é também

polimorficamente distribuída nas populações com diferenças inter-étnicas na frequência da atividade enzimática. Em cerca de 50% dos japoneses e chineses a atividade da isoenzima aldeído desidrogenase (ALDH₂) está ausente. Como esta enzima é praticamente responsável pela oxidação do acetaldeído, tal ausência resulta num aumento das concentrações do acetaldeído tornando os indivíduos mais suscetíveis aos efeitos do álcool (MIZOI, IJIRI et al., 1979; HARADA, AGARWAL and GOEDDE, 1980; TENG, JEHAM and KIE-INJO, 1979; TENG, 1981).

2.2 Modelos Hereditários

Em 1986, WEBER demonstrou que as diferenças hereditárias nos mecanismos de acetilação estavam associadas com alterações na estrutura e na quantidade da enzima acetiladora (WEBER, 1986).

Estudos farmacocinéticos com a N-acetiltransferase hepática parcialmente purificada sugeriram que, com relação aos dois fenótipos (acetiladores rápidos e lentos) ocorre uma variabilidade na quantidade da enzima, enquanto que a afinidade da enzima pelo substrato não varia. Sua atividade catalítica final é cerca de 100 vezes superior nos acetiladores rápidos (HERBERT; WEBER, 1986; MEYER, ZANGER et al., 1990).

A literatura retrata quatro modelos que explicam as diferenças hereditárias na acetilação para substratos monomórficos e polimórficos

No Modelo I os acetiladores lentos e rápidos têm N-acetiltransferase com especificação catalítica idêntica para substratos polimórficos, mas os acetiladores rápidos têm uma maior quantidade de enzima que os acetiladores lentos.

No Modelo II os dois fenótipos se diferenciam quanto às estruturas das N-acetiltransferase hepática e estas possuem diferentes atividades catalíticas em substratos polimórficos. De acordo com este modelo o fígado de ambos os acetiladores têm a mesma quantidade N-acetiltransferase monomórfica diferenciada.

No Modelo III os acetiladores lentos e rápidos têm uma espécie de N-acetiltransferase que catalisa substratos polimórficos e monomórficos. No caso dos lentos eles apresentam outra N-acetiltransferase monomórfica que acetila os substratos monomórficos mais intensamente que os polimórficos.

No Modelo IV os diferentes fenótipos apresentam diferentes isoenzimas da N-acetiltransferase, as quais são estruturalmente diferenciadas.

2.3 Consequências Farmacológicas

O conhecimento da bimodalidade no fenótipo das reações de acetilação dos fármacos numa determinada população compõe uma importante informação para o estabelecimento de esquemas terapêuticos, já que as reações de toxicidade, conhecidamente, estão intimamente associadas com o fenótipo acetilador. Observou-se que os acetiladores rápidos apresentam uma maior incidência de hepatite, diabetes e câncer induzidos por amins carcinogênicas como β -naftilamina e 2-aminofluoreno, que são polimorficamente acetiladas em humanos (GLOWINSKI, RADTKE and WEBER, 1978).

O polimorfismo no gene da N-Acetiltransferase 2 vem sendo associado, na literatura, com vários efeitos tóxicos induzidos por drogas, bem como câncer em vários tecidos (FRET LAND, LEFF, DOLL and HEIN 2001).

Sabe-se que alguns fármacos necessitam de doses mais altas para obter efeitos terapêuticos, no caso dos metabolizados por acetilação tal característica se deve a um aumento na velocidade de acetilação. Indivíduos acetiladores lentos apresentam uma maior incidência de Lupus Eritematoso Sistêmico induzido por doses convencionais de hidralazina e procainamida. Semelhantemente, pacientes acetiladores lentos tratados com doses convencionais de isoniazida apresentaram uma maior incidência de polineuropatia (INGILMAN-SUNDBERG, 2001).

A variabilidade genética no metabolismo e na resposta terapêutica de um fármaco é extensa; a concentração plasmática do fármaco pode variar mais de mil vezes entre dois indivíduos de mesmo peso e que receberam a mesma dose do medicamento. As causas desta

variação podem ser de origem genética, fisiopatológica e ambiental (INGILMAN-SUNDBERG, 2001).

2.3.1 Conseqüências Farmacodinâmicas

A alta incidência de hipertensão na população chinesa tem sido associada com a existência de polimorfismos no gene que codifica a enzima conversora de angiotensina (ECA) ou ainda na atividade plasmática desta enzima. Entretanto, a correlação entre esses fatores ainda não esteja totalmente esclarecida. As propriedades farmacocinéticas dos inibidores da ECA tem sido bem estudadas e revela que a diferença entre a população chinesa e os caucasianos é pequena, porém significativa (JENG, HARN et al, 1997; FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

Com relação ao propranolol, diferenças na farmacodinâmica e na farmacocinética têm sido observadas entre asiáticos e caucasianos, bem como entre africanos e caucasianos. Estudos anteriores demonstraram que os chineses são mais sensíveis aos efeitos do propranolol que os caucasianos. Estes resultados podem ser explicados, em parte, devido ocorrência de concentrações plasmáticas do propranolol livre mais elevadas na população chinesa (ZHOU, KOSHAKJI et al, 1989; ZHOU, SHAY et al, 1993).

Vários estudos indicam que os asiáticos apresentam altas concentrações plasmáticas do haloperidol e baixas concentrações de seu metabólito quando comparados com os caucasianos que receberam doses semelhantes do haloperidol, como a CYP2D6 está envolvida no metabolismo do haloperidol. Esta variabilidade étnica tem sido associada com os diferentes alelos reportados para o gene da CYP2D6. Uma mutação específica no alelo CYP2D6*10 causa uma diminuição significativa da atividade da CYP2D6; logo indivíduos com o alelo *10 apresentam uma concentração de fármaco no estado de equilíbrio bastante elevada. Tais alelos ocorrem e cerca de 50 a 70% da população asiática, contra apenas 2% dos caucasianos (POTKIN, SHEN et al., 1984; JANN, CHANG et al., 1989; CHANG, JANN et al., 1991; LLERENA, DAHL et al., 1992; ZHANG-WONG, BEISER et al., 1998).

2.3.2 Consequências Farmacocinéticas

A nifedipina é um agente anti-hipertensivo antagonista dos canais de cálcio que atua reduzindo a resistência vascular coronariana e aumentando o fluxo sanguíneo coronariano através da diminuição do influxo de cálcio. Seus parâmetros farmacocinéticos apresentam uma significativa diferenciação em populações de raças distintas. O impacto da raça na farmacocinética da nifedipina tem sido bem explorado comparando os parâmetros observados numa população do sul da Ásia com os caucasianos. Vários estudos indicam que a área sob a curva (ASC) da nifedipina é significativamente maior nos indivíduos do sul da Ásia do que em caucasianos (AHSAN, RENWICK et al., 1991; AHSAN, RENWICK et al., 1993; RASHID, MARTIN et al., 1995; FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

Inúmeros fármacos com atividade depressora sob o sistema nervoso central são metabolizados pela CYP3A4 e exibem uma variabilidade étnica nos seus valores farmacocinéticos. Usando como exemplo o ansiolítico alprazolam, os asiáticos apresentam vários parâmetros farmacocinéticos diferenciados com relação aos caucasianos: C_{max} elevado, ASC estendida, clearance reduzido e meia vida ($t_{1/2}$) aumentada. Esses resultados sugerem que doses menores de alprazolam serão necessárias para que os asiáticos apresentem efeitos farmacológicos semelhantes (LIN, LAUE et al., 1988).

Várias outras diferenças tem sido observadas quando comparados os parâmetros farmacocinéticos dos asiáticos e dos caucasianos: a nicotina apresenta um clearance elevado nos hispânicos e nos caucasianos em relação aos asiáticos; a teofilina apresenta uma meia vida mais extensa em crianças asmáticas não asiáticas; o clearance da morfina é significativamente maior em chineses do que em caucasianos e esta diferença tem sido atribuída a altas taxas de glicuronidação existentes nos chineses (KOYSSOOKO, TUCHINDA et al., 1987; AHLSTROM, ALVERO et al., 1999; BENOWITZ, PEREZ-STABLE et al., 2000).

Estudos preliminares indicam que as mulheres negras apresentam níveis plasmáticos do metabólito N-desmetiltamoxifeno elevados em comparação com as brancas, entretanto, as duas populações apresentam níveis plasmáticos do tamoxifeno semelhantes. A presença do

metabólito N-desmetiltamoxifeno está associada com o aumento no número de cânceres de mama (FLAWS, LIM et al., 2000).

O sildenafil, inibidor de fosfodiesterase empregado no tratamento da disfunção erétil, exibe uma biodisponibilidade aumentada nos homens mexicanos quando comparados com os caucasianos. Os mexicanos apresentam valores de C_{max} e ASC quase duas vezes mais altos que os caucasianos; sugerindo que os mexicanos apresentam uma capacidade de metabolizar o sildenafil bastante reduzida quando comparados com os caucasianos (FLORES-MURRIETA, CASTAÑEDA-HERNANDEZ et al., 2000).

2.4 Variações Étnicas

O campo da farmacogenética apresenta interfaces com a área das diferenças étnicas na metabolização de medicamentos. Algumas dessas diferenças genéticas na população (relacionadas ao metabolismo de medicamentos) são altamente correlacionadas com a raça.

Várias populações já tiveram seus fenótipos acetiladores determinados com a quantificação da sulfametazina livre e acetilada. Em 1993, Sardas e colaboradores fenotiparam uma população de iranianos e observaram que a frequência do fenótipo acetilador lento em iranianos era semelhante às populações árabes, mas era maior que a frequência observada nos europeus (SARDAS, LAHIJANY et al., 1993).

A distribuição dos fenótipos acetiladores lentos e rápidos varia claramente de acordo com o grupo étnico e a origem geográfica da população estudada.

2.5 Impacto da farmacogenética no desenvolvimento de fármacos

Os avanços nos estudos de farmacogenética estão rapidamente influenciando a indústria farmacêutica, pois ela permite identificar se os indivíduos são metabolicamente diferenciados, através da identificação de polimorfismos genéticos que potencialmente alterem a concentração do fármaco e sua resposta. Enquanto os achados da farmacogenética permitem respostas individualizadas, a farmacogenômica é um termo genérico usado para descrever a aplicação comercial da tecnologia genômica no desenvolvimento de fármacos e

terapias. A farmacogenômica, através da biologia molecular e ferramentas genéticas, avalia o mapeamento genômico, analisa populações, hereditariedade familiar e os fatores genéticos envolvidos na resposta dos fármacos (COOPER, 1998; REGALDO, 1999; KURTH, 2000).

O conhecimento da farmacogenética tem se tornado um atrativo para a prática médica à medida que oferece subsídios para desenvolvimento de terapias mais eficientes e apropriadas e com menor probabilidade de eventos adversos. Algumas falhas na eficácia podem ser resultados dos parâmetros farmacocinéticos, deste modo a farmacogenética pode ser usada para analisar, de modo mais eficiente, os dados obtidos nos ensaios clínicos. Além disso, os dados farmacogenéticos permitem ainda a avaliação da eficácia relativa do fármaco em populações específicas. Este fenômeno já tem sido descrito em pacientes com Alzheimer que mostraram uma variação na resposta à terapia anticolinérgica que foi identificada como dependente da presença ou não do alelo APOE4 (POIRIER, 1999; RASTOGI, 2003).

A tecnologia farmacogenética possui aplicabilidade clínica à medida que a classe médica toma conhecimento dessas características, podendo assim observar uma prescrição apropriada para seus pacientes, que esteja de acordo com as suas características farmacogenéticas. Informações detalhadas acerca da eficácia do processo de metabolização de um fármaco podem também ajudar o médico durante a decisão farmacoterapêutica, tanto na escolha do medicamento quanto do regime posológico a ser usado, resultando numa redução na ocorrência de eventos adversos, aumento da adesão e redução de custos (NORTON, 2001; FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

Diante das informações que a farmacogenética vem trazendo para a farmacoterapia, algumas características tem sido introduzidas aos estudos fase I de desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que esses estudos quando realizados com substâncias que sejam metabolizadas por enzimas que conhecidamente apresentem polimorfismo devem ser desenvolvidos de forma estratificada a fim de que os parâmetros farmacocinéticos sejam avaliados de acordo com o fenótipo metabolizador dos indivíduos. Indivíduos que apresentem genótipo potencialmente não seguro devem ser intencionalmente excluídos do ensaio para não aumentarem, desnecessariamente, as chances de eventos adversos (KURTH, 2000; FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

Nos estudos de Fase II e III a farmacogenética deve identificar subpopulações, incluindo os grupos raciais e étnicos com risco potencial de eventos adversos. Os desenhos dos ensaios clínicos atuais ainda não adotam como rotina o estudo farmacogenético, e desta forma podem estar contribuindo com a identificação inadequada de eventos adversos raros, porém sérios (KURTH, 2000).

2.6 Técnicas usadas para avaliação da farmacogenética

As duas principais técnicas usadas no *screening* para polimorfismos em indivíduos são a genotipagem e a fenotipagem. A genotipagem envolve a identificação de mutações genéticas (polimorfismos) que determinem uma alteração no metabolismo de uma droga específica. O genótipo não é influenciado pelos fatores ambientais e permanece o mesmo em toda a vida do indivíduo, desta forma ele pode ser usado para identificar se o fator é genético ou ambiental (BERTILSSON, DAHL et al., 1991; BRONSEN, SINDRUP et al., 1993; LIN; POLAND, 1995; JEFFERSON; GREIST, 1996; RASTOGI, 2003).

A genotipagem é segura e relativamente não invasiva, podendo ser facilmente desenvolvida em amostras de tecido como o sangue. Entretanto, as técnicas de mensuração usadas na genotipagem incluem não apenas o uso da reação de cadeia de polimerases (PCR), mas também as ligações com oligonucleotídeos, DNA chips, dentre outras técnicas que se tornam em geral mais complexas (FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

A atividade da enzima pode ser medida pela avaliação do fenótipo metabolizador através da fenotipagem. Esta requer a administração de um fármaco “probe” que é usado para mensurar os parâmetros farmacocinéticos. Os dados obtidos são usados para classificar os indivíduos em grupos, quanto à sua capacidade de metabolizar o fármaco administrado. Os indivíduos capazes de metabolizar eficientemente um fármaco são chamados de metabolizadores extensos (EMs) ou rápidos. Indivíduos que apresentam deficiência no metabolismo são chamados metabolizadores insuficientes (MI) ou lentos. Outro grupo de indivíduos são aqueles capazes de realizar uma metabolização ultra-rápida e estes são chamados de metabolizadores ultra-rápidos (UMs). As técnicas de fenotipagem são capazes de investigar interações droga a droga, ou ainda falhas no processo geral de metabolização do

fármaco (KROEMER; EICHELBAUM, 1995; LINDER, PROUGH and VALDES, 1997; NORTON, 2001; FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002).

2.7 Medicamentos usados como ferramenta farmacológica – “probe”

Dentre as metodologias de fenotipagem o uso de fármacos “probe” como ferramenta farmacológica para avaliar possíveis alterações no fenótipo de enzimas metabolizadoras de fármacos, vem sendo cada vez mais presente.

Um fármaco “probe” pode ser definido como um fármaco cujas vias metabólicas (enzimas e produtos) são conhecidas e desta forma permite a avaliação quantitativa da atividade das enzimas envolvidas na sua metabolização através da quantificação dos produtos formados. Esta metodologia vem sendo usada para identificar diferenças genéticas no metabolismo de medicamentos em humanos.

A antipirina é um dos medicamentos mais usados como modelo de estudo. Outros exemplos são o acetaminofeno, a cafeína, a fenacetina e a teofilina.

Tais fármacos são altamente metabolizados, podendo interagir com o medicamento que está sendo avaliado indicando um aumento no metabolismo. Esta monitorização é realizada através da concentração plasmática e urinária do medicamento e de seus metabólitos.

A meia vida curta da antipirina pode ser justificada pela indução enzimática microsomal, causada pelo medicamento teste. A inibição das enzimas é mais complexa e difícil de ser testada, já que pode ser causada por muitos processos, inclusive conjugação.

A cafeína vem sendo utilizada como fármaco “probe” para fenotipagem de várias enzimas metabolizadoras de xenobióticos. A cafeína apresenta vantagens quando comparada a outros fármacos probe, já que é uma substância de uso relativamente comum, fazendo parte da composição não apenas de medicamentos mas também de bebidas, sendo relativamente segura e desta forma permitindo que os protocolos de estudo de fenotipagem sejam menos invasivos e com menores probabilidades de efeitos adversos. Além disso, ela é

completamente absorvida, tem uma boa distribuição pelos líquidos corporais, tem baixa ligação com as proteínas plasmáticas, o seu metabolismo é completamente hepático, apresenta uma meia vida de eliminação curta e sua excreção renal na forma inalterada é negligenciável (KRUL; HAGEMAN, 1998).

3 CAFEÍNA

3.1 Farmacologia

Dentre os inúmeros mecanismos de ação que foram propostos para as metilxantinas, os principais são a inibição da fosfodiesterase e a alteração da translocação intracelular de cálcio. Entretanto, as concentrações necessárias para produzir tais efeitos estão fora da faixa que usualmente apresenta atividade farmacológica *in vivo*. Mas recentemente foi demonstrada sua atividade como antagonista dos receptores de adenosina em concentrações farmacologicamente relevantes. Esta atividade tem servido para explicar os efeitos estimulantes sobre o SNC, diuréticos, metabólicos e os efeitos cardíacos das metilxantinas. Tem sido sugerido que o aumento da força de contração diafragmática, produzido pelas metilxantinas, é um fator contribuinte na atividade antiasmática (BOUSHEY, 2003).

3.2 Farmacologia Clínica

Os efeitos relacionados com a administração de doses únicas de cafeína entre 300 e 600mg incluem a estimulação do sistema nervoso central, aumento da pressão arterial, aumento do débito cardíaco, aumento das secreções gástricas de ácido e pepsinas, relaxamento muscular incluindo broncodilatação, diurese, aumento de ácidos graxos livres e estimulação de catecolaminas pela medula adrenal (BOUSHEY, 2003).

A ingestão crônica de cafeína parece promover tolerância para os efeitos cardiovasculares, renais, efeitos sobre o sistema nervoso central e também efeitos metabólicos.

3.2.1 Farmacocinética

O método mais apropriado para a determinação da cafeína em fluidos biológicos é a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com fase reversa e detecção por ultravioleta. Este processo permite a separação da cafeína de outras xantinas e uratos interferentes para melhor quantificação do fármaco em uma amostra de 0,1mL. (FOENANDER, BIRKETT et al, 1980)

A cafeína apresenta uma biodisponibilidade oral de aproximadamente 95%, com seu pico de concentração plasmática ocorrendo entre 5 e 90 minutos após a administração a voluntários em jejum. Não há evidências de metabolismo pré-sistêmico. A eliminação ocorre, quase que completamente através do metabolismo hepático em adultos, enquanto que em neonatos a eliminação é praticamente renal e de forma inalterada. (BONATI, LATINI et al., 1982)

Em adultos ocorre uma acentuada variabilidade individual na taxa de eliminação de cafeína, (o clearance médio é $1,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, variando de 0,35 a $4,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Não há evidências de uma cinética dose dependente. A meia-vida de eliminação plasmática é em média 4,9 horas com uma variação de 1,9 a 12,2 horas. A cafeína é distribuída em todos os fluidos corporais e apresenta um volume de distribuição aparente de $0,55\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$. Sua ligação média com as proteínas plasmáticas é de 35%. Relatos indicam que a razão entre as concentrações de cafeína na saliva *versus* plasma é de aproximadamente 0,74 (BONATI, LANITE et al., 1982 e NEWTON, BROUGHTON et al., 1981).

Como a cafeína é metabolizada pelas enzimas oxidativas do fígado, todos os compostos que conhecidamente alteram a atividade desse sistema de enzimas podem influenciar o seu clearance. Na verdade, a eliminação da cafeína é aumentada em fumantes e é inibida pela cimetidina, dissulfiran e os contraceptivos orais. A meia-vida da cafeína é prolongada durante a gravidez. O volume aparente de distribuição da cafeína está aumentado em neonatos.

Embora o perfil farmacocinético da cafeína seja similar em adultos, jovens e idosos, a taxa de eliminação em neonatos é extremamente lenta e o volume aparente de distribuição,

bem como a taxa de eliminação, estão aumentados em neonatos prematuros (BLANCHARD; SAWERS, 1983).

3.2.2 Metabolismo

O metabolismo da cafeína é complexo e apresenta diferenças significantes entre as espécies, bem como entre os indivíduos em diferentes situações clínicas.

No homem já foram identificados 30 diferentes metabólitos da cafeína. Inicialmente ela sofre três desmetilações oxidativas nas posições 1, 3 e 7 para formar teobromina (37X), paraxantina (17X) e teofilina (13X), respectivamente, as quais são dependentes da CYP1A2, conforme descrito na figura 1. Todos estes produtos desmetilados são detectáveis no plasma após administração da cafeína. Com base nos dados do clearance basal, as frações do produto desmetilado encontradas no plasma são 84% de paraxantina, 12% de teobromina e 4% da teofilina (KRUL; HAGEMAN, 1998).

Após a formação da paraxantina a cafeína é metabolizada por três reações: 1ª) uma hidroxilação na posição 8, que é catalisada por uma enzima do citocromo P450 a CYP2A6, para formar o ácido 1,7-dimetilúrico (17U); 2ª) uma desmetilação na posição 7, que é catalisada por uma enzima do citocromo P450 a CYP1A2, para formar o 1-metilxantina (1X); 3ª) a formação do 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (AFMU) que é catalisada pela N-acetiltransferase (NAT) (KRUL; HAGEMAN, 1998).

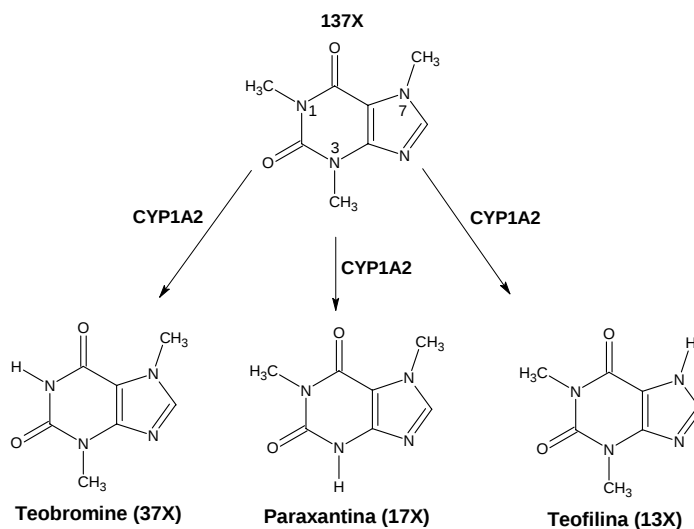


Figura 2. Via metabólica de desmetilação da cafeína, mostrando a retirada do radical metil nas posições 1, 3 e 7 que formarão a teobromina (37X), paraxantina (17X) e teofilina (13X), respectivamente

Parte da metilxantina formada na segunda reação é metabolizada a ácido 1-metilúrico (1U) e esta reação é catalisada pela enzima xantina oxidase (XO).

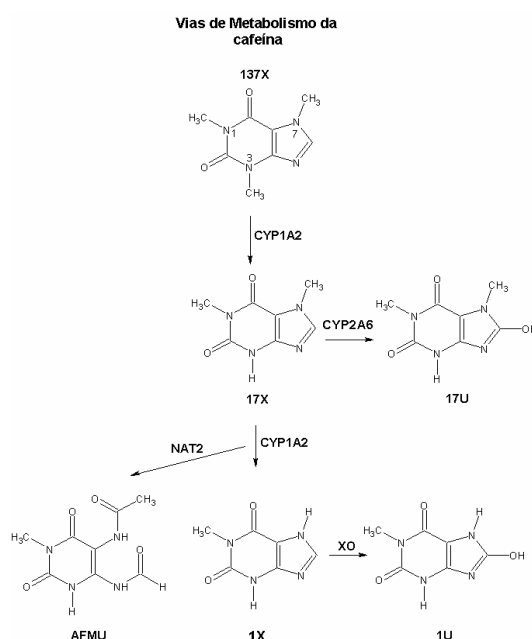


Figura 3. Vias de cascata metabólica da cafeína, mostrando as principais enzimas envolvidas no metabolismo e os principais metabólitos

A razão molar dos diferentes metabólitos da cafeína tem sido usada para obter o fenótipo metabólico das enzimas CYP1A2, CYP2A6, NAT2 e XO. Estas enzimas estão

envolvidas na ativação e detoxificação de vários compostos xenobióticos incluindo agentes carcinógenos (KRUL; HAGEMAN, 1998).

A atividade destas enzimas é geneticamente determinada mas fatores ambientais como a dieta, o consumo de álcool ou fumo e a prática de exercícios parecem modificar a atividade das enzimas de metabolização (KRUL; HAGEMAN, 1998).

3.3 Toxicologia

Dados disponíveis sugerem que a cafeína não é mutagênica. A exposição crônica de altas doses de cafeína não aumenta a incidência de tumores em animais de laboratório, no entanto, dados de estudos epidemiológicos sugerem uma relação entre o uso crônico de bebidas contendo cafeína e um aumento na incidência de câncer no ovário, pâncreas e bexiga.

Altas doses de cafeína têm demonstrado atividade teratogênica em animais de laboratório, mas estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de cafeína pela mulher grávida não aumenta o risco de nascimento de bebês de baixo peso, prematuros ou de malformações congênitas.

3.4 Reações Adversas

3.4.1 Efeitos Potencialmente Danosos à Vida

Mortes devido ao uso de cafeína têm sido relacionadas a overdoses. A gravidade dos efeitos adversos é relacionada com a dose e os sintomas são consistentes com os dados farmacológicos, conhecidos da cafeína. Estes incluem dor epigástrica, vômito, diurese, taquicardia e estimulação do SNC (agitação, tremores e convulsões). Estudos sugerem que a toxicidade ocorra em adultos com doses maiores que 1g e a toxicidade severa nas doses entre 2g e 5g. Entretanto, uma menor toxicidade tem sido observada diante de concentração plasmática de 84mg.L⁻¹.

3.4.2 Overdose Aguda

Overdose, pelo uso acidental da cafeína, tem levado à morte de crianças e adultos. Danos clínicos têm sido reportados com a overdose pelo uso do café, sendo os sintomas típicos: a diurese, taquicardia e estimulação do SNC (tremores e convulsões). Acidose metabólica, cetose e hiperglicemia têm sido relatadas em pacientes em overdose por cafeína; cetonúria tem sido relatada em crianças que ingerem grandes quantidades de cafeína. Pacientes em overdose por cafeína têm apresentado concentrações plasmáticas extremamente altas de epinefrina e norepinefrina. A dose letal de cafeína em adultos parece ser entre 5 e 10g, e a concentração plasmática que tem determinado admissão hospitalar é a de 150mg/L-1, em overdose fatal.

3.4.3 Efeitos Adversos, Severos ou Irreversíveis.

A ingestão crônica de mais de 500mg de cafeína por dia está relacionada ao cafeinismo, uma síndrome de grau leve e irregular, apresentando febre, insônia, anorexia, ansiedade e irritabilidade. Usualmente esta síndrome tem sido confundida com ansiedade neurótica.

3.4.4 Efeitos Adversos Sintomáticos

Efeitos adversos comuns ao uso da cafeína estão relacionados com o sistema gastrointestinal (náusea), e do sistema nervoso central – SNC (insônia, tremores). Quando ocorre a interrupção do consumo crônico de cafeína pode ocorrer cefaléia severa.

3.5 Cafeína como fármaco “probe”

O metabolismo da cafeína envolve várias vias de biotransformação. As enzimas responsáveis pela formação dos metabólitos da cafeína já estão bem identificadas. Sabe-se que a CYP1A2 catalisa as três reações de desmetilação que ocorrem em cerca de 90% da cafeína metabolizada *in vivo*; suas isoformas contribuem significativamente para o metabolismo formando os três principais produtos: a paraxantina, a teobromina e a teofilina.

As isoformas do CYP também estão envolvidas na formação de metabólitos secundários, onde a CYP3A4 catalisa a 8-hidroxilação da cafeína. (MINERS; BIRKETT, 1996)

Além das CYP a N-acetiltransferase 2 (NAT2) e a xantina oxidase também contribuem para a formação dos metabólitos secundários. A excreção urinária do AFMU é dependente da atividade da NAT2. A razão entre as concentrações de 1-metilxantina e 1-metilúrico é determinada pela xantina oxidase (XO). Estudos da atividade da NAT2 e da XO em diversas populações têm sido realizados utilizando a cafeína como fármaco “probe” e os resultados encontrados são semelhantes aos realizados com a isoniazida e outros fármacos “probe” (KALOW, 1991 e TANG; KALOW, 1991).

O conhecimento da enzimologia do metabolismo da cafeína tem fornecido base para a sua utilização como fármaco “probe” para enzimas metabolizadoras de vários xenobióticos *in vivo* e *in vitro*. (MINERS; BIRKETT, 1996)

4 JUSTIFICATIVA

O uso dos medicamentos no Brasil está baseado em dados farmacocinéticos gerados em outras populações, sabe-se porém que a etnia tem sido caracterizada como um fator diferencial dos parâmetros farmacocinéticos nas diferentes populações.

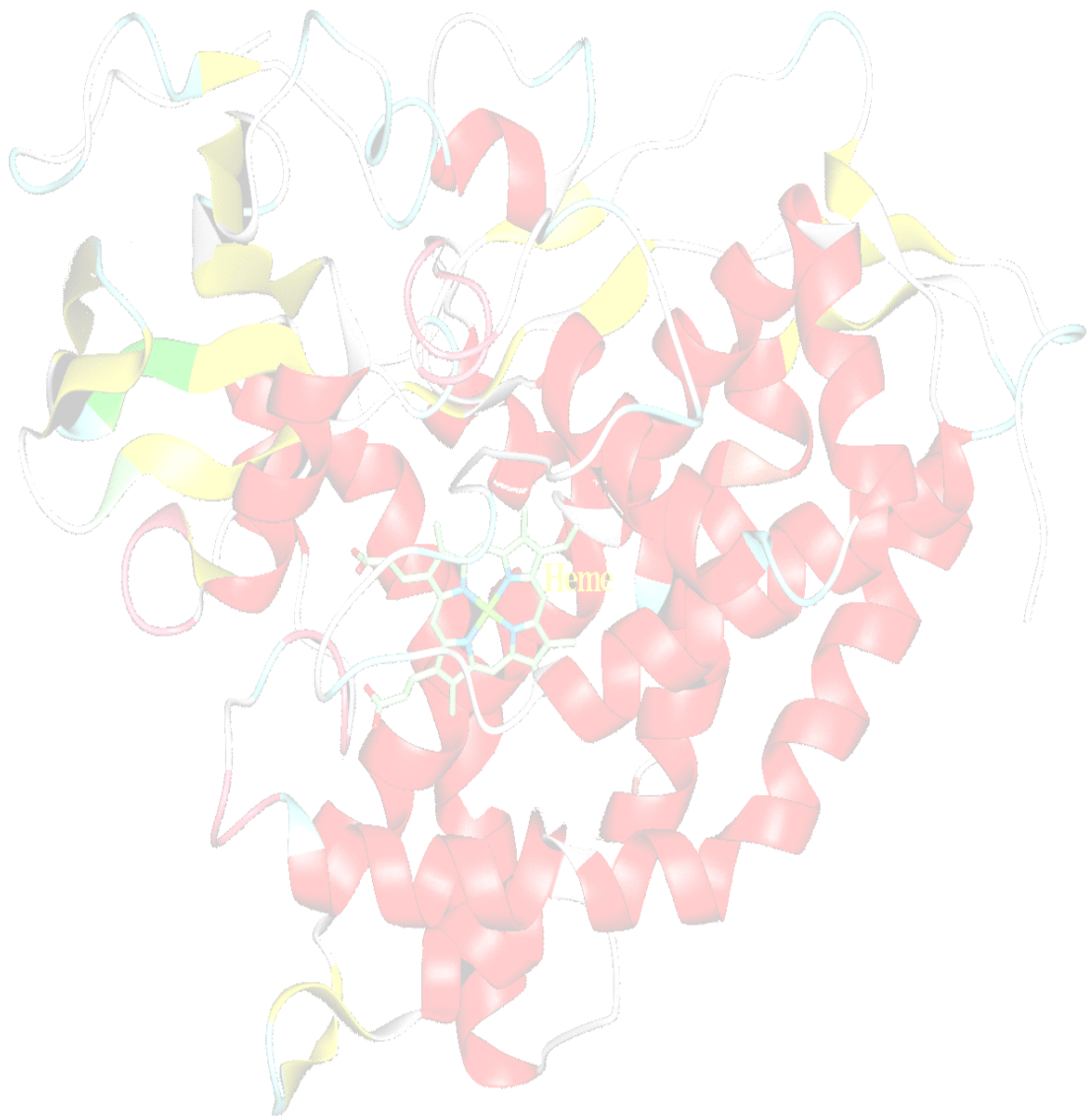
Tendo em vista que o conhecimento das características farmacogenéticas da população brasileira é de suma importância para a melhor definição dos esquemas terapêuticos estabelecidos em nosso país, faz-se necessário o desenvolvimento de projetos que tenham como objetivo fenotipar a nossa população quanto às principais vias de metabolização dos fármacos.

Sabe-se que as reações de acetilação são parte significativa do metabolismo de diversos fármacos usados na prática clínica, incluindo os tuberculostáticos (isoniazida e rifampicina), o anticonvulsivante clonazepam, o vasodilatador periférico hidralazina, a dapsona (usada no tratamento da hanseníase), o antiarrítmico procainamida, os antimicrobianos sulfametazina e sulfasalazina., dentre outros.

A determinação da existência de modalidades diferenciadas de fenótipos acetiladores pode trazer implicações clínicas e conseqüentemente possíveis modificações nos esquemas terapêuticos destas drogas, já que os acetiladores lentos têm uma maior tendência a apresentar efeitos tóxicos e os acetiladores rápidos, não raramente, necessita de maiores doses, fato este que no caso dos tuberculostáticos, por exemplo, poderia justificar a ineficácia observada em alguns esquemas terapêuticos utilizados no Brasil.

Baseado no fato de que a atividade das enzimas hepáticas tem importante conseqüência terapêutica e pode variar de acordo com o grupo étnico; recomenda-se a execução de estudos de fenotipagem e genotipagem a fim de detectar e mensurar polimorfismos nestas enzimas. (FRACKIEWICZ, SHIOVITZ and JHEE, 2002)

Até o momento não se tem registro de dados acerca da caracterização do fenótipo acetilador na população brasileira.



Objetivos

OBJETIVOS

1 GERAIS:

Caracterizar o fenótipo metabolizador da cafeína, em uma amostra da população de voluntários saudáveis da Unidade de Farmacologia Clínica.

2 EPECÍFICOS

Quantificar os metabólitos AFMU, 1U, 1X, 17U e 17X em amostras de urina.

Avaliar se as atividades das enzimas CYP1A2, CYP2D6, NAT2 e Xantina Oxidase apresentam uma distribuição normal.

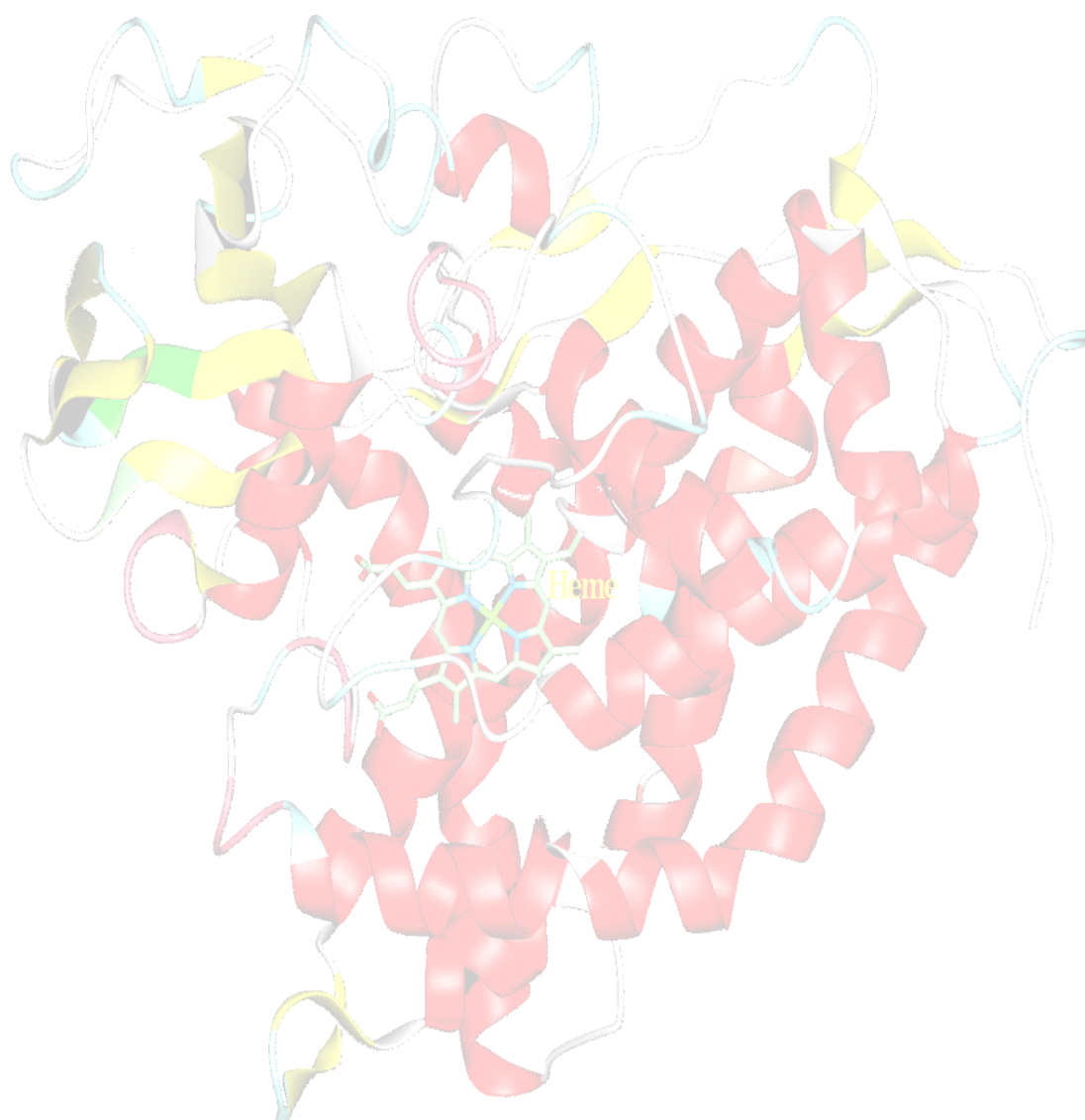
Classificar os voluntários quanto ao padrão metabólico.

Avaliar a quantificação plasmática da cafeína.

Determinar o perfil farmacocinético dos voluntários com menor e maior atividade enzimática.

Comparar os parâmetros farmacocinéticos dos grupos de voluntários classificados como de maior e menor atividade enzimática.

Comparar os resultados obtidos com outro estudo farmacocinético de um fármaco metabolizado pela enzima CYP1A2.



Material e Métodos

MATERIAL

1 ETAPA CLÍNICA

A etapa clínica do estudo, constou de uma fase de seleção dos voluntários (para garantir a higidez) e de um internamento onde os voluntários tomaram um comprimido de 200mg de cafeína. O material utilizado durante esta etapa encontra-se descrito nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1- Material utilizado na etapa clínica (incluindo: seleção, internamento e coleta de amostras de urina de 80 voluntários).

MATERIAL UTILIZADO PARA COLETA	FABRICANTE
Agulhas descartáveis 25x8	BD – USA
Agulhas 21G x 1 Vacutainer	BD – USA
Álcool 70%	HUWC-UFC
Algodão	Johnson and Johnson – USA
Coletores de fezes	Fornecido pelo Laboratório Louis Pasteur
Coletores de urina	Fornecido pelo Laboratório Louis Pasteur
Garrafas plásticas de 1000mL	
Pipetas ajustáveis (100µL, 200µL, 1000µL)	Gilson Pipetman, França
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 5-200µL)	Unilab, Brasil
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 200-1000µL)	Unilab, Brasil
Seringas descartáveis de 10mL	BD – USA
Suporte para conexão da agulha	BD – USA
Tubos Vacutainer	BD – USA
Tubos plásticos para armazenar plasma (tipo “corning”)	Corning Costar Corporation– Canadá

Tabela 2 – Medicamento administrado na etapa clínica.

DESCRIÇÃO	FABRICANTE	LOTE	VALIDADE
Cafeína	Leader®	1E1401	03/05

Tabela 3- Equipamentos utilizados na etapa clínica.

APARELHOS	FABRICANTE
Termômetro thermo flat	Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda – Brasil
Esfignomanômetro Tycos 7050-14	Tycos –USA
Estetoscópio	Lytman – USA
Eletrocardiógrafo	Dixtal – Brasil
Balança	Balmak- Brasil
Centrífuga	Eppendorf
Freezer horizontal –20°C	Eletrolux-Brasil

2 ETAPA ANALÍTICA

A etapa analítica do estudo; constou de uma fase de determinação analítica dos metabólitos da cafeína na urina dos voluntários (para quantificação da atividade das enzimas CYP1A2, CYP2A6, NAT2 e XO) e uma fase de determinação analítica da cafeína no plasma dos voluntários (para determinar os parâmetros farmacocinéticos).

O material utilizado durante esta etapa encontra-se descrito nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Tabela 4- Material utilizado na etapa analítica.

DESCRIÇÃO	PRODUTOR/PAÍS
Pipetas ajustáveis (100µL, 200µL, 1000µL)	Gilson Pipetman, França
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 5-200µL)	Unilab, Brasil
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 200-1000µL)	Unilab, Brasil
Tubos de ensaio 120 x 11 mm	Unilab, Brasil
Tubos Eppendorf (2mL)	

Tabela 5- Equipamentos utilizados na etapa analítica.

EQUIPAMENTO	MARCA/ MODELO
HPLC	Shimadzu
Deionizador	TKA / DI 800
Purificador de água – Rios	Millipore / Rios 05
Purificador de água – Milli-Q	Millipore / MILLI-Q GRADIENTE
Aagitador de Tubos	Phoenix / AP-56
Balança Analítica	Mettler Toledo / AB204-S
Secador de Amostras – Dry Block	Techne – DB3
Centrífuga	Jouan/ M23i
Pipeta (Q64453A)	Gilson / P1000
Pipeta (Q65273A)	Gilson / P200
Pipeta (Q63359A)	Gilson / P20
Gerador 170 KVA	Leon Himer / 170KVA
Medidor de pH	Hanna instruments, Portugal
Balança analítica	Ohaus co. Florham Park Switzerland
Vortex mixer Fisher Vortex Genie 2	Fisher Scientific Laboratory Equipment, USA

Tabela 6 - Componentes do HPLC Shimadzu

COMPONENTE	MODELO
Controladora	SCL-10A VP
Bomba	LC 10ADVP
Misturador	FCV-10ALVP
Degaseificador	DGU-14A
Autoinjeter	SIL-10ADVP
Forno Guarda Coluna	CTO-10AVP
Detector PDA	SPD-M 10A VP
Coluna analítica	Shimpack C-18/ CLC-ODS (M)
	Dimensões: 250mm x 4.6 mm; 5µm de diâmetro de partícula

Tabela 7 - Padrões utilizados na etapa analítica.

SUBSTÂNCIA	MARCA	LOTE	PROPÓSITO
Cafeína	Sigma	22K1257	Analito
1,7-Dimethyluric acid	Sigma	61K2519	Analito
1-Methylxanthine	Sigma	61K4076	Analito
1,7-Dimethylxanthine	Sigma	90K4059	Analito
1-Methyluric acid	Sigma	129H2511	Analito
AFMU	Nestlé Research	Não disponível	Analito
Teobromina	Sigma	71K2541	Padrão interno

Tabela 8 - Reagentes utilizados na etapa analítica.

DESCRIÇÃO
Acetonitrila grau HPLC (100%)
Tetrahidrofurano para HPLC
Ácido Acético Glacial (PA)
Acetato de Etila PA
Dietilformamida - Sigma
Sulfato de Amônio – Carlo Erba
Hidróxido de Sódio – Carlo Erba
Clorofórmio HPLC
Isopropanol HPLC
Água purificada usando Milli-Q

Tabela 9 - Amostras biológicas utilizadas para quantificação analítica.

DESCRIÇÃO
Plasma humano normal (antes e depois da administração de cafeína 200mg)
Urina (antes da administração de cafeína 200mg e das 10 horas após a administração)

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os programas utilizados para as análises estatísticas do estudo foram:

Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)

GraphPad Prism versão 3.00 (GraphPad software, Inc. San Diego, CA, USA)

SPSS 10.0 for Windows

METODOLOGIA

1 ETAPA CLÍNICA – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1.1 Delineamento do Estudo

A pesquisa consistiu de um estudo aberto 82 voluntários sadios, adultos (quarenta homens e quarenta e duas mulheres, não grávidas). Os voluntários qualificados para participar do estudo foram internados por um período de aproximadamente 12 horas, quando receberam um comprimido de 200mg de cafeína seguido por um copo de água de 200mL.

1.2 Seleção dos Voluntários

Foram selecionados 82 voluntários saudáveis por meio de consulta médica, Eletrocardiograma (ECG) e exames laboratoriais.

Uma vez confirmada a higidez, os voluntários foram submetidos a uma entrevista livre para a avaliação das condições emocionais para participar da investigação, antes do início do estudo. Após isso, os voluntários foram esclarecidos de todas as dúvidas restantes, e os que concordaram, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) para participação no estudo.

1.3 Exames Laboratoriais

Os seguintes exames laboratoriais foram realizados nos períodos pré-estudo (período de avaliação para seleção de voluntários saudáveis).

Análise Hematológica: Hemoglobina, Hematócrito, Contagem total e diferencial de leucócitos, Contagem de plaquetas e Velocidade de Hemossedimentação (VHS).

Análise bioquímica: Creatinina, Bilirrubina Total, Proteína Total, Albumina, Glicose em jejum, Fosfatase alcalina, Aspartato-amino-transferase (AST), Alanina-amino-transferase (ALT), Colesterol total, Triglicérides, Ácido úrico e Gama GT.

Sumário de urina: Densidade, pH, Proteínas e Microscopia

1.3.1 Valores de referência dos exames laboratoriais

Os valores utilizados como referência para os exames laboratoriais (ANEXO 1) foram fornecidos pelo laboratório de patologia clínica responsável por estas análises (Laboratório Louis Pasteur).

1.4 Critérios de Inclusão

Os seguintes critérios foram satisfeitos para que os voluntários participassem do estudo.

- Idade entre 18 e 50 anos.
- Índice de massa corpórea de 19 a 30;
- Submetidos a uma história clínica e exame físico, ECG e exames laboratoriais complementares e considerados saudáveis
- Concordou livremente e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos, antes de qualquer procedimento.

1.5 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão adotados foram:

- Resultados dos exames laboratoriais complementares fora dos valores considerados normais ($\pm 10\%$), a menos que fossem considerados clinicamente irrelevantes;

- Fez uso de medicação regular com conhecida atividade sobre o metabolismo da cafeína, dentro das 2 semanas que antecederam o início deste estudo, ou fez uso de qualquer medicação com um período inferior a sete meias vidas do início deste estudo;
- Fumante;
- Fazia uso de Contraceptivos orais;
- Foi internado por qualquer motivo até 4 semanas antes do início deste estudo;
- História de abuso de álcool ou drogas, ou ingeriu bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecedem o período de internação para iniciar o estudo;
- História de doença hepática, renal, epiléptica; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- O voluntário apresentava hipersensibilidade conhecida à cafeína ou a qualquer xantina;
- O voluntário tinha qualquer condição que o impedia de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

1.6 Critérios para retirada do estudo

As seguintes condições foram consideradas como critérios de retirada do estudo:

O voluntário não deseja continuar no estudo, por razões outras que a ocorrência de eventos adversos do fármaco teste; por ex. indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo, efeitos adversos do fármaco, testes laboratoriais anormais julgados de relevância clínica, doença intercorrente requerendo medicação.

1.7 Internamento

Os voluntários foram orientados para se apresentarem para internamento, na Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, aproximadamente às 6:30 horas na manhã do ensaio e permaneceram na UNIFAC até 12 horas após a administração da medicação, retornando no dia seguinte para a coleta de 24 horas após a medicação.

1.7.1 Horários de jejum e de Alimentação:

Os voluntários foram orientados a permanecerem em jejum a partir das 23:00 horas da noite anterior ao ensaio e até 02:00 horas após a ingestão da medicação, quando uma refeição será servida. Em seguida foram oferecidos almoço, lanche e jantar. Líquidos foram permitidos *ad libitum* após a refeição inicial realizada 2 horas após a administração da cafeína.

1.8 Posologia:

Os voluntários receberam um comprimido contendo 200mg de Cafeína por via oral em dose única, com um copo de água (200 mL).

1.9 Coleta de Sangue

As coletas de sangue para determinação das concentrações plasmáticas de cafeína foram obtidas, com "butterfly" (escalpe) ou cateter venoso heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, imediatamente antes da administração de uma das preparações de cafeína e nos seguintes intervalos a partir da administração: 0; 0:05; 0:15; 0:25; 0:35; 0:45; 1:00; 1:15; 1:30; 2; 4; 6; 8; 12 e 24 horas.

A cada intervalo foram coletados 9mL de sangue e colocados em tubos vacutainer de vidro contendo 30μL de heparina. Em seguida foram centrifugadas a 3.000 rpm, na temperatura de 8°C, durante 12 minutos, o plasma foi separado e colocado em dois tubos. Em seguida, os tubos foram devidamente armazenados em freezer, numa temperatura de -20°C, até sua análise.

1.10 Coleta de Urina

Os voluntários foram orientados a esvaziar a bexiga antes da administração da cafeína, quando foi armazenada uma alíquota de urina de 3mL (usada como controle).

A urina total foi armazenada durante as dez horas que sucederam a administração da cafeína. Ao final do período de coleta, cada voluntário teve o seu volume total de urina medido. A urina total foi homogeneizada e desta retirou-se uma alíquota de 5mL para posterior determinação dos metabólitos.

1.11 Efeitos adversos

Foi solicitado aos voluntários que relatassem qualquer evento adverso e a sua data de ocorrência, para que fosse acompanhado clínica e laboratorialmente até que os parâmetros alterados voltassem ao normal. Foi também solicitada a informação se houve ou não a necessidade de medicação adicional. As perguntas realizadas para saber se os voluntários tiveram algum evento adverso foram limitadas a perguntas gerais, tais como: Como vai você?

1.11.1 Definições de efeitos adversos quanto à intensidade

Leve: Experiência adversa facilmente tolerada

Moderada: Experiência adversa desagradável o bastante para interferir na atividade cotidiana.

Severa: Experiência adversa que impossibilita a realização da atividade cotidiana normal.

1.11.2 Relacionamento suposto com a droga experimental

Sem relação: A experiência adversa definitivamente não está relacionada à droga em estudo.

Desconhecida: Há outras causas mais prováveis e não há suspeitas de que a droga seja a causa.

Possível: Não foi demonstrado um relacionamento de causa e efeito direto entre a droga e a experiência adversa, porém, há uma possibilidade razoável de que a droga esteja envolvida.

Provável: Há um relacionamento direto de causa e efeito entre a experiência e a droga em estudo.

1.12 Aspectos éticos

1.12.1 Comitê de Ética

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará, credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/MS.

O Estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edimburgo (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS, bem como Resolução 84/02 de medicamentos genéricos da ANVISA).

1.12.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O “termo de consentimento livre e esclarecido” é uma tradução brasileira originária do termo francês *consentement libre et éclairé*. Esta forma é utilizada nas resoluções da Comissão Nacional de Saúde (CNS – MS), órgão que regula a ética na pesquisa em seres humanos no Brasil.

Segundo a Declaração do Congresso Nacional de Bioética (SIBI), realizado em junho de 2000, o art. 11º, dedicado aos temas da pesquisa e experimentação, relata que “os sujeitos das experimentações deverão dar seu consentimento livre e esclarecido e plenamente informado”.

O termo de consentimento livre e esclarecido é uma condição indispensável na pesquisa com seres humanos. Trata-se de uma decisão voluntária, verbal ou escrita, realizada por uma pessoa autônoma e capaz, selecionada após um processo informativo, para a experimentação consciente dos seus riscos, benefícios e possíveis consequências.

A prática do termo do consentimento livre e esclarecido contribui no exercício da ética dignificando e engrandecendo tanto o voluntário quanto o investigador da pesquisa.

Todos os voluntários selecionados para o estudo receberam explicação sobre a natureza e os objetivos. Foi enfatizado que o trabalho teria a finalidade de pesquisa e que o voluntário não poderia esperar qualquer efeito terapêutico. O voluntário também tinha conhecimento da sua liberdade para se retirar a qualquer momento do estudo sem que isto lhe cause qualquer prejuízo no seu atendimento junto à Unidade de Farmacologia Clínica ou ao Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. Foi solicitado a cada voluntário que, caso concordasse com o protocolo de estudo, assinasse o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação do estudo (anexo 2).

1.12.3 Confidencialidade

Os resultados da avaliação médica, o eletrocardiograma e os exames laboratoriais foram registrados em folha individual de cada voluntário. Todas as informações obtidas durante o estudo, referente ao estado de saúde dos voluntários ficaram disponíveis aos médicos do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. Uma cópia dos exames laboratoriais, realizados no período pré e pós-estudo, foi fornecida ao voluntário, quando solicitada.

2 ETAPA ANALÍTICA – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS METABÓLITOS

2.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação dos metabólitos

Os metabólitos escolhidos para quantificação foram: AFMU – 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil; 1U – 1-metilúrico; 17U – 1,7-dimetilúrico; 1X – metilxantina; 17X – 1,7-dimetilxantina.

A literatura apresenta diversos métodos para quantificação dessas substâncias em urina de voluntários saudáveis e pacientes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - no decorrer do nosso texto estaremos utilizando a sigla HPLC que tem sido aceita internacionalmente) (KRUL,C e HAGEMAN, G;1998; BENDRISS, E, 2000 e BAUD-CAMUS, F.,2001. CAUBET, M. 2002).

O método utilizado em nosso trabalho consistiu de uma adaptação do método descrito por KRUL,C e HAGEMAN, G;1998; utilizando teobromina como padrão interno.

2.1.1 Preparação de soluções padrão e reagentes

A fase móvel utilizada foi composta por uma mistura de duas soluções. A solução A (acetonitrila, tetrahydrofurano, ácido acético e água). Que foi preparada em um balão volumétrico (com capacidade para 1000mL) onde foram adicionados 44mL de acetonitrila, 2,5mL de tetrahydrofurano, 1mL de ácido acético e completado o volume com água Mille-Q. A solução obtida foi cuidadosamente homogeneizada, sendo todo o processo de preparação realizado dentro de uma capela. A Solução B era composta apenas de acetonitrila.

A solução estoque de AFMU foi preparada na concentração de 1mg/mL, diluída em uma solução de dimetilformamida e acetato de etila (1:20 v/v).

A solução estoque de teobromina foi preparada na concentração de 2mg/mL em fase móvel, com fácil dissolução.

As soluções estoque de 1X e 1U foram preparadas na concentração de 2,5mg/mL, diluídas em fase móvel. As soluções de 1X e 1U necessitaram da adição de 0,05mL e 0,1mL de NaOH - 1N, em cada 1mL de fase móvel, para facilitar a dissolução.

A solução estoque de 17U foi preparada na concentração de 2mg/mL em fase móvel, e necessitou da adição de 0,08mL de NaOH - 1N, em cada 1mL de fase móvel, para facilitar a dissolução.

A solução estoque de 17X foi preparada na concentração de 2,5mg/mL em fase móvel, com fácil dissolução.

Para fins de validação do método, os cinco metabólitos foram agrupados numa solução denominada pool de metabólitos. A solução pool mãe foi preparada numa concentração de 100µg/mL, onde todos os metabólitos estavam na mesma concentração. Esta solução pool mãe foi alicotada e estocada a -70°C, para garantir a estabilidade. A solução pool mãe de metabólitos (100µg/mL em fase móvel) foi diluída nas concentrações de 1; 2; 4; 8; 16 e 32µg/mL.

As soluções utilizadas no processo de extração foram: uma solução de clorofórmio e álcool isopropílico (4:1 v/v) para extração e uma solução de ácido acético 0,05% para ressuspensão.

2.1.2 Preparação das amostras da curva de calibração

Os padrões de calibração foram preparados na matriz biológica (urina); quando uma amostra de urina branca, devidamente estocada (-20°C) foi descongelada.

Os padrões de curva de calibração foram preparados contaminando a urina branca com a solução pool mãe dos metabólitos nas seguintes concentrações: 1; 2; 4; 8; 16 e 32µg/mL. Uma concentração fixa de padrão interno (teobromina 10µg/mL) foi adicionada a todas as amostras de urina contaminada, antes da extração.

2.1.3 Extração das amostras de urina

Os procedimentos utilizados na extração das amostras de urina dos voluntários e das amostras de urina contaminadas com metabólitos (solução pool mãe) para realização da curva de calibração foram os mesmos.

Todas as amostras de urina foram descongeladas até temperatura ambiente. O processo de extração consistiu das seguintes etapas:

- Separar num tubo de ensaio tipo Falcon uma alíquota de 200µL de urina;
- Adicionar 200µL de Teobromina a 10µg/mL;
- Adicionar 120mg de Sulfato de amônio;
- Misturar em vortex, por 30 segundos;
- Adicionar 6mL da solução de extração (Clorofórmio: Álcool isopropílico – 4:1 v/v);
- Centrifugar a 1000g por 10 minutos;
- Remover a fase aquosa cuidadosamente (camada superior);
- Colocar a fase orgânica num tubo de ensaio de vidro; e
- Secar completamente com vapor de Nitrogênio, no *dry-bloc*, numa temperatura de 37°C;
- Ressuspender com 1mL de ácido acético a 0,05%.

A solução final foi colocada (cerca de 400µL) em “microvials” que posteriormente foram lacrados e acondicionados na bandeja do injetor automático (SIL-10ADVP). Alíquotas de 20µL foram injetadas automaticamente no sistema de cromatografia líquida.

Todas as etapas de extração das amostras foram realizadas numa capela de fluxo laminar vertical, para evitar exposição às soluções de reagentes tóxicos e voláteis.

2.1.4 Recuperação

Preliminarmente, a recuperação dos metabólitos e do padrão interno foi avaliada, comparando uma amostra de urina contaminada com os padrões e, posteriormente, submetida ao processo de extração, anteriormente descrito, com uma amostra dos padrões não submetida ao processo de extração. A recuperação foi expressa como percentagem.

Os testes de recuperação foram realizados em três concentrações distintas, uma baixa uma média e uma alta e cada uma delas em duplicata.

2.1.5 Condições Cromatográficas

Um aparelho de cromatografia líquida de alta performance (no decorrer do nosso texto estaremos utilizando a sigla HPLC que tem sido empregado internacionalmente) da marca Shimadzu, com bomba, misturador, degaseificador, auto-injetor, forno para guarda de coluna analítica, coluna analítica Shinpack C-18/ CLC-ODS (M) – 250mm x 4,6(mm) e detector ultravioleta foi utilizado.

A pressão máxima do sistema foi estabelecida em 250kgf. A coluna operou a uma temperatura de 35°C. A temperatura do auto-injetor foi de 4°C e o volume de injeção foi de 20µL.

A fase móvel foi dividida em A (tetrahydrofurano, ácido acético e água; 5:1:996 v/v) e B (acetonitrila). As corridas analíticas desenvolveram-se num gradiente binário entre as fases A e B na seguinte proporção: de 0 a 20 minutos 99% de A e 1% de B; de 21 a 28 minutos 67% de A e 33% de B; de 29 a 40 minutos 99% de A e 1% de B.

O fluxo foi de 1mL/min, o tempo total de corrida foi de vinte minutos. A fase móvel na coluna foi injetada e monitorizada pelo detector ultravioleta no comprimento de onda 273nm.

2.1.6 Precisão e Acurácia

A precisão e a acurácia foram calculadas para amostras de calibração. Os experimentos da curva de calibração foram feitos em duplicata.

2.2 Determinação da atividade das enzimas CYP1A2, NAT2, CYP2A6 e XO

A atividade enzimática, ou fenótipo da enzima, pode ser determinada pela avaliação das concentrações urinárias de seus substratos e produtos metabólicos, desta forma trabalhos como o de BENDRISS em 2000 demonstram que a razão molar das taxas de metabólitos servem como forma de mensuração da atividade enzimática.

Os principais metabólitos urinários da cafeína que têm sido usados para determinar a atividade metabólica das enzimas CYP1A2, CYP2A6 e XO são: 17U (Ácido 1,7-Dimetilúrico), 17X (1,7-Dimetilxantina ou paraxantina), 1U (Ácido 1-Metilúrico), 1X (1-Metilxantina), AFMU (5-Acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil). (BENDRISS, 2000)

De acordo com BAUD-CAMUS, 2001 e colaboradores o fenótipo da enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2) pode ser determinado pela razão: $[AFMU] / [AFMU + 1X + 1U]$.

Para as demais enzimas as razões serão: $[AFMU + 1X + 1U] / 17U$ para CYP1A2; $17U / [AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U]$ para CYP2A6 e $1U / [1X + 1U]$ para XO.

2.3 Avaliação do Fenótipo das enzimas CYP1A2, NAT2, CYP2A6 e XO

A avaliação dos fenótipos das enzimas estudadas foi realizada por estatística descritiva com representação gráfica por de histograma, Normal Q-Q Plot e Detrended Normal Q-Q Plot; os quais indicam a tendência de normalidade ou não da distribuição dos valores obtidos para a atividade enzimática.

2.4 Classificação da atividade enzimática dos voluntários

Posteriormente à determinação da atividade enzimática e constatação ou não de tendência a normalidade nas distribuições destes valores; os voluntários foram categorizados em grupos de oito classificados na origem crescente de atividade para cada uma das enzimas.

Os voluntários classificados nos grupos extremos (maior e menor atividade enzimática) foram escolhidos para posterior determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

Os voluntários com menor atividade enzimática foram classificados no grupo ME e receberam a seguinte codificação: CYP1A2-ME (para os oitos voluntários com menor atividade enzimática da CYP1A2), NAT2-ME (para os oitos voluntários com menor atividade enzimática da NAT2), CYP2A6-ME (para os oitos voluntários com menor atividade enzimática da CYP2A6) e XO-ME (para os oitos voluntários com menor atividade enzimática da XO).

Os voluntários com maior atividade enzimática foram classificados no grupo MA e receberam a seguinte codificação: CYP1A2-MA (para os oitos voluntários com maior atividade enzimática da CYP1A2), NAT2-MA (para os oitos voluntários com maior atividade enzimática da NAT2), CYP2A6-MA (para os oitos voluntários com maior atividade enzimática da CYP2A6) e XO-MA (para os oitos voluntários com maior r atividade enzimática da XO).

3 ETAPA ANALÍTICA – DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

3.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação da cafeína

A literatura apresenta diversos métodos para quantificação da cafeína em plasma de voluntários saudáveis e pacientes por HPLC (NEWTON, L.1981; BONATI, M. 1982; BLANCHARD, J. 1983; BENDRISS, E, 2000 e KAMIMORI, G.H.2001).

Em nosso trabalho, utilizamos o método descrito para determinação dos metabólitos, com alguma adaptações, constituindo-se um método simples e adequado para a quantificação da cafeína em plasma humano por HPLC, utilizando a teobromina como padrão interno.

3.1.1 Preparação de soluções padrão e reagentes

As soluções preparadas foram diluídas numa solução de diluição, semelhante à fase móvel, composta por uma mistura de acetonitrila, tetrahidrofurano, ácido acético e água na

proporção 100:2,5:1:896,5 v/v. Em um balão volumétrico (com capacidade para 100mL) foi adicionado 10mL de acetonitrila, 250µL de tetrahidrofurano, 100µL de ácido acético e completado o volume com água Mille-Q. A solução obtida foi cuidadosamente homogeneizada, sendo todo o processo de preparação realizado dentro de uma capela.

A solução estoque de cafeína foi preparada na concentração de 2mg/mL, diluída na solução de diluição.

A solução estoque de teobromina foi preparada na concentração de 1mg/mL diluída na solução de diluição.

As soluções utilizadas no processo de extração foram: uma solução de dietiléter e diclorometano (70:30 v/v) para extração e uma solução de diluição para ressuspensão.

3.1.2 Preparação das amostras da curva de calibração

Os padrões de calibração foram preparados na matriz biológica (plasma); quando uma amostra de plasma branco, devidamente estocada (-20°C) foi descongelada.

Os padrões de curva de calibração foram preparados contaminando o plasma branco com a solução de cafeína nas seguintes concentrações: 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16µg/mL. Uma concentração fixa de padrão interno (teobromina 5µg/mL) foi adicionada a todas as amostras de plasma contaminado, antes da extração

3.1.3 Extração das amostras de plasma

Os procedimentos utilizados na extração das amostras de plasma dos voluntários e das amostras de plasma contaminadas com cafeína para realização da curva de calibração foram os mesmos.

Todas as amostras de plasma foram descongeladas até temperatura ambiente. O processo de extração consistiu das seguintes etapas:

- Separar num tubo de ensaio tipo Falcon uma alíquota de 500µL de plasma;

- Adicionar 500µL de Teobromina a 5µg/mL;
- Adicionar 4mL da solução de extração (Dietiléter:Diclorometano – 70:30 v/v);
- Centrifugar a 3000rpm por 15 minutos, na temperatura de 25°C;
- Remover a fase aquosa cuidadosamente (camada superior);
- Colocar a fase orgânica num tubo de ensaio de vidro;
- Secar completamente com vapor de Nitrogênio, no *dry-bloc*, numa temperatura de 30°C;
- Ressuspender com 400µL da solução de diluição.

A solução final foi colocada em “microvials” que posteriormente foram lacrados e acondicionados na bandeja do injetor automático (SIL-10ADVP). Aliquotas de 20µL foram injetadas automaticamente no sistema de cromatografia líquida.

Todas as etapas de extração das amostras foram realizadas numa capela de fluxo laminar vertical, para evitar exposição às soluções de reagentes tóxicos e voláteis.

3.1.4 Recuperação

Preliminarmente, a recuperação da cafeína e da teobromina (do padrão interno) foi avaliada comparando uma amostra de plasma contaminada com o padrão de cafeína e posteriormente submetida ao processo de extração descrito no item 3.1.3, com uma amostra do padrão de cafeína não submetida ao processo de extração. A recuperação foi expressa como percentagem.

Os testes de recuperação foram realizados em três concentrações distintas, uma baixa uma média e uma alta e cada uma delas em duplicata.

3.1.5 Condições Cromatográficas

Um HPLC Shimadzu, com bomba, misturador, degaseificador, auto-injetor, forno para guarda de coluna analítica, coluna analítica Shinpack C-18/ CLC-ODS (M) – 250mm x 4,6mm) e detector ultra-violeta foi utilizado.

A pressão máxima do sistema foi estabelecida em 250kgf. A coluna operou a uma temperatura de 35°C. A temperatura do auto-injetor foi de 4°C e o volume de injeção foi de 20µL.

A fase móvel foi dividida em A (tetrahidrofurano, ácido acético e água; 5:1:996 v/v) e B (acetonitrila). As corridas analíticas desenvolveram-se num gradiente binário entre as fases A e B na seguinte proporção: de 0 a 10 minutos 82% de A e 18% de B; de 10 15 minutos 60% de A e 40% de B; de 15 a 20 minutos 82% de A e 18% de B.

O fluxo foi de 1mL/min, o tempo total de corrida foi de vinte minutos. A fase móvel na coluna foi injetada e monitorizada pelo detector ultravioleta no comprimento de onda 273nm.

3.1.6 Precisão e Acurácia

A precisão e a acurácia foram calculadas para amostras de calibração. Os experimentos da curva de calibração foram feitos em duplicata.

3.2 Parâmetros farmacocinéticos determinados

Os parâmetros farmacocinéticos calculados em nosso protocolo foram:

ASC₀₋₂₄: área sob a curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo; do tempo 0 (zero) ao tempo 24h (vinte e quatro), calculada pelo método trapezoidal.

ASC_[0-∞] ou ASC_[0-inf]: área sob a curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo; do tempo 0 (zero) ao tempo infinito, calculada pelo método trapezoidal; onde $ASC_{[0-inf]} = ASC_{0-24} + Ct\ 24 / \lambda_z$

C_{max}: Pico de concentração máxima do fármaco, obtido diretamente dos dados;

T_{max}: Tempo para atingir o C_{max}

t_{1/2}: Meia-vida de eliminação

CL: Clearance sistêmico

ke: Constante de eliminação terminal

Vd/kg: Volume de distribuição por kilograma.

4 COMPARAÇÃO COM OUTRO ESTUDO FARMACOCINÉTICO

4.1 Escolha do fármaco

Para efeito de comparação de nossos dados com outros estudos farmacocinéticos, escolhemos como fármaco alvo o propranolol que é conhecidamente um substrato da enzima CYP1A2.

4.2 Metodologia de comparação

Analizamos os dados experimentais do estudo farmacocinético de uma formulação de propranolol 40mg administrada a quarenta e oito voluntários saudáveis a fim de comparar com os nossos resultados. A comparação se deu através da análise da distribuição de frequência das ASC dos voluntários e da estatística descritiva desses valores, para posterior identificação de seu padrão (normal ou não).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de atividade enzimática para CYP1A2, CYP2A6, NAT2 e XO foram analisados pelo histograma e os gráficos Quantil-Quantil; através do programa SPSS for Windows (versão 10).

A concentração máxima (C_{max}) foi calculada através da observação nos dados de concentração plasmática identificando o maior valor.

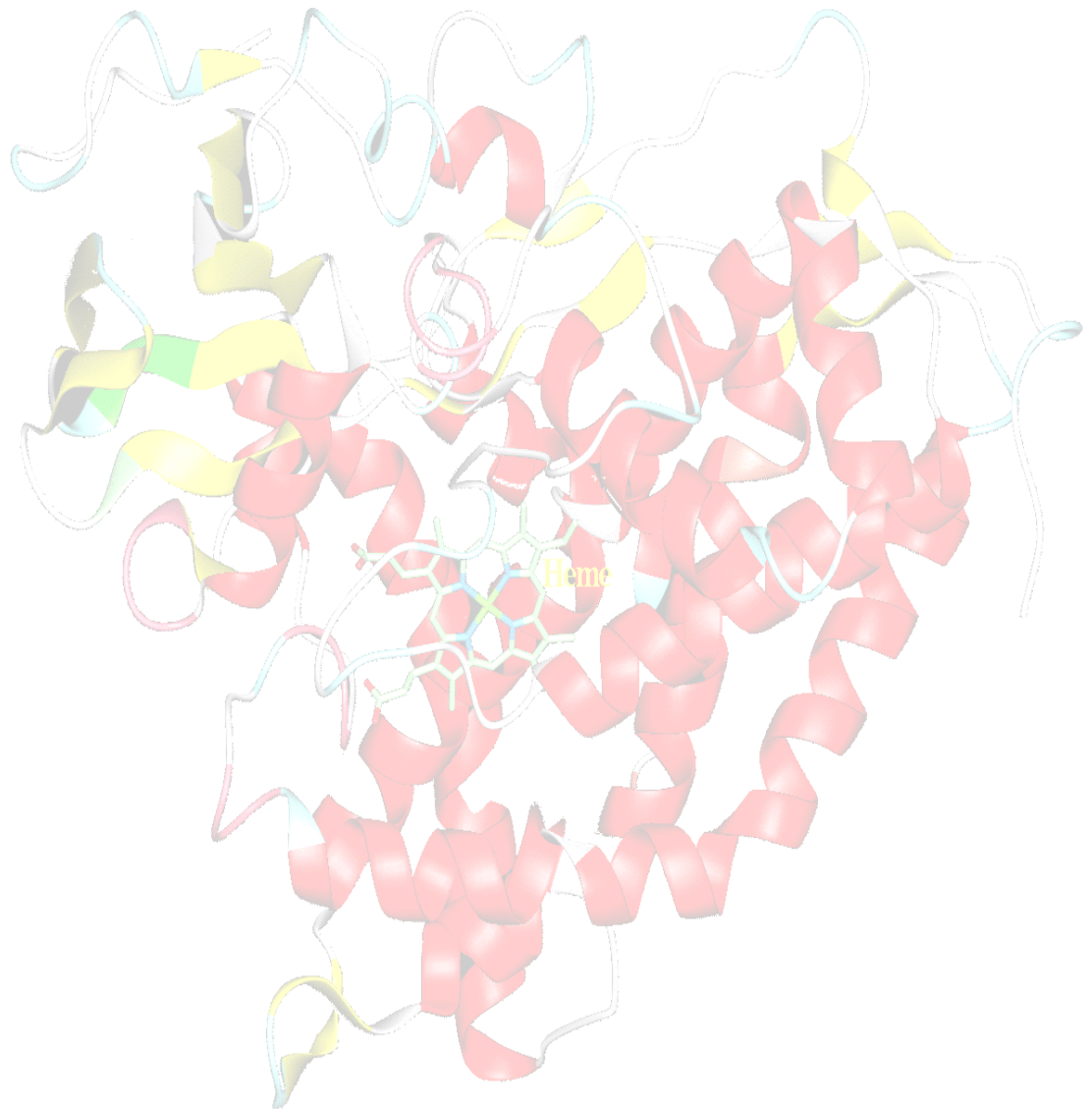
O tempo para atingir o C_{max} (T_{max}) foi observado diretamente dos dados e sua análise feita pela mediana.

A constante de eliminação terminal (k_e) de primeira ordem foi estimada por regressão linear dos pontos da fase de eliminação numa plotagem log-linear. A análise foi feita através de média e desvio padrão.

A meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculada pela regressão da concentração semilogarítmica *versus* tempo. A análise foi feita através de média e desvio padrão.

A análise das áreas sob a curva (ASC_{0-24} e $ASC_{0-\infty}$) foi realizada pela média e desvio padrão.

Todos os parâmetros farmacocinéticos dos grupos de voluntários MA e ME de cada enzima avaliada foram comparados pelo teste paramétrico t-Student e pelo teste não paramétrico Wilcoxon, através do programa SPSS for Windows (versão 10).



Resultados

RESULTADOS

Nossos resultados estão divididos em três grupos, dados clínicos, determinação analítica dos metabólitos e determinação e análise dos parâmetros farmacocinéticos.

1 DADOS CLÍNICOS

1.1 Avaliação Clínica

Foram avaliados 82 indivíduos, 40 do sexo feminino e 42 do sexo masculino, com idade variando de 18 a 47 anos, idade média de 25 ($\pm 6,43$) anos e mediana em 22 anos. O índice de massa corpórea na consulta inicial, variou de 18,86 – 29,76 kg/m² com valor da média 22,86 ($\pm 2,93$) kg/m² e mediana 22,46 kg/m².

Na avaliação inicial as médias das pressões sistólica e diastólica foram respectivamente: 112 ($\pm 12,03$) mmHg e 72 ($\pm 9,22$) mmHg. Quanto à frequência de pulso a média foi 73 ($\pm 8,10$) batimentos por minuto (bpm).

1.1.1 Exame Cardiológico

O ECG convencional de todos os voluntários, realizado na avaliação inicial, foi considerado normal ou anormal sem significado clínico.

1.1.2 Eventos Adversos

Os comprimidos de cafeína foram bem tolerados pelos voluntários. Um voluntário relatou mal estar gástrico, de leve intensidade, no dia do internamento. Outro voluntário apresentou um episódio de hipertensão no mesmo dia, fazendo uso de medicação concomitante (captopril 25mg), este evento adverso não foi considerado pelos pesquisadores associado à ingestão de cafeína.

1.1.3 Exames de Patologia Clínica

Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos realizados na avaliação inicial dos voluntários confirmaram o estado de higidez. Todos foram considerados normais ou com anormalidades sem significância clínica. Os parâmetros hematológicos foram descritos sob a forma de média, desvio padrão e mediana e estão apresentados na tabela 10. Os valores de referência estão descritos na tabela 26 (anexo I).

Tabela 10. Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros hematológicos dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).

DADOS HEMATOLÓGICOS – HOMENS (N = 40)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
Hemoglobina	15,07	0,83	15,25
Hematócrito	44,5	2,32	44,65
Plaquetas	246,24	49,75	249
Leucócitos totais	6,9	1,6	6,65
Bastões	1	0	1
Segmentados	53,92	12	54
Eosinófilos	5,12	2,47	5
Basófilos	0,52	0,51	1
Linfócitos	30,31	9,6	30
Monócitos	7,69	1,42	8
DADOS HEMATOLÓGICOS – MULHERES (N = 42)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
Hemoglobina	12,77	0,85	12,75
Hematócrito	38,26	2,58	38,25
Plaquetas	257,60	54,23	244,5
Leucócitos totais	7,04	1,61	6,75
Bastões	1	0	1
Segmentados	58,26	8,03	59
Eosinófilos	4,4	2,38	4
Basófilos	0,49	0,51	0
Linfócitos	28,35	80,03	29
Monócitos	7,05	1,72	6

Os parâmetros bioquímicos foram divididos em três grupos: parâmetros de função hepática, renal e metabólica e os valores encontrados estão representados nas tabelas 02, 03 e

04 respectivamente como média, desvio padrão e mediana. Os valores de referência estão descritos nas tabelas 27, 28e 29 (anexoI).

Tabela 11. Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros de função hepática dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).

PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA – HOMENS (N = 40)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
TGO (AST)	21,64	5,16	21
TGP (ALT)	21,37	7,9	19,95
Gama GT	22,64	11,31	20
Fosfatase Alcalina	171,83	45,03	180
Proteína Total	7,24	0,33	7,28
Bilirrubina	0,8	0,28	0,7
PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA – MULHERES (N = 42)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
TGO (AST)	17,82	4,08	17
TGP (ALT)	16,76	8,76	15
Gama GT	16,56	8,49	16
Fosfatase Alcalina	153,97	36,89	149
Proteína Total	7,10	0,33	7,1
Bilirrubina	0,6	0,22	0,54

Tabela 12- Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros de função renal dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).

PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL – HOMENS (N = 40)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
Creatinina	0,86	0,14	0,9
Clearance de Creatinina	135,19	34,02	127,67
PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL – MULHERES (N = 42)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
Creatinina	0,63	0,11	0,6
Clearance de Creatinina	149,77	34,46	148,97

Tabela 13- Médias, desvio padrão e medianas dos parâmetros de função metabólica dos voluntários selecionados para o estudo de biodisponibilidade da cafeína, valores correspondentes à avaliação realizada antes do internamento dos voluntários (pré-estudo).

PARÂMETROS DE FUNÇÃO METABÓLICA – HOMENS (N = 40)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
Glicose	87,36	6,44	87
Ácido Úrico	5,28	0,91	5,4
Colesterol Total	164,45	31,73	163
Triglicérides	100,24	47,88	93
PARÂMETROS DE FUNÇÃO METABÓLICA – MULHERES (N = 42)			
PARÂMETROS	MÉDIA	SD	MEDIANA
Glicose	85,70	7,12	85
Ácido Úrico	3,89	0,84	3,85
Colesterol Total	167,33	29,26	159,5
Triglicérides	80,75	31,68	68,5

2 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS METABÓLITOS

2.1 Método Analítico

2.1.1 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos metabólitos da cafeína (1U – 1-metilúrico; 17U – 1,7-dimetilúrico; 1X – metilxantina; 17X – 1,7-dimetilxantina e AFMU – 5-acetilamino-6-formilamino-3metiluracil).

O método desenvolvido mostrou-se específico para os cinco metabólitos (1U, 17U, 1X, 17X e AFMU) e o padrão interno (teobromina), obtendo-se boa separação destes compostos entre si, bem como dos componentes da urina. Os tempos de retenção encontrados foram: AFMU – 4,488; 1U – 5,698; 1X – 6,909; 17U – 12,610; 17X – 14,140 e Teobromina – 9,144 minutos. A figura abaixo apresenta o gráfico dos picos dos cinco metabólitos e do padrão interno em urina repicada, demonstrando uma separação adequada entre os picos das substâncias avaliadas.

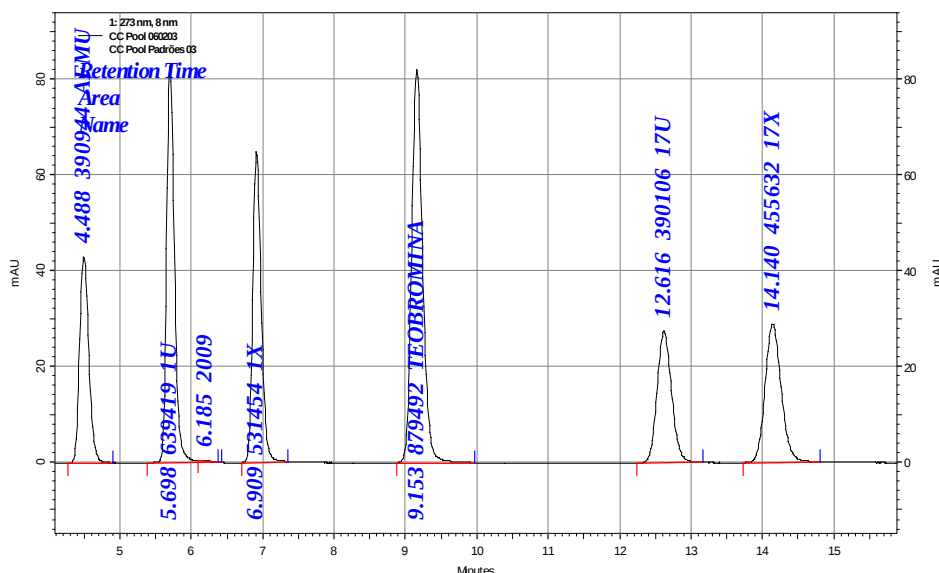


Figura 4 - Cromatograma da urina repicada com os metabólitos: AFMU, 1U, 1X, 17U, 17X; e o padrão interno: Teobromina, após a extração com clorofórmio e isopropanol (4:1), mostrando o grau de separação entre as substâncias analisadas.

A recuperação média da extração foi de 55,31% para AFMU; 86,96% para 1U; 79,24% para 1X; 62,41% para 17U e 75,61% para 17X.

O método escolhido foi linear nas concentrações testadas de 0,5; 1; 2; 4, 8 e 16µg/mL para a quantificação do metabólito 1U, e permitindo linearidade até 16µg/mL com um coeficiente de correlação (r) maior que 0,95 para 1U ($r = 0,98870$). A figura 5 apresenta a curva de calibração do metabólito 1U e a tabela 14 apresentam os parâmetros relativos à equação da curva de calibração.

Para os demais metabólitos (AFMU, 1X, 17U e 17X) o método escolhido foi linear nas concentrações testadas de 2, 4, 8, 16 e 32µg/mL e permitindo linearidade até 32µg/mL com um coeficiente de correlação (r) maior que 0,95 para todos os metabólitos sendo estes: AFMU ($r = 0,99858$), 1X ($r = 0,99854$, 17U) ($r = 0,99916$) e 17X ($r = 0,99822$). As figuras 6, 7, 8 e 9 apresentam as curvas de calibração dos metabólitos e as tabelas 15, 16, 17 e 18 representam os parâmetros relativos às suas equações das curvas de calibração.

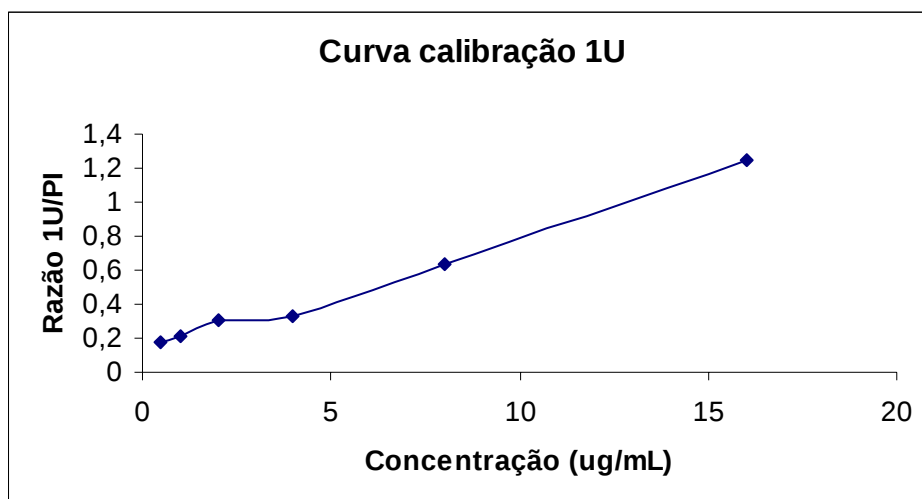


Figura 5 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 1U em urina por HPLC na faixa de concentração entre 0,5 e 16µg/mL

Tabela 14 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 1U em urina por HPLC na faixa de concentração de 0,5 a 16µg/mL.

PARÂMETRO	VALOR
Inclinação (a)	0,0679
Intercepto (b)	0,1292
Coeficiente de Correlação (r)	0,98870

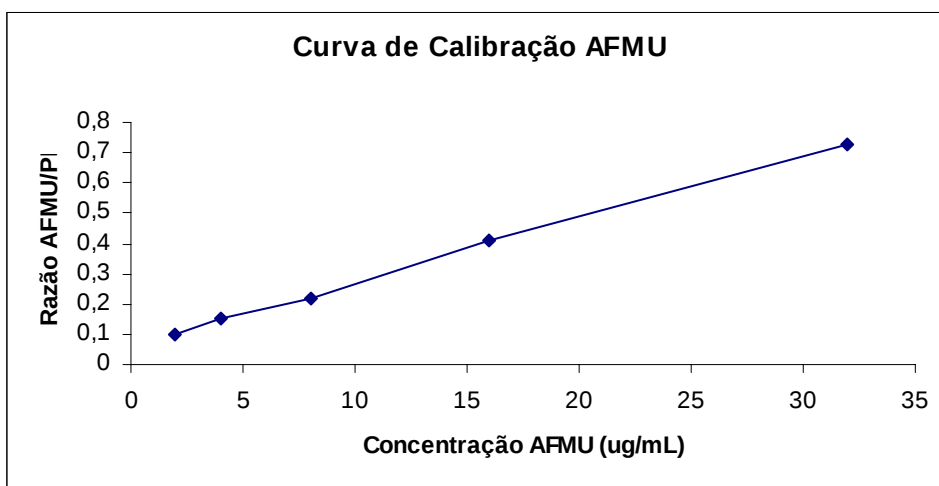


Figura 6 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de AFMU em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32µg/mL.

Tabela 15 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do AFMU em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.

PARÂMETRO	VALOR
Inclinação (a)	0,0210
Intercepto (b)	0,0589
Coeficiente de Correlação (r)	0,99858

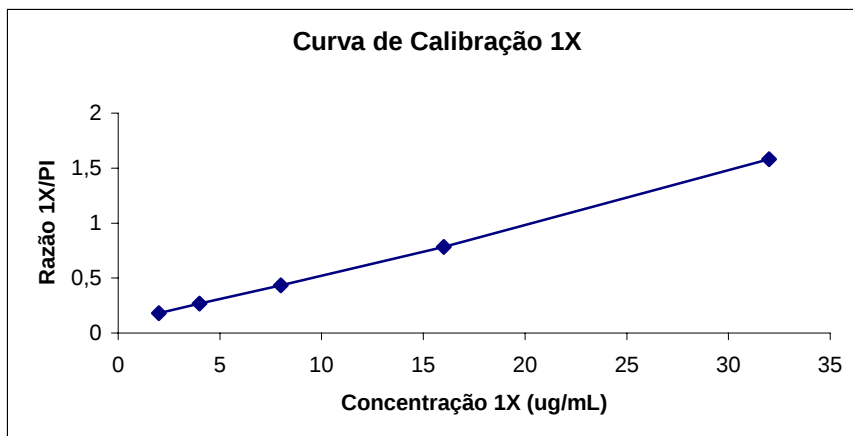


Figura 7 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 1X em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32 μ g/mL.

Tabela 16- Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 1X em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32 μ g/mL.

PARÂMETRO	VALOR
Inclinação (a)	0,0466
Intercepto (b)	0,0723
Coefficiente de Correlação (r)	0,99854

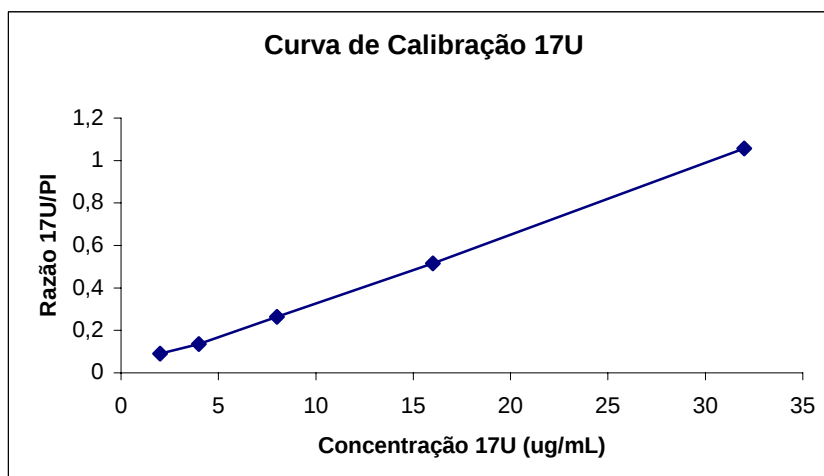


Figura 8 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 17U em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32 μ g/mL.

Tabela 17. Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 17U em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.

PARÂMETRO	VALOR
Inclinação (a)	0,0325
Intercepto (b)	0,0094
Coefficiente de Correlação (r)	0,99916

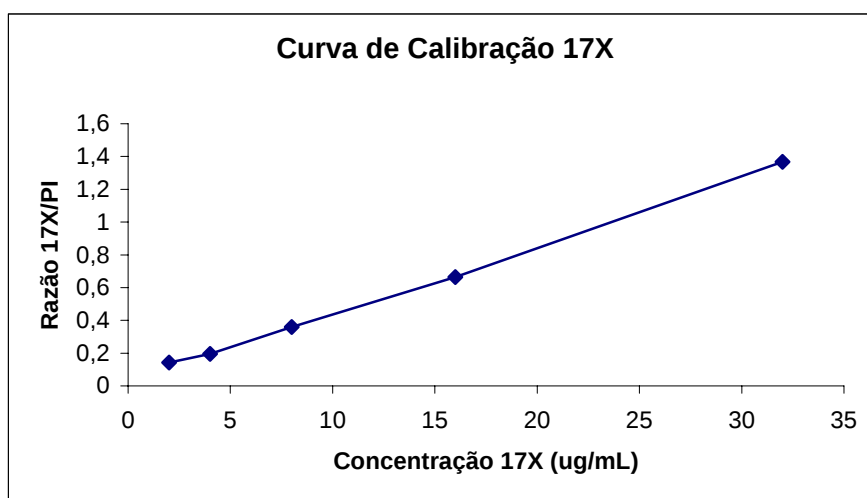


Figura 9 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de 17X em urina por HPLC na faixa de concentração entre 2 e 32µg/mL.

Tabela 18 -Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação do 17X em urina por HPLC na faixa de concentração de 2 a 32µg/mL.

PARÂMETRO	VALOR
Inclinação (a)	0,0412
Intercepto (b)	0,0354
Coefficiente de Correlação (r)	0,99822

A precisão média foi de 1,66% para AFMU; 1,01% para 1U; 0,55% para 1X; 0,25% para 17U e 0,20% para 17X. A exatidão média foi de 100,59% para o AFMU; 99,92% para 1U; 98,92% para 1X; 99,27% para 17U e 98,88% para 17X. Por definição, o coeficiente de

variação (CV) para a precisão não pode exceder 15% para cada concentração analisada (tolerância de até 20% da concentração do limite de quantificação). Em se tratando da acurácia, o CV deve estar dentro de 15% do valor atual em relação à média das amostras de cada concentração (tolerância até 20% da concentração do limite de quantificação). O limite de quantificação do método foi de 2µg/mL para os cinco metabólitos. O menor limite de detecção foi 1µg/mL.

2.2 Determinação da atividade das enzimas CYP1A2, NAT2, CYP2A6 e XO.

Embora tenham sido quantificadas as concentrações urinárias dos cinco metabólitos nos 80 voluntários, um deles (VOL 60) foi considerado “outline” e não foi incluído da quantificação das atividades enzimáticas, totalizando apenas 79 voluntários.

A atividade das enzimas foi determinada através das seguintes razões: $CYP1A2 = (AFMU + 1X + 1U) / 17U$; $CYP2A6 = 17U / (AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U)$; $NAT2 = AFMU / (AFMU + 1X + 1U)$ e $XO = 1U / (1X + 1U)$. As concentrações dos metabólitos foram expressas em suas concentrações molares (g/L). As tabelas 19 e 20 apresentam os valores da estatística descritiva das atividades das enzimas CYP1A2; CYP2A6; NAT2 e XO.

Tabela 19 – Média e Desvio padrão das atividades das enzimas CYP1A2 e CYP2A6 dos 79 voluntários.

VOLUNTÁRIO	CYP1A2	CYP2A6
Média	1,5366	0,2540
Desvio Padrão (SD)	0,7656	0,0641
Mediana	1,3942	0,2551
Variancia	0,586	0,0041
Intervalo de confiança 95%	0,1693 – 3,2425	0,0142 – 0,5223
Valor Mínimo	0,4258	0,0611
Valor Máximo	3,9525	0,4806
Coeficiente Skewness	1,032	0,548
Coeficiente Kurtosis	0,970	2,070

Tabela 20 – Média e Desvio padrão das atividades das enzimas NAT2 e Xantina Oxidase dos 79 voluntários.

VOLUNTÁRIO	NAT2	XANTINA OXIDASE
Média	1,1073	0,2337
Desvio Padrão (SD)	1,2310	0,1140
Mediana	0,6613	0,2142
Variancia	1,515	0,0130
Intervalo de confiança 95%	0,2722 – 2,4868	0,0252 – 0,4926
Valor Mínimo	0,0065	0,0476
Valor Máximo	6,5261	0,5777
Coeficiente Skewness	1,896	0,912
Coeficiente Kurtosis	4,416	0,607

A estatística descritiva dos valores de atividade enzimática para CYP1A2, NAT2, XO e CYP2A6 indicou que eles não correspondem a uma distribuição normal, já que seus coeficientes de Skewness (coeficiente de assimetria) Kurtosis (coeficiente de achatamento) foram diferentes de zero; no entanto, os valores de atividade da NAT2 foram os que melhor caracterizaram esta não normalidade.

2.3 Avaliação dos fenótipos das enzimas estudadas

A avaliação dos fenótipos das enzimas estudadas foi realizada através de estatística descritiva com representação gráfica por de histograma, Normal Q-Q Plot e Detrended Normal Q-Q Plot; os quais indicam a tendência de normalidade ou não da distribuição dos valores obtidos para a atividade enzimática.

2.3.1 CYP1A2

A distribuição de frequência dos valores encontrados para a atividade da enzima CYP1A2 demonstrou uma distribuição não normal, com tendência a trimodalidade.

A figura 10 representa o histograma da distribuição de frequência dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de oitenta e um voluntários avaliados.

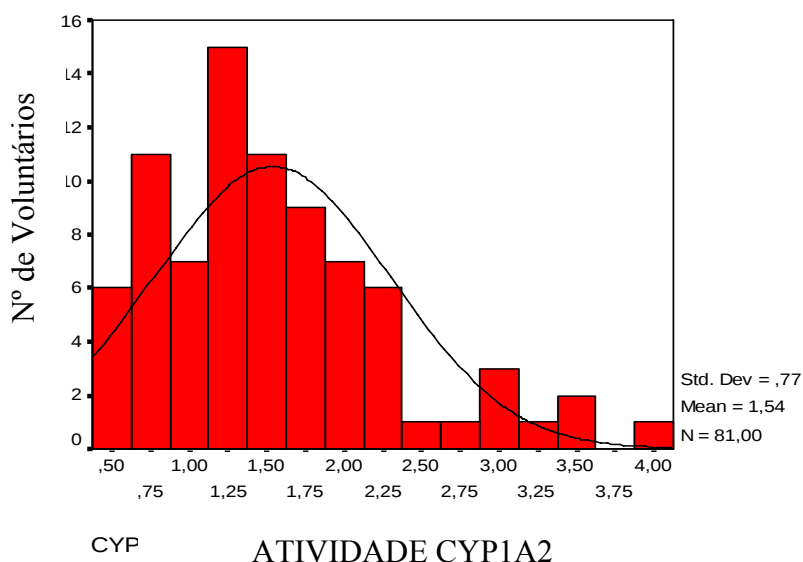


Figura 10 - Histograma dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. A curva indica a distribuição normal esperada.

As figuras 11 e 12 representam os gráficos quantil-quantil dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de setenta e nove voluntários avaliados.

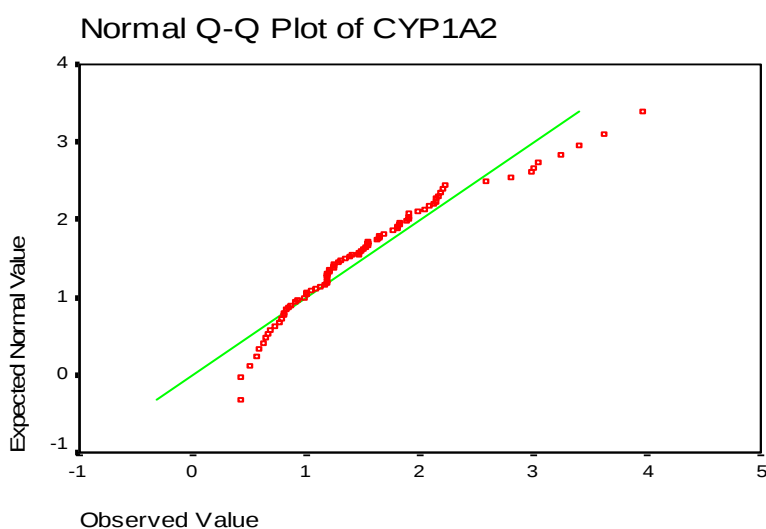


Figura 11 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais.

O gráfico de Normal Q-Q Plot mostrou a existência de dois pontos de quebra (0,75 e 2,5) na distribuição dos valores experimentais de atividade enzimática, estes ponto podem ser usados como divisor entre os fenótipos metabolizadores, dividindo os voluntários em três grupos: os metabolizadores insuficientes (12,66%), os metabolizadores intermediários (75,95%) e os metabolizadores extensos (11,39%).

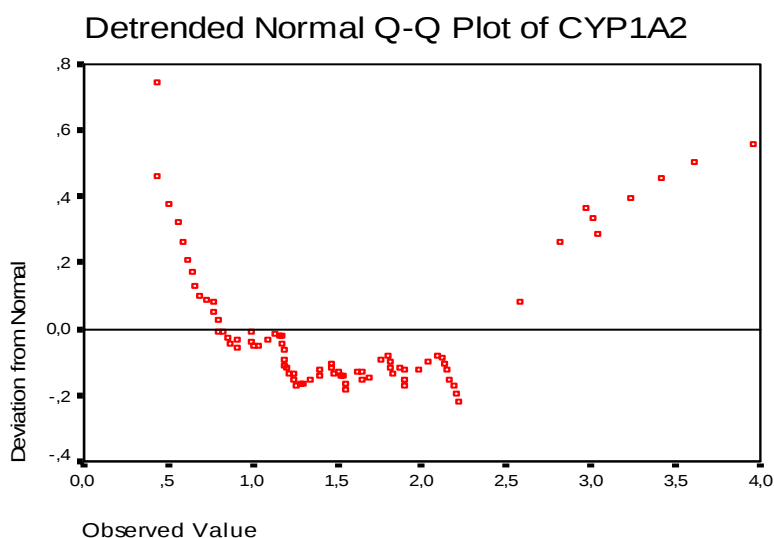


Figura 12 - Gráfico da análise pelo teste Q-Q dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal.

2.3.2 CYP2A6

Embora os testes de normalidade tenham indicado que a distribuição de frequência para a atividade enzimática da CYP2A6 seja não normal, os gráficos apresentados não apresentaram tendência a bimodalidade.

A figura 13 representa o histograma e da distribuição de frequência dos valores de atividade da enzima CYP2A6 de oitenta e um voluntários avaliados.

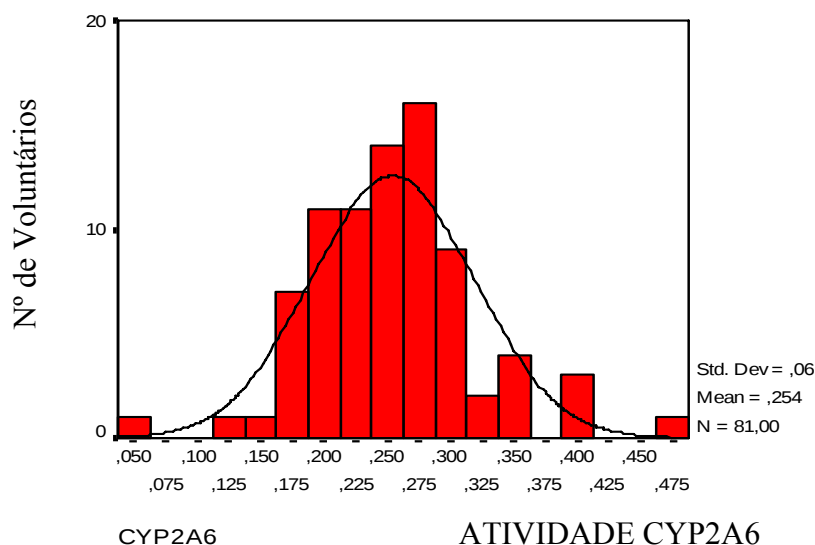


Figura 13- Histograma dos valores de atividade da enzima CYP2A6 de 81 voluntários A curva indica a distribuição normal esperada.

As figuras 14 e 15 representam os gráficos quantil-quantil dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de setenta e nove voluntários avaliados. Embora a estatística descritiva tenha mostrado a não normalidade dos dados, a representação gráfica não demonstra claramente os pontos de quebra, dificultando a avaliação da heterogeneidade da distribuição.

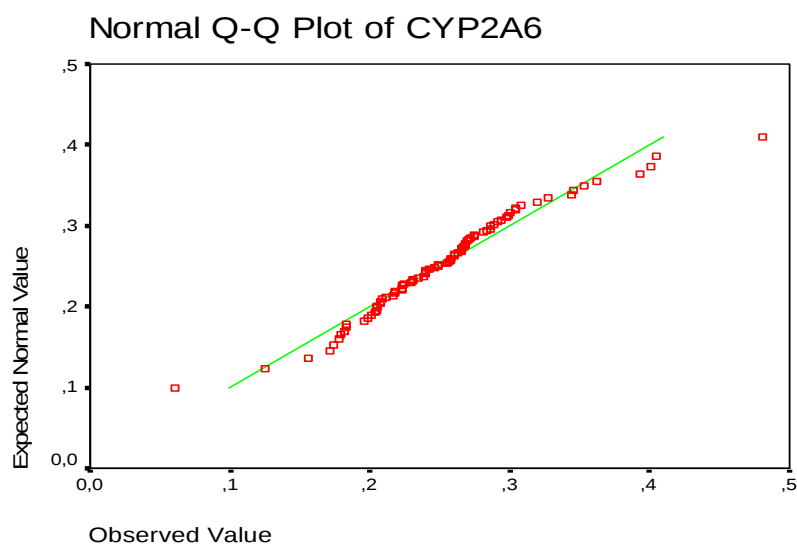


Figura 14 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais.

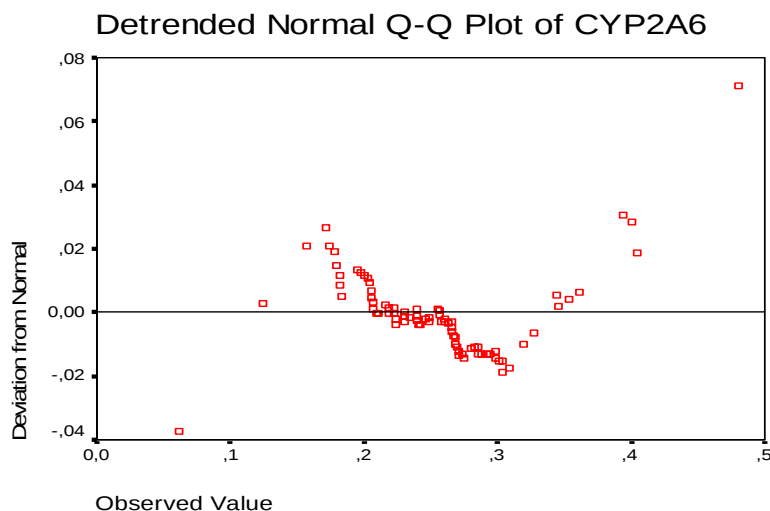


Figura 15 - Gráfico da análise pelo teste Q-Q dos valores de atividade da enzima CYP1A2 de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal.

2.3.3 NAT2

A distribuição de frequência dos valores encontrados para a atividade da enzima NAT2 demonstrou uma distribuição não normal, com tendência a trimodalidade.

A figura 16 representa o histograma da distribuição de frequência dos valores de atividade da enzima NAT2 dos oitenta e um voluntários avaliados. Os voluntários foram classificados como acetiladores lentos, intermediários e rápidos, de acordo com o valor da atividade enzimática. Aqueles que apresentaram atividade inferior a 0,25 ($n = 21$) foram classificados como acetiladores lentos e aqueles com atividade entre 0,25 e 2,5 ($n = 48$) foram classificados como acetiladores intermediários, enquanto os que apresentaram atividade enzimática superior a 2,5 ($n = 10$) foram classificados como acetiladores rápidos. A percentagem de acetiladores lentos foi de 46,83% e de acetiladores rápidos foi de 53,16%.

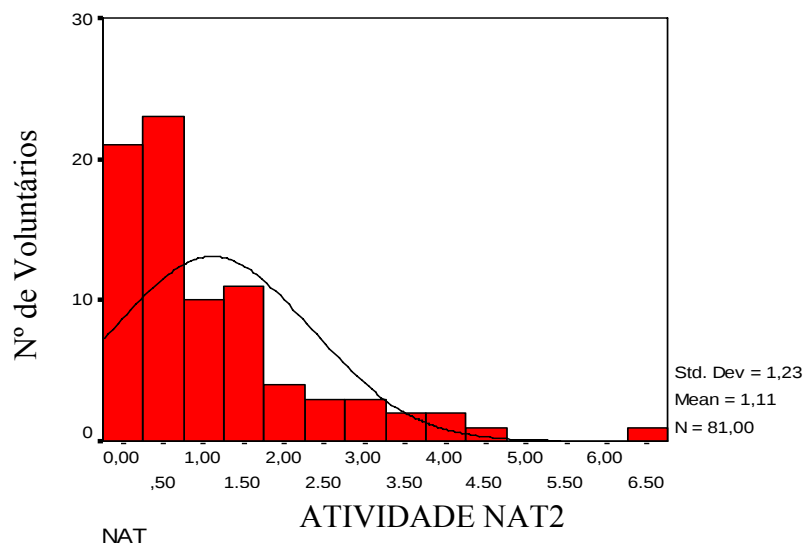


Figura 16 - Histograma dos valores de atividade da enzima NAT2 de oitenta e um voluntários. A curva indica a distribuição normal esperada.

As figuras 17 e 18 representam os gráficos quantil-quantil dos valores de atividade da enzima NAT2 de setenta e nove voluntários avaliados.

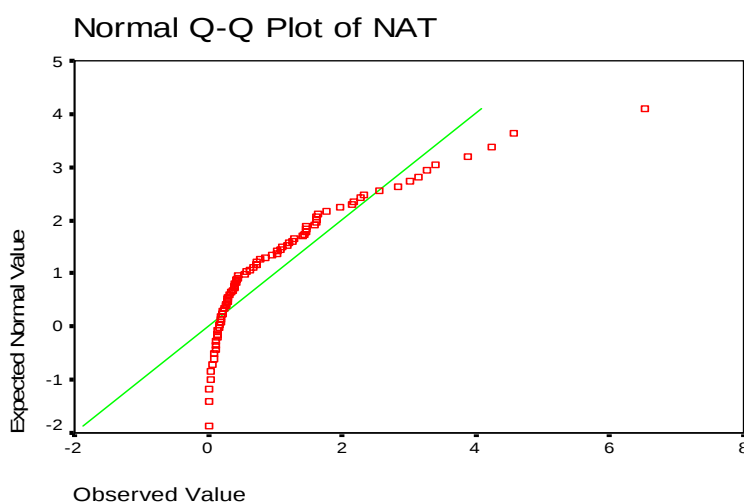


Figura 17 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima NAT2 de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais.

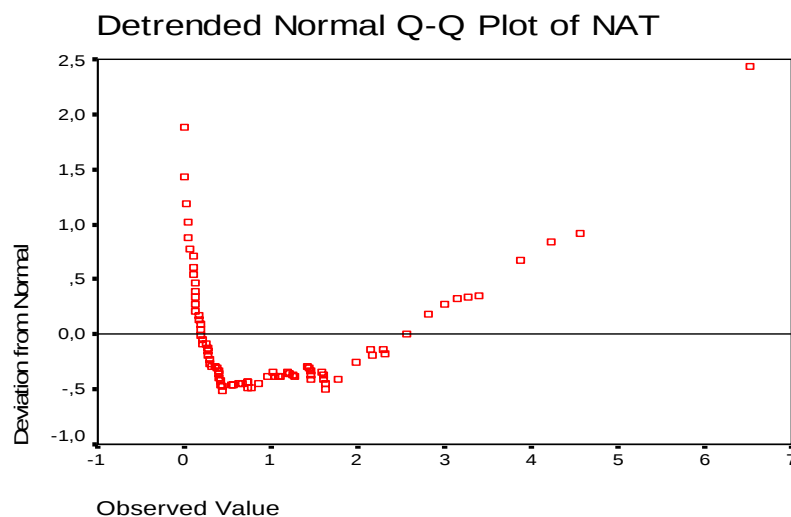


Figura 18 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima NAT2 de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal.

2.3.4 XO

A distribuição de frequência dos valores encontrados para a atividade da enzima XO não apresentou tendência a bimodalidade. A figura 19 representa o histograma da distribuição de frequência dos valores de atividade da enzima XO dos setenta e nove voluntários avaliados.

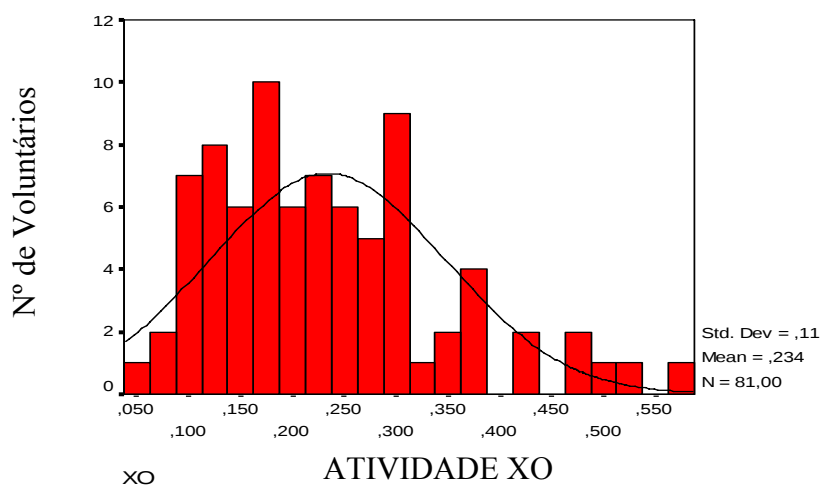


Figura 19 - Histograma dos valores de atividade da enzima XO de oitenta e um voluntários. A curva indica a distribuição normal esperada.

As figuras 20 e 21 representam os gráficos quantil-quantil dos valores de atividade da enzima NAT2 de setenta e nove voluntários avaliados.

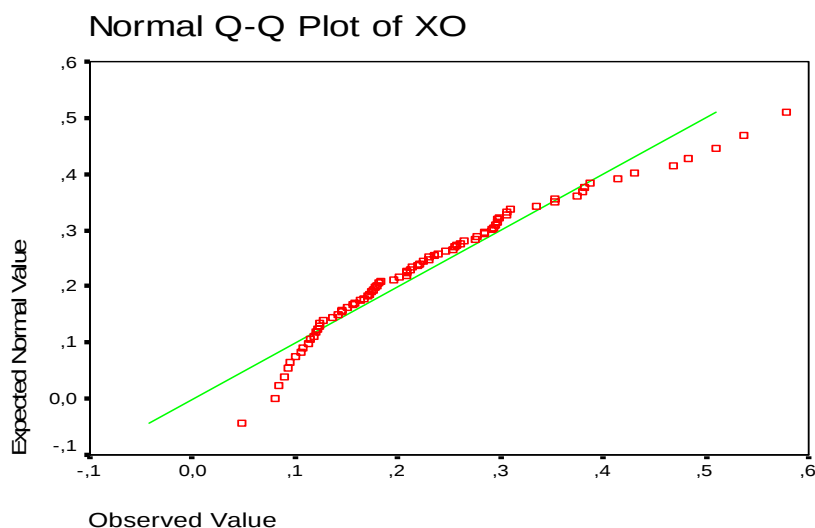


Figura 20 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de atividade da enzima XO de 79 voluntários. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os dados experimentais.

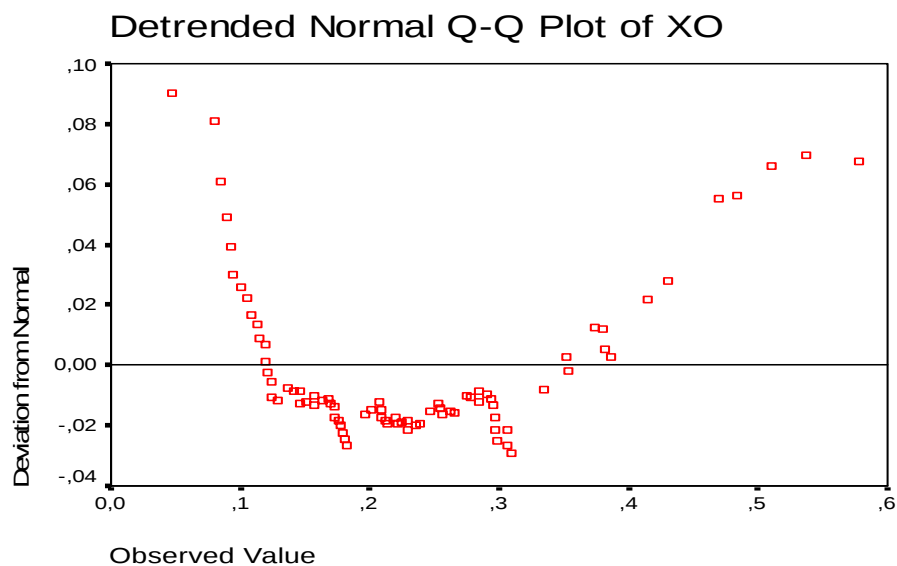


Figura 21 - Gráfico da análise pelo teste Q-Q dos valores de atividade da enzima XO de 79 voluntários. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal.

O gráfico de Normal Q-Q Plot mostrou a existência de dois pontos de quebra (0,35 e 0,38) na distribuição dos valores experimentais de atividade enzimática, este ponto pode ser usado como divisor entre os fenótipos metabolizadores. Deste modo classificamos os voluntários como metabolizadores insuficientes (83,54%), metabolizadores intermediários (3,8%) e metabolizadores extensos (12,66%).

2.4 Classificação da atividade enzimática dos voluntários

Os voluntários classificados no grupo CYP1A2-ME correspondem aos oito voluntários que apresentaram menor atividade para a enzima CYP1A2; os classificados no grupo CYP1A2-MA correspondem aos oito com maior atividade para a enzima CYP1A2. Classificação semelhante foi estabelecida para as outras enzimas: CYP2A6-ME = são os oito com menor atividade da CYP2A6; CYP2A6-MA = são os oito com maior atividade da CYP2A6; NAT2-ME = são os oito com menor atividade da NAT2; NAT2-MA = são os oito com maior atividade da NAT2; XO-ME = são os oito com menor atividade da XO; XO-MA = são os oito com maior atividade da XO.

A tabela 11 apresenta a relação de voluntários classificados em cada grupo que foram escolhidos para determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

Tabela 21 - Relação dos voluntários classificados em cada grupo, de acordo com a atividade enzimática.

ENZIMA	CLASSIFICAÇÃO	VOLUNTÁRIOS
CYP1A2	CYP1A2-ME	36, 39, 55, 61, 65, 75, 79 e 81
	CYP1A2-MA	17, 24, 34, 38, 50, 53, 64 e 72
NAT2	NAT2-ME	03, 04, 05, 18, 37, 48, 71, 76
	NAT2-MA	17, 32, 34, 39, 50, 51, 53 e 58
XO	XO-ME	03, 04, 32, 34, 56, 64, 68 e 71
	XO-MA	29, 36, 39, 51, 58, 61, 72 e 81
CYP2A6	CYP2A6-ME	17, 24, 34, 50, 53, 56, 58 e 72
	CYP2A6-MA	03, 36, 61, 65, 68, 75, 79 e 81

3 DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

3.1 Método Analítico

3.1.1 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da cafeína no plasma.

O método desenvolvido mostrou-se específico para a cafeína e para o padrão interno (teobromina), obtendo-se boa separação destes compostos entre si, bem como dos componentes do plasma. A cafeína apresentou o tempo de retenção 5,106 min e a teobromina 3,530 min.

A figura 22 apresenta os picos da cafeína e do padrão interno em plasma repicado, demonstrando uma separação adequada entre os picos das substâncias avaliadas. A recuperação média da extração da cafeína foi de 97,11%.

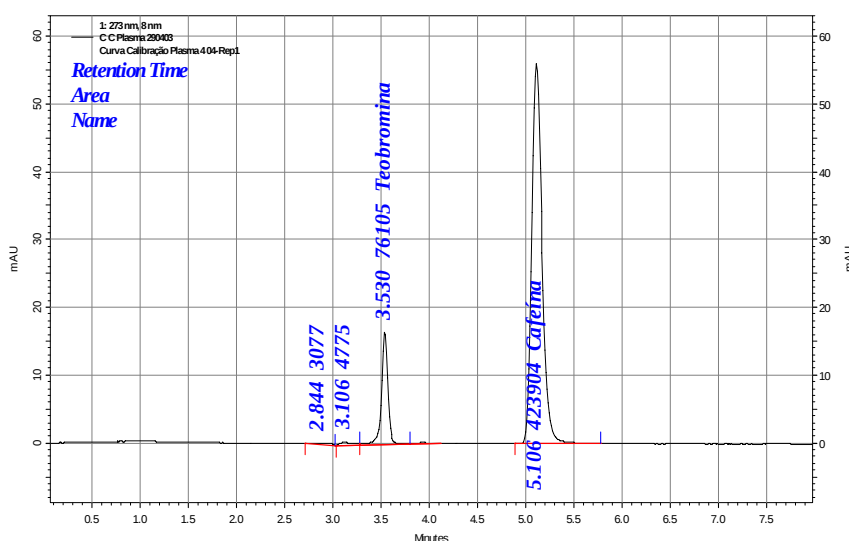


Figura 22 - Cromatograma referente à amostra de plasma branco, de voluntários saudáveis, repicado com cafeína e o padrão interno: Teobromina, após a extração com clorofórmio e isopropanol (4:1), mostrando o grau de separação entre as substâncias analisadas.

O método escolhido foi linear nas concentrações testadas de 1, 2, 4, 8 e 16 µg/mL para a quantificação da cafeína, e permitindo linearidade até 16 µg/mL com um coeficiente de

correlação (r) maior que 0,95 ($r = 0,99782$). O limite de quantificação do método foi de $0,5\mu\text{g/mL}$. A figura 20 apresenta a curva de calibração da cafeína e a tabela 12 representa os parâmetros relativos à equação da curva de calibração.

A precisão variou entre 1,23 e 3,26%. A exatidão variou entre 99,97 e 112,14%.

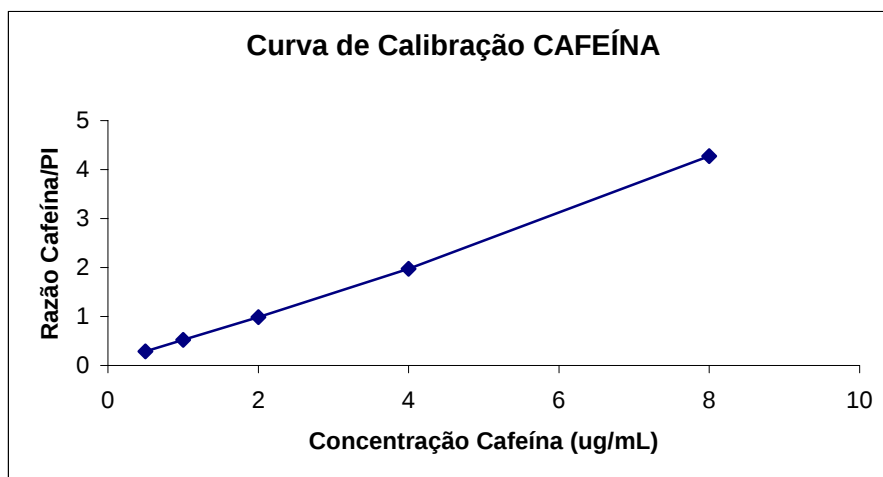


Figura 23 - Curva de calibração do método analítico para a quantificação de cafeína no plasma humano por HPLC na faixa de concentração entre 0,5 e $8\mu\text{g/mL}$.

Tabela 22 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação da cafeína no plasma humano por HPLC na faixa de concentração de 0,5 e $8\mu\text{g/mL}$.

PARÂMETRO	VALOR
Inclinação (a)	0,49266
Intercepto (b)	0,0595
Coefficiente de Correlação (r)	0,99782

3.2 Determinação e comparação dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos de voluntários selecionados

Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo de zero a vinte e quatro horas (ASC_{0-24}); concentração máxima (C_{max}); tempo para atingir a concentração máxima (T_{max}); constante de eliminação (k_e); Meia vida de eliminação ($t_{1/2}$); Clearance sistêmico (CL) e o volume de distribuição por quilo (V_d/kg).

Foram calculados os parâmetros farmacocinéticos dos voluntários descritos na tabela 11 e comparados os valores encontrados no grupo MA e no grupo ME, a fim de identificar se houve diferença estatística entre os grupos. A diferença foi avaliada pelo teste *t Student* e pelo teste de Wilcoxon.

3.2.1 Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima CYP1A2

A tabela 23 traz os valores dos parâmetros farmacocinéticos da cafeína, comparando os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME e identificando o valor do *p* para o teste *t* de Student.

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Wilcoxon não demonstrou diferença estatística entre os valores dos parâmetros farmacocinéticos do grupo CYP1A2-MA e CYP1A2-ME.

As médias dos valores de ASC para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram $42,976 (\pm 17,533) \mu g.h/mL$ e $52,433 (\pm 24,139) \mu g.h/mL$ respectivamente, a análise estatística pelo teste *t Student* mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de k_e para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram $0,175 (\pm 0,085) h^{-1}$ e $0,117 (\pm 0,047) h^{-1}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste *t Student* mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias (desvio padrão) dos valores de $t_{1/2}$ para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram 6,6 horas ($\pm 7,26$) e 6,6 horas ($\pm 3,34$) respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,05$.

As médias dos valores de C_{max} para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram 5,465 ($\pm 1,041$) $\mu\text{g/mL}$ e 6,012 ($\pm 1,768$) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de T_{max} para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram 0,58 ($\pm 0,19$) horas e 1,250 ($\pm 0,502$) horas respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de CL para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram 481,019 ($\pm 219,67$) mL/h e 373,105 ($\pm 190,430$) mL/h respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de V_d/kg para os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME foram 0,043 ($\pm 0,011$) L/kg e 0,046 ($\pm 0,005$) L/kg respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

Tabela 23 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8)

PARÂMETRO	MAIORES		MENORES		SIGNIFICÂNCIA
	MÉDIA	SD	MÉDIA	SD	
$ASC_{(0-24h)}$ ($\mu\text{g.h/mL}$)	42,9760	17,533	56,433	24,139	$p < 0,001$
k_e (h^{-1})	0,17550	0,085	0,117	0,047	$p < 0,001$
$t_{1/2}$ (h)	6,600	7,260	6,987	3,336	$p < 0,05$
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	5,465	1,041	6,012	1,768	$p < 0,001$
T_{max} (h)	0,580	0,191	1,250	0,502	$p < 0,001$
CL (mL/h)	481,019	219,667	373,105	190,430	$p < 0,001$
V_d/kg (L/kg)	0,043	0,011	0,046	0,005	$p < 0,001$

A Figura 24 apresenta o gráfico das curvas de concentrações plasmáticas ($\mu\text{g/mL}$) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, dos grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME ($n = 8$ em cada grupo) de voluntários.

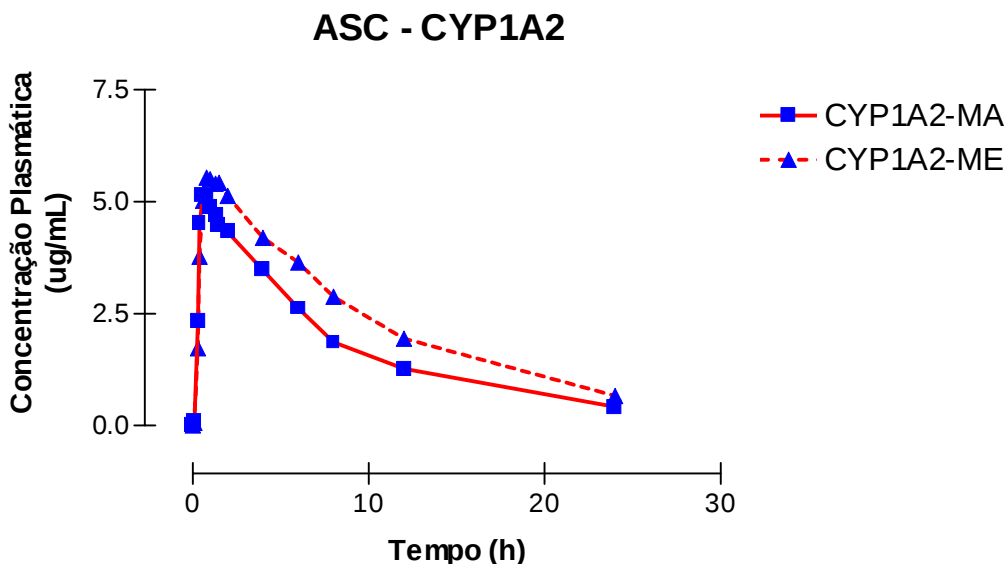


Figura 24 - Curvas de concentrações plasmáticas ($\mu\text{g/mL}$) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo CYP1A2-MA e CYP1A2-ME ($n = 8$ em cada grupo).

3.2.2 Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima NAT2

A tabela 24 traz os valores dos parâmetros farmacocinéticos da cafeína, comparando os grupos NAT2-MA e NAT2-ME e identificando o valor do p para o teste t Student.

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Wilcoxon não demonstrou diferença estatística entre os valores dos parâmetros farmacocinéticos do grupo NAT2-MA e NAT2-ME.

As médias dos valores de ASC para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 63,033 ($\pm 35,563$) $\mu\text{g.h/mL}$ e 58,613 ($\pm 13,583$) $\mu\text{g.h/mL}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de k_e para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 0,131 ($\pm 0,75$) h^{-1} e 0,117 ($\pm 0,031$) h^{-1} respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de $t_{1/2}$ para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 7,161 horas ($\pm 4,218$) e 6,358 horas ($\pm 1,858$) respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de C_{max} para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 7,085 ($\pm 1,349$) $\mu g/mL$ e 6,411 ($\pm 0,993$) $\mu g/mL$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de T_{max} para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 0,895 ($\pm 0,504$) horas e 1,250 ($\pm 0,424$) horas respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de CL para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 352,993 ($\pm 190,287$) mL/h e 314,156 ($\pm 80,617$) mL/h respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de V_d/kg para os grupos NAT2-MA e NAT2-ME foram 0,042 ($\pm 0,006$) L/kg e 0,047 ($\pm 0,008$) L/kg respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

Tabela 24 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos NAT2-MA e NAT2-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8)

PARÂMETRO	MAIORES		MENORES		SIGNIFICÂNCIA
	MÉDIA	SD	MÉDIA	SD	
ASC _(0-24h) (µg.h/mL)	63,033	35,563	58,613	13,583	p<0,002
ke (h. ⁻¹)	0,131	0,075	0,117	0,031	p<0,002
t _½ (h)	7,161	4,218	6,358	1,858	p<0,002
C _{max} (µg/mL)	7,085	1,349	6,411	0,993	p<0,001
T _{max} (h)	0,895	0,504	1,250	0,424	p<0,002
CL (mL/h)	352,993	190,287	314,156	80,617	p<0,001
Vd/kg (L/kg)	0,042	0,006	0,047	0,008	p<0,001

A Figura 25 apresenta o gráfico das curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, dos grupos NAT2-MA e NAT2-ME (n = 8 em cada grupo) de voluntários.

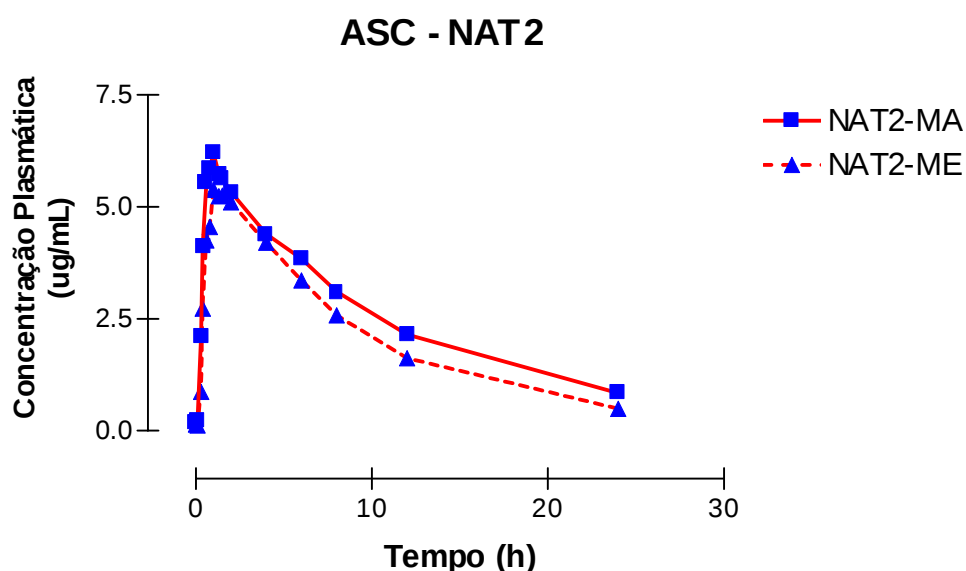


Figura 25 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo NAT2-MA e NAT2-ME (n = 8 em cada grupo).

3.2.3 Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima XO

A tabela 25 traz os valores dos parâmetros farmacocinéticos da cafeína, comparando os grupos XO-MA e XO-ME e identificando o valor do p (teste t Student).

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Wilcoxon não demonstrou diferença estatística entre os valores dos parâmetros farmacocinéticos do grupo XO-MA e XO-ME.

As médias dos valores de ASC para os grupos XO-MA e XO-ME foram 60,680 ($\pm 34,69$) $\mu\text{g.h/mL}$ e 56,31 ($\pm 22,58$) $\mu\text{g.h/mL}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de k_e para os grupos XO-MA e XO-ME foram 0,111 ($\pm 0,047$) h^{-1} e 0,129 ($\pm 0,058$) h^{-1} respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de $t_{1/2}$ para os grupos XO-MA e XO-ME foram 7,473 ($\pm 3,72$) h e 6,409 ($\pm 2,81$) h respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de C_{max} para os grupos XO-MA e XO-ME foram 6,302 ($\pm 1,912$) $\mu\text{g/mL}$ e 5,765 ($\pm 1,469$) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de T_{max} para os grupos XO-MA e XO-ME foram 1,250 ($\pm 0,526$) horas e 0,875 ($\pm 0,516$) horas respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de CL para os grupos XO-MA e XO-ME foram 372,262 ($\pm 213,873$) mL/h e 362,080 ($\pm 170,255$) mL/h respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de V_d/kg para os grupos XO-MA e XO-ME foram 0,048 ($\pm 0,004$) L/kg e 0,042 ($\pm 0,005$) L/kg respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

Tabela 25 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos XO-MA e XO-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8)

PARÂMETRO	MAIORES		MENORES		SIGNIFICÂNCIA
	MÉDIA	SD	MÉDIA	SD	
$ASC_{(0-24h)}$ ($\mu g \cdot h/mL$)	60,680	34,688	56,310	22,582	$p < 0,002$
k_e (h^{-1})	0,111	0,047	0,129	0,058	$p < 0,001$
$t_{1/2}$ (h)	7,473	3,720	6,409	2,809	$p < 0,001$
C_{max} ($\mu g/mL$)	6,302	1,912	5,765	1,468	$p < 0,001$
T_{max} (h)	1,250	0,526	0,875	0,516	$p < 0,001$
CL (mL/h)	372,262	213,873	362,080	170,255	$p < 0,002$
V_d/kg (L/kg)	0,048	0,004	0,042	0,005	$p < 0,001$

A Figura 26 apresenta o gráfico das curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, dos grupos XO-MA e XO-ME (n = 8) de voluntários.

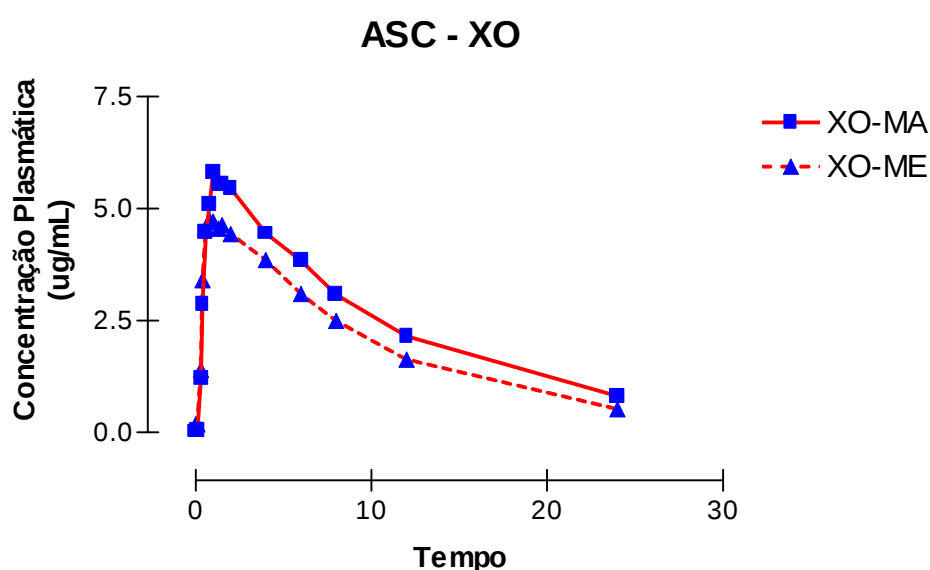


Figura 26 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo XO-MA e XO-ME (n = 8 em cada grupo).

3.2.4 Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para a enzima CYP2A6

A tabela 26 traz os valores dos parâmetros farmacocinéticos da cafeína, comparando os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME e identificando o valor do “p” para teste t Student.

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Wilcoxon só demonstrou diferença entre os valores dos grupos estudados para o parâmetro Tmax (com $p < 0,05$); os demais parâmetros farmacocinéticos do grupo CYP2A6-MA e CYP2A6-ME não apresentaram diferença estatística.

As médias dos valores de ASC para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 61,554 ($\pm 21,513$) $\mu\text{g.h/mL}$ e 44,491 ($\pm 16,861$) $\mu\text{g.h/mL}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de k_e para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 0,099 ($\pm 0,039$) h^{-1} e 0,148 ($\pm 0,078$) h^{-1} respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,002$.

As médias dos valores de $t_{1/2}$ para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 7,957 ($\pm 3,133$) horas e 7,329 ($\pm 7,004$) horas respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,05$.

As médias dos valores de Cmax para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 5,757 ($\pm 1,398$) $\mu\text{g/mL}$ e 5,666 ($\pm 1,160$) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de Tmax para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 1,215 ($\pm 0,472$) horas e 0,574 ($\pm 0,191$) horas respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de CL para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 365,127 ($\pm 196,577$) mL/h e 451,710 ($\pm 210,761$) mL/h respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

As médias dos valores de V_d/Kg para os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME foram 0,0467 ($\pm 0,005$) L/kg e 0,046 ($\pm 0,010$) L/kg respectivamente, a análise estatística pelo teste t Student mostrou uma significância de $p < 0,001$.

Tabela 26 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos, da cafeína, entre os grupos CYP2A6-MA e CYP2A6-ME. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n= 8)

PARÂMETRO	MAIORES		MENORES		SIGNIFICÂNCIA
	MÉDIA	SD	MÉDIA	SD	
$ASC_{(0-24h)}$ ($\mu g \cdot h/mL$)	61,554	21,513	44,491	16,861	$p < 0,001$
k_e (h^{-1})	0,099	0,039	0,148	0,078	$p < 0,002$
$t_{1/2}$ (h)	7,957	3,133	7,329	7,004	$p < 0,05$
C_{max} ($\mu g/mL$)	5,757	1,398	5,666	1,160	$p < 0,001$
T_{max} (h)	1,215	0,472	0,574	0,191	$p < 0,001$
CL (mL/h)	365,127	196,577	451,710	210,761	$p < 0,001$
V_d/kg (L/kg)	0,046	0,005	0,046	0,010	$p < 0,001$

A Figura 27 apresenta o gráfico das curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, dos grupos CYP1A2-MA e CYP1A2-ME (n = 8) de voluntários.

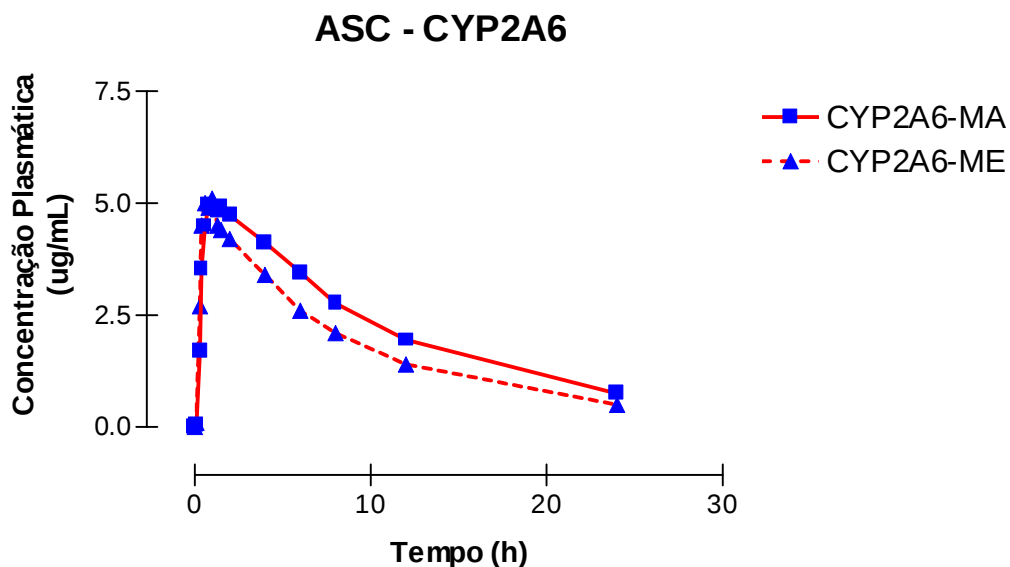


Figura 27 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) versus tempo (h) após a administração de um comprimido de cafeína 200mg, comparando os voluntários do grupo CYP2A6-MA e CYP2A6-ME (n = 8 em cada grupo).

4 COMPARAÇÃO COM OUTRO ESTUDO FARMACOCINÉTICO

4.1 Avaliação da distribuição de frequência das ASC do Propranolol

Resolvemos avaliar a distribuição de frequência das ASC de quarenta e oito voluntários que tomaram um comprimido de 40mg de propranolol (fármaco metabolizado pela CYP1A2). Os dados mostraram que as ASC, semelhantemente aos dados experimentais, não compunham uma distribuição normal. Observamos que tanto o histograma (figura 28) quanto os gráficos Quantil-Quantil (figuras 29 e 30) confirmaram esta não normalidade.

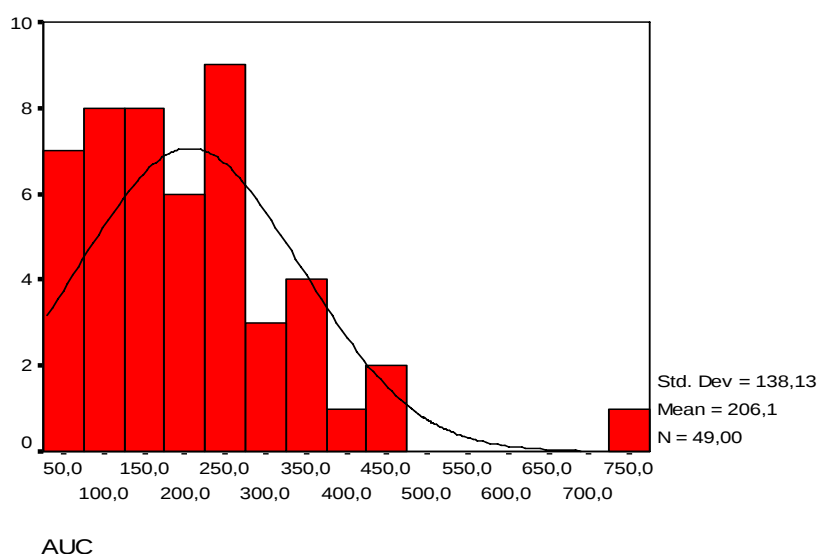


Figura 28 – Histograma da distribuição de frequência das ASC_{0-t} de 48 voluntários após a administração de um comprimido de 40mg de propranolol. A curva demonstra a distribuição normal esperada.

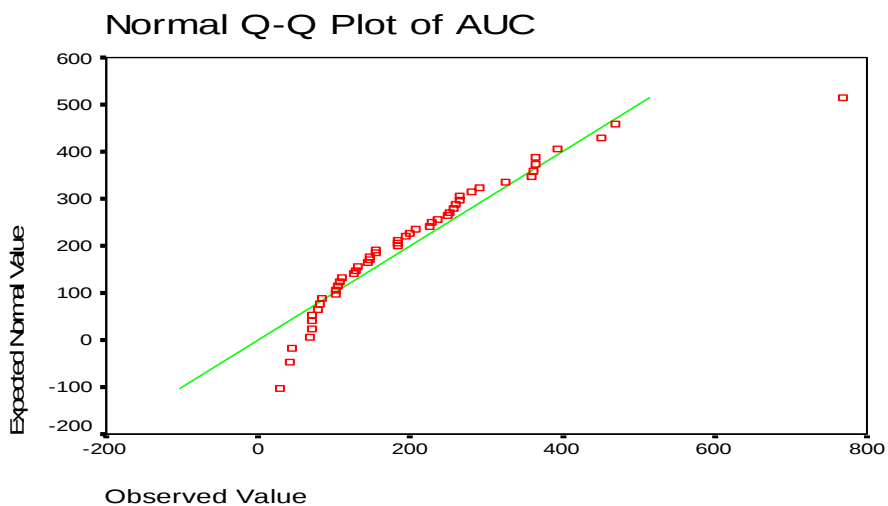


Figura 29 - Gráfico da análise pelo teste Quantil- Quantil (Q-Q) dos valores de ASC do Propranolol de 48 voluntários, após uma dose única de 40mg. A linha verde representa a distribuição normal e os pontos vermelhos representam os valores individuais de ASC.

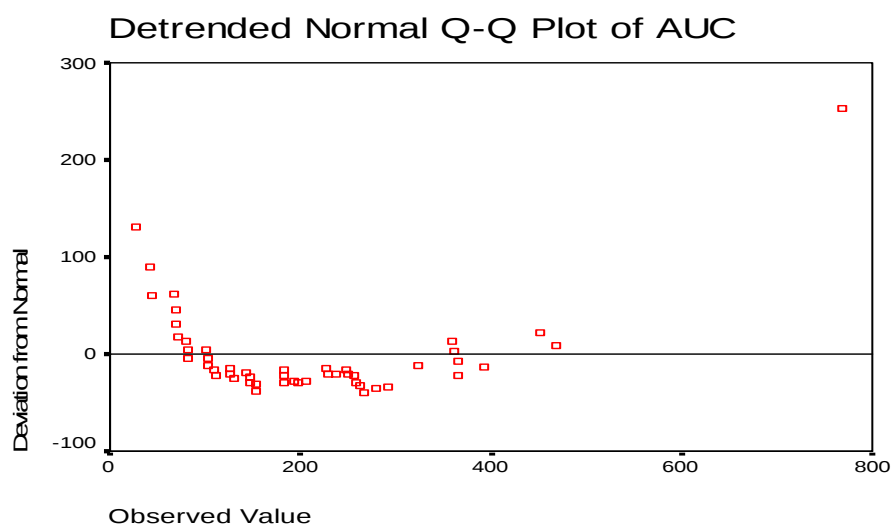
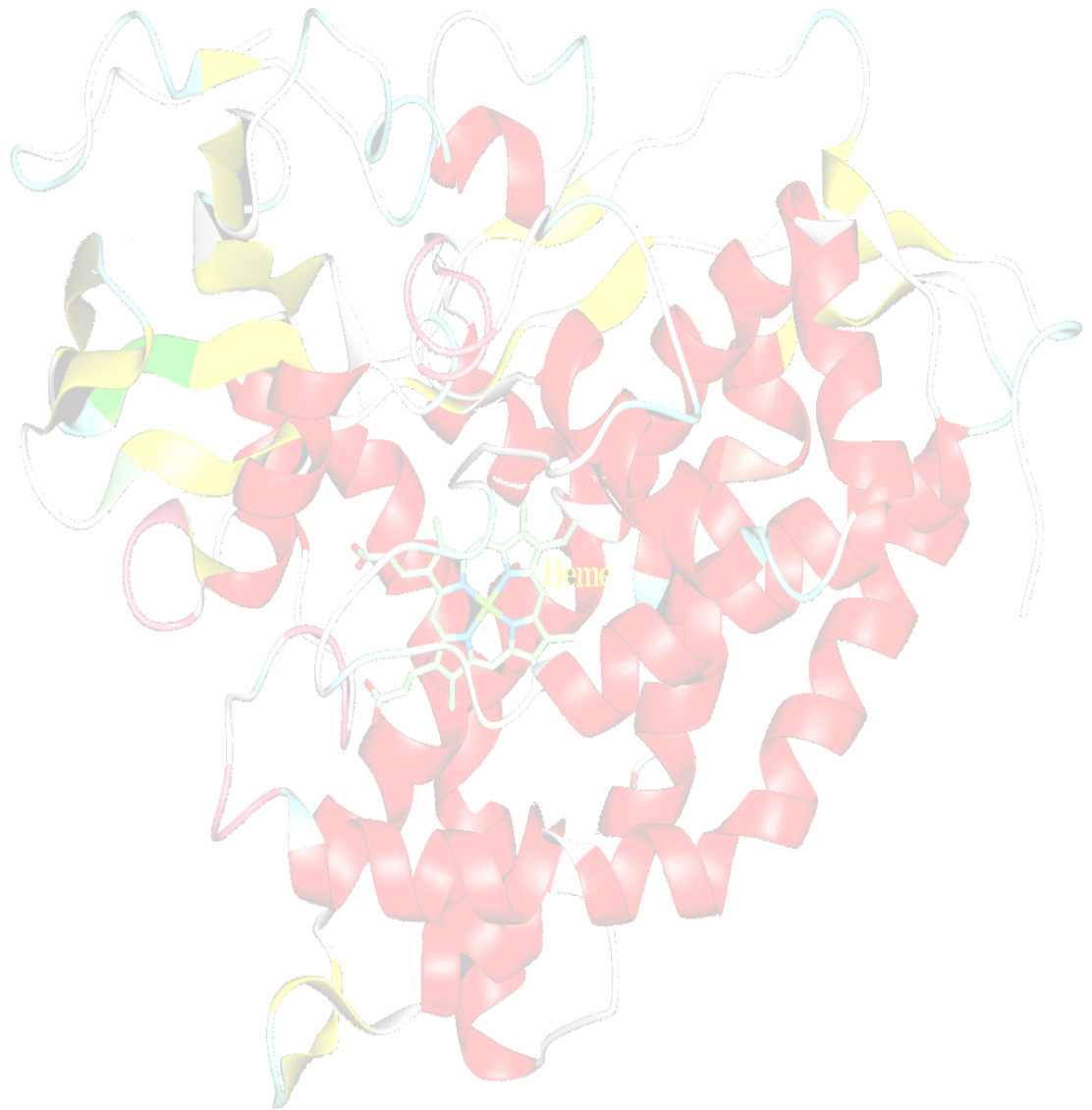


Figura 30 - Gráfico da análise pelo teste Quantil-Quantil (Q-Q) dos valores de ASC do Propranolol de 48 voluntários, aos uma dose única de 40mg. Este gráfico representa o grau de dispersão dos dados experimentais em relação à distribuição normal.



Discussão

DISCUSSÃO

Sabe-se que o metabolismo dos fármacos tem uma importância fundamental quando se avalia a atividade de um medicamento sobre o organismo humano. Desta forma tanto os efeitos terapêuticos quanto os potenciais efeitos tóxicos podem ser alterados de acordo com a atividade metabólica. Quando um novo composto é introduzido na terapêutica o seu comportamento metabólico é avaliado para determinação dos esquemas terapêuticos; no entanto as variações genéticas entre os indivíduos da população brasileira não são levadas em conta durante o planejamento e a produção das formulações que serão usadas em nosso país.

Os dados farmacocinéticos e metabólicos que caracterizam um composto farmacêutico são usualmente derivados de pesquisa clínica em poucas populações. Grande parte da pesquisa de desenvolvimento dos novos fármacos é realizada em indivíduos caucasianos (ou ainda brancos de origem européia) e nos japoneses. Está cada vez mais claro que a variabilidade inter-étnica deve ser levada em consideração quando da escolha de um tratamento farmacológico e, principalmente, da dose a ser utilizada (RENEWICK, 1996). Sabe-se que existem diferenças inter-étnicas no metabolismo de xenobióticos e este fato tem sido associado com as variações existentes no desenvolvimento de respostas tóxicas entre as populações (KALOW, 1991 e RENEWICK, 1996).

As variações no metabolismo dos xenobióticos podem ser originadas a partir da constituição genética do indivíduo ou ainda de suas práticas culturais tais como a dieta, o consumo de álcool, poluição urbana, uso de cigarro e terapias farmacológicas anteriores. Estes fatores não genéticos, poderão promover uma variabilidade inter-étnica ou ainda mascarar uma real alteração genética (RENEWICK, 1996).

A literatura relata a existência de dois tipos de variabilidade étnica na atividade das enzimas metabólicas: o primeiro consiste de diferenças na incidência de metabolizadores lentos para uma determinada enzima em diferentes populações; e o segundo consiste numa diferença na media e no desvio padrão entre as taxas de metabolismo e /ou eliminação (RENEWICK, 1996). Em nosso estudo procuramos avaliar os dois aspectos: inicialmente observamos a incidência de metabolizadores lentos e rápidos para as enzimas CYP1A2, CYP2A6, NAT2 e XO através do estudo das distribuições de frequência de atividade

enzimática; em seguida, categorizamos nossos voluntários em grupos de padrão metabólico diferentes e comparamos a média e o desvio padrão dos principais parâmetros farmacocinéticos para confirmar as diferenças entre os grupos.

Como não tínhamos conhecimento de relatos científicos acerca do perfil fenotípico da população do estado do Ceará quanto à atividade das enzimas metabólicas, procuramos em nosso estudo avaliar voluntários sadios que nos permitissem em uma primeira análise, ou análise piloto, caracterizar a população saudável através da estatística descritiva identificando se estes voluntários apresentariam um padrão metabólico homogêneo, caracterizado por uma distribuição normal ou não.

Nossos voluntários foram selecionados com uma criteriosa avaliação clínica e laboratorial que veio confirmar seu estado de higidez, evitando possíveis interferências de patologias individuais (principalmente as hepáticas e renais) na determinação da atividade enzimática desses voluntários. Foram inicialmente recrutados 85 voluntários, dos quais 80 concluíram a etapa clínica, possibilitando a avaliação completa dos seus resultados.

Durante a etapa clínica, todos os voluntários toleraram bem o comprimido de cafeína de 200mg administrado. O único evento adverso relatado com possível associação com a administração da cafeína foi um “mal estar gástrico” que pode ser justificado pelos efeitos adversos da cafeína descritos na literatura, que incluem sintomas gastrintestinais (COLTON et al., 1974 e CURATOLO; ROBERTSON, 1983). Nossos resultados corroboram com a literatura quando relatam as vantagens clínicas da utilização da cafeína como fármaco “probe”, pois já é um fármaco de uso relativamente comum e apresenta riscos menores de eventos adversos (MINERS; BIRKETT, 1996).

Outro fator que vem confirmar as vantagens do uso da cafeína é o fato de que ela possibilita, através da administração de um único fármaco, determinar o fenótipo de quatro diferentes enzimas metabólicas, envolvidas nas reações de acetilação e oxidação dos processos de biotransformação de xenobióticos que são largamente utilizados na prática médica (CAMPBELL et al., 1987 e BUTLER et al., 1992).

A metodologia utilizada em nosso estudo para quantificação dos metabólitos na urina, consistiu de uma modificação do método inicialmente descrito por Grant em 1984 e

posteriormente adaptado por outros pesquisadores (KRUL; HAGEMAN, 1998; BENDRISS et al., 2000; BAUD-CAMUS et al., 2001; CAUBET et al., 2002). Esta metodologia possibilitou a quantificação de cinco metabólitos da cafeína, bem como da teobromina (que foi utilizada como padrão interno).

Nossa metodologia mostrou-se robusta, tendo em vista as soluções dos metabólitos permaneceram estáveis durante toda a etapa analítica, apresentando coeficientes de variação compatíveis com os valores exigidos pela resolução 84 de medicamentos genéricos da ANVISA (BRASIL, 2002).

Quanto à sensibilidade o método apresentou limites de quantificação compatíveis com a metodologia descrita por outros pesquisadores para dosagem dos principais metabólitos da cafeína. Brendriss em 2000 descreveu linearidade entre 0,5 e 17,5µ/mL para a curva de calibração do metabólito 1U; nossos resultados apresentaram uma linearidade entre 0,5 e 16µ/mL. Para os demais metabólitos (AFMU, 1X, 17U e 17X) nossa linearidade permaneceu na faixa entre 2 e 32µ/mL, enquanto a literatura relata uma faixa mais ampla (1 a 50µ/mL); no entanto não houve prejuízo para as análises, tendo em vista que os valores experimentais encontraram-se dentro dos limites da curva de calibração (BRENDRISS et al., 2000; BAUD-CAMUS et al., 2001).

Quanto à especificidade, nossos resultados, semelhantemente aos demais trabalhos, demonstraram que o método foi específico, permitindo uma suficiente separação entre os analitos de modo que numa só corrida analítica todos fossem quantificados sem interferências de outras substâncias presentes na matriz biológica estudada. A linearidade das curvas de calibração foi confirmada pelos valores de R que foram superior a 0,98.

Em nosso estudo avaliamos o perfil fenotípico de 79 voluntários saudáveis entre 18 e 47 anos, de ambos os sexos, da cidade da Fortaleza, Ceará. O fenótipo acetilador avaliado foi o da enzima NAT2; os fenótipos de oxidação avaliados foram os das enzimas CYP1A2 e CYP2A6; além destes avaliamos também o fenótipo da enzima XO.

A atividade metabólica das enzimas foi determinada pela razão das concentrações molares dos principais metabólitos da cafeína, como descrito por KRUL, 1998; Baud-Camus, 2001 e Caubet, 2001. O perfil metabólico da amostra da população saudável do estado do

Ceará foi determinado pela análise da estatística descritiva com os testes de normalidade, já que a literatura relata que a avaliação de suas distribuições de frequência permite que através da caracterização da normalidade ou não da distribuição, a população estudada seja classificada como homogênea ou heterogênea para a atividade desta enzima (NERI, 1993; BENDRISS et al., 2000; BAUD-CAMUS et al., 2001; CAUBET et al., 2002 e SARUWATARI et al, 2002).

Muitas são as variações metabólicas interpopulacionais relatadas, elas abrangem tanto as reações de fase I (principalmente as de oxidação) quanto às reações de fase II (principalmente as de acetilação). Dentre as enzimas oxidativas o sistema microsomal do CYP450 está envolvido em muitas dessas reações polimórficas.

O estudo do fenômeno da bimodalidade nas reações metabólicas em geral (sejam de oxidação ou acetilação) veio de certa forma facilitar a detecção de possíveis alterações genéticas (polimórficas) nessas enzimas metabolizadoras (NERI, 1993).

Dentro da análise da estatística descritiva, todas as enzimas avaliadas apresentaram coeficientes de Skewness Kurtosis diferentes de zero, caracterizando uma distribuição não normal; esses resultados foram confirmados pela representação gráfica do histograma e do Normal Q-Q Plot e do Detrended Normal Q-Q Plot que demonstraram a diferença entre os valores experimentais e os valores esperados para uma distribuição normal.

Nossos resultados, expressos no Q-Q Plot para a atividade da enzima NAT2, apresentaram dois pontos de quebra, indicando que a população avaliada é heterogênea e sugerindo a existência de três fenótipos: acetiladores lentos - 26,58%, acetiladores intermediários - 60,76% e de acetiladores rápidos - 12,66%. Nossos resultados corroboram com os achados publicados por CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ em 1995., para a população mexicana, que também apresentaram três fenótipos acetiladores, porém com proporções diferentes (CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ et al.,1995).

Variações quanto às reações de acetilação já foram relatadas em indivíduos provenientes de vários países mediterrâneos, onde o fenótipo de acetiladores lentos predomina; ou ainda de indivíduos de origem japonesa, onde o fenótipo predominante é o acetilador rápido.

O polimorfismo genético da acetilação tem sido estudado em varias populações, estes trabalhos procuraram comparar a incidência dos fenótipos acetiladores em grupos de diversas origens étnicas e geográficas. Até o momento não se tinha conhecimento de estudos que caracterizassem as frequências fenotípicas na população brasileira. A caracterização adequada do fenótipo acetilador é clinicamente relevante, tendo em vista a resposta farmacológica de vários agentes terapêuticos, o risco de exposição a compostos tóxicos presentes no ambiente urbano (oriundos principalmente do lixo químico das indústrias) que são biotransformados por acetilação, e a incidência de certas doenças relacionadas com a capacidade que o indivíduo apresenta de acetilar estes compostos (EVANS, 1989; CHAPRON et al., 1980).

A análise da estatística descritiva para a enzima CYP1A2 mostrou que a distribuição de frequência apresentou um ponto de quebra (que representa uma interrupção nos dados plotados) no valor de 2,5; desta forma dividimos os voluntários em dois grupos, os que apresentaram a atividade enzimática inferior a 2,5 e os que apresentaram valores superiores a 2,5. Os valores percentuais de cada grupo foram de 88,61% para os menores que 2,5 classificados como metabolizadores insuficientes; e 11,39% para os maiores que 2,5 classificados como metabolizadores extensos.

A enzima CYP1A2 possui um importante papel no metabolismo de fármacos muito utilizados na clínica (como o propranolol, a teofilina, a imipramina, etc), de substâncias pró-carcinógenas (como as aminas aromáticas e heterocíclicas) e ainda compostos endógenos como a melatoína. A existência de polimorfismos nesta enzima ainda não está totalmente confirmada, nossos resultados apresentam uma distribuição de frequência não normal, indicando uma heterogeneidade na população estudada, com pelo menos três fenótipos; os metabolizadores insuficientes (12,66%), os metabolizadores intermediários (75,95%) e metabolizadores extensos (11,39%). A literatura relata que indivíduos com metabolismo extenso para CYP1A2 apresenta um maior risco de desenvolvimento de câncer coloretal e de bexiga quando expostos a arilaminas ou aminas heterocíclicas presentes nos alimentos de nossa dieta (KRUL, 1998; SARUWATARI, 2002).

A estatística descritiva para a atividade da enzima CYP2A6 mostrou parâmetros de uma distribuição não normal, no entanto os gráficos de histograma e Q-Q-plot não indicam sinais de bimodalidade, bem como o último não apresentou claramente os pontos de quebra.

Diante disso não foi possível classificar os voluntários com atividade enzimática baixa ou alta.

Trabalhos anteriores descrevem polimorfismo na enzima CYP2A6, com a presença de três alelos diferentes. Deficiências na atividade da CYP2A6 tem sido levantadas como justificativa para redução na incidência de doenças pulmonares causadas por fatores ambientais (principalmente o tabaco) (OSCARSON, 2001).

A análise da enzima Xantina Oxidase mostrou que a distribuição de frequência apresenta dois pontos de quebra nos valores de 0,35 e 0,38; desta forma os voluntários foram divididos em metabolizadores insuficientes (83,54% - com atividade enzimática inferior a 0,35), metabolizadores intermediários (3,8% - com atividade enzimática maior que 0,35 e menor que 0,38) e metabolizadores extensos (12,66% - com atividade enzimática superior a 0,38). A literatura não descreve as consequências de um fenótipo metabolizador insuficiente ou extenso para a enzima Xantina Oxidase, sendo necessários outros estudos clínicos (GULLSTEN, 2000).

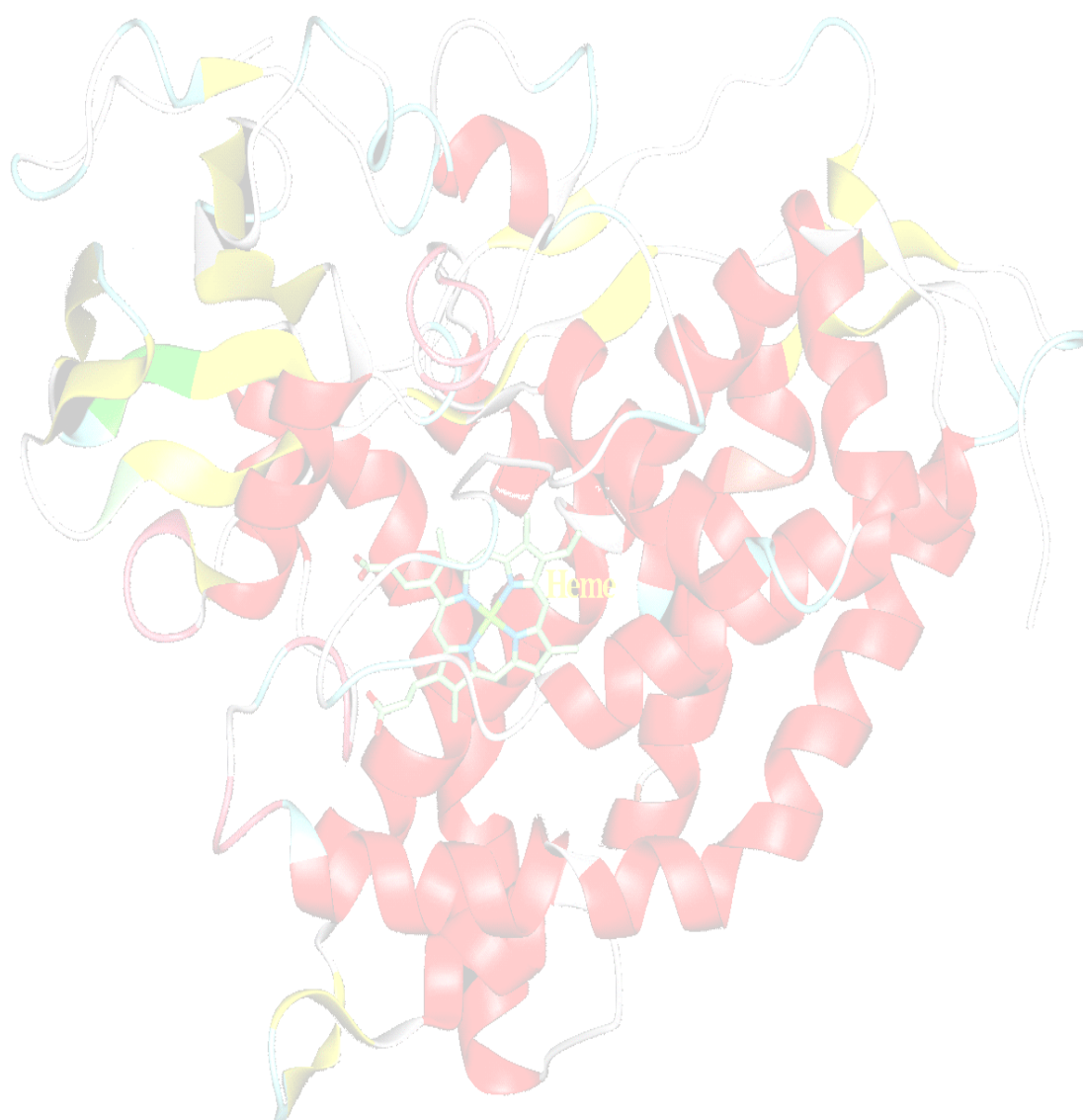
Nossa metodologia analítica para determinação da cafeína plasmática consistiu de uma modificação da metodologia descrita por Krul e Hageman em 1998. A metodologia de quantificação plasmática da cafeína mostrou-se robusta, sensível (com limite de quantificação linear de 1µg/mL) e específica (pois permitiu a separação entre a cafeína e a teobromina).

A quantificação da cafeína permitiu a determinação dos parâmetros farmacocinéticos e a comparação desses parâmetros entre os voluntários dos grupos MA e ME para cada enzima. A análise estatística pelo teste t mostrou diferença entre todos os parâmetros farmacocinéticos dos grupos MA e ME para todas as enzimas, no entanto a análise pelo teste de Wilcoxon não paramétrico, não demonstrou diferença estatística. Considerando que os grupos estudados podem ser considerados homogêneos, pois contemplam voluntários com o comportamento metabólico semelhante, consideramos os valores do teste paramétrico.

Ao avaliar a estatística descritiva de uma amostra de 48 voluntários que tomaram um comprimido de 40mg de propranolol (fármaco metabolizado pela enzima CYP1A2), observamos que os valores de ASC compõem uma distribuição não normal, com coeficientes

de Skewness e Kurtosis diferentes de zero. Sugerindo assim a existência de um padrão metabólico bimodal.

A Unidade de Farmacologia Clínica vem a cerca de onze anos contribuindo para a formação de profissionais capacitados para o desenvolvimento de ensaios clínicos e juntamente com outros pesquisadores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia tem apresentado um significativo número de publicações nessa área; com o nosso trabalho de avaliação do perfil fenotípico de uma amostra da população do ceará, tivemos a oportunidade de concretizar o início de uma nova linha de pesquisa dentro deste departamento. A farmacogenética tem sido, nos últimos anos alvo de crescente número de projetos de pesquisa, e a cada dia torna-se mais aplicável clinicamente, tendo em vista que seus conceitos e achados podem contribuir para a elaboração de protocolos terapêuticos mais adequados às características metabólicas de nossa população.



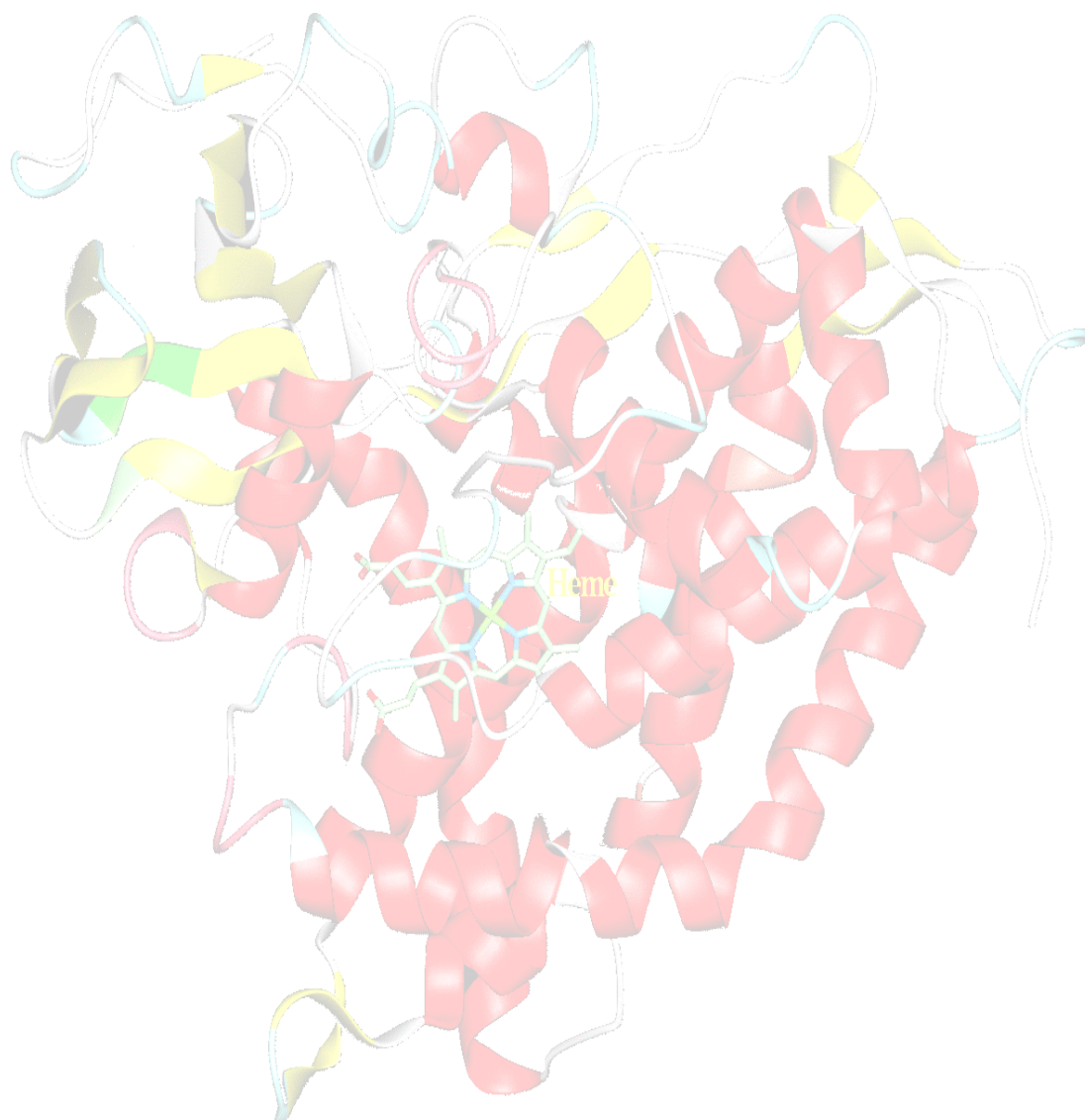
Conclusões

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que as atividades das enzimas CYP1A2, CYP2A6, NAT2 e XO apresentam uma heterogeneidade nas suas distribuições de frequências, sugerindo que estas enzimas apresentem polimorfismos na população cearense.

A avaliação dos perfis fenotípicos das enzimas CYP1A2, NAT2 e Xantina Oxidase demonstrou uma trimodalidade na distribuição de frequência, indicando a existência de, pelo menos, três fenótipos para cada enzima.

A metodologia utilizada em nosso trabalho permitiu a implementação da linha de pesquisa “Farmacogenética” na Unidade de Farmacologia Clínica”, sendo de grande importância no desenvolvimento de ensaios clínicos.



Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLSTROM, H.; ALVERO, J.; ALVERO, R.; ESPOS, R.; FAJUTRAO, L.; HERRERA, J.; KJELLMAN, B.; KUBISTA, J.; LEVISTE, C.; MEYER, P.; OLDAEUS, G.; SIRICURURAT, A.; VICHYANOND, P; WETTRELL, G.; WONG, E.; LAXMYR, L.; NYBERG, L.; OLSSON, H.; WEIBULL, E.; ROSENBORG, J. Pharmacokinetics of bambuterol during oral administration to asthmatic children. **Brazilian Journal of Clinical Pharmacology**, v.48; p. 299–308; 1999.

AHSAN, C.H.; RENWICK, A.G.; MACKLIN, B.; CHALLENGOR, V.F.; WALLER, D.G. GEORGE, C.F.; Ethnic differences in the pharmacokinetics of oral nifedipina. **Brazilian Journal of Clinical Pharmacology**, v.31; p. 399–403, 1991.

AHSAN, C.H.; RENWICK, A.G.; WALLER, D.G.; CHALLENGOR, V.F.; GEORGE, C.F; AMANULLAH, M. The influence of dose and ethnic origins on the pharmacokinetics of nifedipina. **Clinical Pharmacology and Therapeutic**, v.54; p. 329–338, 1993.

BAUD-CAMUS, F.; MARQUET, P.; SOURSAC, M.; DAVRINCHE, C.; FARINOTTI, R. Determination of N-acetylation phenotype using caffeine as a metabolic probe and high-performance liquid chromatography with either ultraviolet detection or electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 760; p. 55-63, 2001.

BEM-HAMIDA, MAN, W.K.; McNEIL, N.; SPENCER, J. Histamine, xanthine oxidase generated oxygen-derived free radicals and *Helicobacter pylori* in gastroduodenal inflammation and ulceration. **Inflammation Research**, v.47; p.193-199; 1998

BENDRISS, E.; MARKOGLOU, N.; WAINER, I.W. Liquid chromatography method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 746; p. 331-338; 2000.

BENET, L.Z.; KROETZ, D.L.; SHEINER, L.B. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: HARDMAN, J.G et. Al (Ed) **Goodman and**

Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: McGraw Hill, 1996. chapt.1, p 3-27.

BENOWITZ, N.L.; PEREZ-STABLE, E.J.; HERRERA, B.; JACOB, P 3rd. Ethnic differences in nicotine metabolism: evidence for lower CYP2A6 activity in Chinese Americans compared to Hispanics or whites. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.67; p. 113; 2000.

BERTILSSON, L.; DAHL, M.; EDQQVIST, B.; et al. Genetic regulation of the disposition of psychotropic drugs. In: MELTZER, H.Y.; NEROSZZI, D. **Current Practice and future Developments in the pharmacotherapy of Mental Disorders**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 73 – 80, 1991.

BERTILSSON, L.; DAHL, M.J. Polymorphic drug oxidation: relevance to the treatment of psychiatric disorders. **CNS Drugs**, v.5; p.200 – 223; 1996.

BLANCHARD, J. and SAWERS, S. J. A. Comparative Pharmacokinetics of Caffeine in young and Elderly Men. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v.11. n.2. p 109-126. 1983.

BLUM, M.; DEMIERRE, A.; GRANT, D.M.; HEIM, M. and MEYER, U.A. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.88; p. 5237 – 5241; June 1991.

BONATI, M.; LATINI, R.; GALLETTI, F.; YOUNG, J.F.; TOGNONI, G. and GARATTINE, S. Caffeine disposition after oral doses. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 32. p. 98-106. 1982.

BOUSHEY, H.A. Drogas utilizadas da Asma. Em: KATZUNG, B.G.; **Farmacologia Básica e Clínica**, 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2003. Cap. 20, p. 296-298.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada da ANVISA (RDC) N° 84, de 19 de março de 2002. Estabelece regulamento técnico para medicamento genérico. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 20 mar. 2002. Seção 1, p.42.

BRATTON, C.A; MARSHALL, E.K.; A New Coupling Component For Sulfanilamide Determination. **Journal of Biology Chem**; v. 128; p. 537 – 550; 1939

BRONSEN, K.; SINDRUP, S.H.; SKJELBO, E.; NIELSEN, K.K.; GRAM, L.F. Role of genetic polymorphism in psychopharmacology, an update. **Psychopharmacology Series**, v.10; p. 199 – 211, 1993.

BUTLER, M.A.; LANG, N.P.; YOUNG, J.F.; CAPORASO, N.E.; VINEIS, P.; HAYES, R.B.; TEITEL, C.H.; MASSENGILL, J.P.; LAWSEN, M.F.; KADLUBAR, F.F. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. **Pharmacogenetics**, v.2; p. 116 – 127, 1992.

CAMPBELL, M.E.; GRANT, D.M.; INABA, T.; KALOW, W. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochromes -450 in human liver microsomes. **Drug Metabolism Disposition**, v.15; p. 237 – 249, 1987.

CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; FALCÓN-NERI, A; HERRERA-ABARCA, A.; HERRERA, J.E.; FLORES-MURRIETA, F.J.; Determination of three acetylators phenotypes in a Mexican population using sulfamethazine metabolic ratio. **American Journal of Therapeutics**, v. 2, p. 57 – 60, 1995.

CAUBET, M.; ELBAST, W.; DUBUC, M.; BRAZIER, J. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27. p. 261-270, 2002.

CHANG, W.H.; JANN, M.W.; HWU, H.G.; CHEN, T.Y.; LIN, S.K.; WANG, J.M.; ERESHEFSKY, L.; SAKLAD, S.R.; RICHARDS, A.L.; LAM, Y.W. Ethnic comparison of haloperidol and reduced haloperidol plasma levels: Taiwan Chinese versus American non-Chinese. **Journal of Formosan Medical Association**, v.90; p. 572 – 578, 1991.

CHAPRON, J.D.; KRAMER, A. P.; MERCIK, S.B. Kinetic Discrimination of three sulfamethazine acetylation phenotype. **Clinical Pharmacology and Therapeutic**, v.27; p. 104 – 113, 1980.

CHOLERTON, S.; IDLE, M.E.; VAS, A.; GONZALEZ, F.J.; IDLE, J.R. Comparasion of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method with a spectrofluorometric method for the determination of 7-hidroxicoumarin in human urine. **Journal of Chromatography**, v.575; p. 325 – 330, 1992.

CLARK, W.J.; Genetically determined variability in acetylation and implications: **Therapeutic implications Drugs**, v.29; p. 342–375, 1985.

COLTON, T.; GOSSELIN, R.E.; SMITH, R.P. The tolerance of coffee drinkers to caffeine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.9; p. 770 – 775, 1974.

COOPER, D. What is Pharmacogenetics? **Pharmacogenetics in Patient Care Conference by American Association Clinical Chemistry**, Nov 6, 1998.

CORREIRA A. y CASTAGNOLI, N. Farmacocinética II: Biotransformacion de Fármacos. Farmacologia Básica y Clínica. Em: Katzung G.B. **El Manual Moderno**. Primera ed. p.37-46; 1984.

CURATOLO, P.W.; ROBERTSON, D. The health consequences of caffeine. **Annals of Internal Medicine**, v.98; p. 641 – 653, 1983.

DAY, R.O.; MINERS, J.O.; BIRKETT, D.J.; GRAHAM, G.G. and WHITEHEAD, A.; Relationship between plasma oxipurinol concentrations and xanthine oxidase activity in volunteers dosed with allopurinol. **British Journal of Clinical Pharmacology**,v. 26; p.429 – 434, 1988.

EDWARDS, J.A.; EVANS, D.A.P. Ethanol metabolism in subjects possessing typical and atypical liver alcohol dehydrogenase. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.8; p. 824 – 829, 1967.

EVANS, D.A.; MANLEY, K.L. y MCKUSICK, V.A. Genetic Control of isoniazid metabolism in man. **British Medical Journal**, v. 2; p. 485 – 491, 1960.

EVANS, D.A.P.: N-acetyltransferase. **Pharmacology and Therapeutic**, v.42; p. 157 – 234, 1989.

FLAWS, J.; LIM, C.; LUO, J.; BUSH, T. Racial differences in tamoxifen metabolism. **Annals of Epidemiology**, v.10; p. 463 – 464, 2000.

FLORES-MURRIETA, F.J.; CASTAÑEDA-HERNANDEZ, G.; GRANADOS-SOTO, V.; HERRERA, J.E. Increased bioavailability of sildenafil in Mexican men. **The Journal of the American Medical Association**, v.283; p. 1825 – 1826, 2000.

FOENANDER, T; BIRKETT, D.J.; MINERS, J.O.; WING, L.M.H. The simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine by high performance liquid chromatography. **Clinical Biochemistry**, v. 13. p. 132 – 134, 1980.

FRACKIEWICZ, E.J.; SHIOVITZ, T. O.; JHEE, S.S. **Ethnicity in drug development and therapeutics**. London, 2002. 135p. 1^a Ed. Editora Greenwich Medical media Ltd.

FRETLAND, A.J.; LEFF, M.A.; DOLL, M.A; HEIN, D.W. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms, **Pharmacogenetics**; v.11(3); p.207-15, 2001.

FROMM, M.F.; KROEMER, H.K.; EICHELBAUM, M. Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. **Advanced Drug Delivery**, v.27; p. 171 – 199, 1997.

GARCIA-BARCELO, M.; CLOW, L.Y.; KUM CHIU, H.F.; WING, Y.K.; SHING LEE, D.T.; LAM, K.L.; WAYE, M.M.. Frequencies of defective CYP2C19 alleles in a Hong Kong Chinese population. **Clinical Chemistry**, v.45; p. 2273 – 2274, 1999.

GLOWINSKI, I.B; RADTKE, H.E.; WEBER, W.W.; Genetic Variation in N-acetylation of Carcinogenic Arylamines by Human and Rabbit. **Molecular Pharmacology**, v. 14; p. 940 – 949, 1978.

GOLDSTEIN, A.; ARONOW, L.; KALMAN, M.S. Metabolismo de los fármacos. **Farmacologia**. Segunda ed. Limusa, 1974. p. 267-358.

GULLSTÉN, H. **Acesso ao documento primário**: Significance of polymorphisms in CYP2A6 gene. 2000. 83p. Academic Dissertation, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu; December 2000.

HARADA, S.; AGARWAL, D.P.; GOEDDE, H.W. Electrophoretic and biochemical studies of human aldehyde dehydrogenase isozymes in various tissue. **Life Sciences**, v.26; p. 1773 – 1780, 1980.

HASLER, J.A.; ESTABROOK, R.; MURRAY, M.; PIKULEVA, I.; WANERMAN, M.; CAPDEVILA, J.; HOLLA, V.; HELVIG, C.; FALCK, J.R.; FARREL, G.; KAMINSKY, L.S.; SPIVACK, S.D.; BOITIER, E.; BEAUNE, P. Human cytochromes P450. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 20. p. 1 – 137, 1999.

HERBERT, H.A. y WEBER, W.W. N-acetylation Pharmacogenetics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 4; p. 382 – 385, 1986.

HIRVONEN, A. Polymorphisms of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes and Susceptibility to cancer. **Environmental Health Perspectives**; v.107; p. 37 – 47; 1999

INGELMAN-SUNDBERG, M. Duplication, multiduplication and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes. Evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects. **Drug Metabolism Reviews**, v.31; p. 449 – 459, 1999.

INGILMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. **Journal of Internal Medicine**, v. 250; p. 186 – 200, 2001.

ITOH, K.; INOUE, K.; NAKAO, H.; YANAGIWARA, S.; TADA, H.; SUZUKI, T. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism based determination of two major genetic defects responsible for a phenotypic polymorphism of cytochrome P450 (CYP)2C19 in the Japanese population. **Annals Biochem**, v.284; p. 160 – 162, 2000.

IYER, K.R.; SINZ, M.W. Characterization of phase I and phase II hepatic drug metabolism activities un a panel of human liver preparations. **Chemico-Biological International**, v. 118. p. 151 – 169, 1999.

JANN, M.W.; CHANG, W.H.; DAVIS, C.M.; CHEN, T.Y.; DENG, H.C.; LUNG, F.W.; ERESHEFSKY, L.; SAKLAD, S.R.; RICHARDS, A.L. Haloperidol and reduced haloperidol plasma levels in Chinese vs. non-Chinese psychiatric patients. **Psychiatry Research**, v.30; p. 45 – 52, 1989.

JEFFERSON, J.W.; GREIST, J.H. Brussels sprouts and psychopharmacology (understanding the cytochrome P-450 enzyme system). In: JEFFERSON, J.W.; GREIST, J.H.; eds. **Annual of Drug Therapy**, v.3; Philadelphia, PA: WB Saunders; p. 2 – 22, 1996.

JENG, J.R.; HARN, H.G.; JENG, C.Y.; YUEH, K.C.; SHIEH, S.M. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in Chinese patients with hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.10; p. 558 – 561, 1997.

JENNE, J.W.: Studies of human patterns of isoniazid metabolism using na intravenous fall-off technique with a chemical method. **American Review of Respiratory Disease**, v. 81, n.1, p. 1 – 8, 1960.

KALOW, W. Interethnic variation in drug metabolism. **Trends in Pharmacology Sciences**, v.12, n.03; p. 102 – 107, 1991.

KAMIMORI, G.H.; KARYEKAR, C.S.; OTTERSTETTER, R.; COX, D.S.; BALKIN, T.J.; BELENKY, G.L.; EDDINGTON, N.D. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 234. i. 1-2,2. p. 159-167, March 2002.

KHANNA, J.M.; ISRAEL, Y. Ethanol metabolism. **International Review of Physiology**, v.21; p. 275 – 315, 1980.

KISKER, C.; SCHINDELIN, H. and REES, D.C. Molybdenumcofator-containing enzymes: structure and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v.66; p.233 – 267, 1998.

KOYSOOKO, R.; TUCHINDA, M.; HABANANADA, S.; PINTHONG, T.; WATTANAPERMPHOL, J.; GEADSOMNUIG, S. Pharmacokinetics of oral theophylline in Thai asthmatic children. **Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology**, v.5; p. 179 – 185, 1987.

KROEMER, H.K.; EICHELBAUM, M. “It’s the genes stupid”. Molecular basis and clinical consequence of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. **Life Science**, v.56; p. 2285 – 2299; 1995;

KRUL, C. e HAGEMAN, G. Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 709; p. 27 – 34, 1998.

KUPFER, A.; PREISING, R. Pharmacogenetic of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 26; p. 153 – 159, 1984.

KUPFER, A.; ROBERTS, R.K.; SCHENKER, S.; BRANCH, R.A. Stereoselective metabolism of mephenytoin in man. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 218; p. 193 – 199, 1981.

KURTH, J.H. Pharmacogenomics: future promise of a tool for identifying patients at risk. **Drug Information Journal**, v.34; p. 223 – 227, 2000.

LADERO, J.M.; ANDRES, M.P.; BANARES, A.; FERNANDEZ, B.; HERNANDEZ, C.; BETINEZ, J.; Acetylator polymorphism in rheumatoid arthritis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.45(3); p. 279 – 281, 1993.

LARES-ASSEFF, I.; TRUJILLO-JIMÉNEZ, F. La Farmacogenética y su importancia en la clínica. **Gaceta Médica de México**, v. 137. n. 3. p. 227 – 236, 2001.

LIN, K.M.; LAUE, J.K.; SMITH, R.; PHILIPS, P.; ANTAL, E.; POLAND, R.E. Comparison of alprazolam plasma levels in normal Asian and Cascasian male volunteers. **Psychopharmacology**, v.96; p. 365 – 369, 1988.

LIN, K.M.; POLAND, R.E. Ethnicity, culture, and psychopharmacology. In BLOOM, F.E.; KUPFER, D.I. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York, NY: Raven Press, 1995.

LINDER, M.W.; PROUGH, R.A.; VALDES, R. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. **Clinical Chemistry**, v.43. n.2; p. 254 – 266, 1997.

LLERENA, A.; DAHL, M.L.; EKVIST, B.; BERTILSSON, L. Haloperidol disposition is dependent on the debrisoquina hydroxylation phenotype: increased plasma levels of the reduced metabolite in poor metabolizers. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.14; p. 261 – 264, 1992.

MA, M.K.; WOO, M.H. and McLEOD, H.L. Genetic basis of drug metabolism. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.59, n.21, Nov 1; p. 2061 – 2069, 2002.

MARY H.H. ENSOM; THOMAS K.H. CHANG and PAYAL PATEL. Pharmacogenetics, the therapeutic drug monitoring of the future? **Clinical pharmacokinetic**, 40 (11); 783-802, 2001.

MASIMIREMBWA, C.M.; HASLER, J.A. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in African populations: Implication for the use of neuroleptics and antidepressants. **Brain Research Bulletin**, v.44; p.561 – 571, 1997.

MEYER, U.A.; ZANGER, M.U.; GRANT, D. y BLUM, M. Genetic polymorphisms of Drug metabolism. **Progress in Liver Diseases**, v. 9, p. 307 – 323, 1990.

MEYER, U.A.; ZANGER, M.U. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v.37; p. 269 – 296, 1997.

MEYER, U.A. The molecular basis of genetic polymorphism of drug metabolism. **Journal of Pharmacology**, v.46; p. 409 – 415, 1994.

MINERS, J.O.; BIRKETT, D.J. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27; n. 2; p. 245 – 249, 1996.

MIZOI, Y.; IJIRI, I.; TATSUNO, Y.; KIJIMA, T.; FUJIWA, S.; HISHIDA, J.A. Relationship between facial flushing and blood acetaldehyde levels after alcohol intake. **Pharmacology biochemistry and Behavior**, v.10, n.2, p. 303 – 311, 1979.

MITCHELL, R.S.; RIEMENSNIDER, D.K.; HARSCH, J.R.; BEL, J.C. New information on the clinical implications of individual variations in the metabolic handling of antituberculous drugs particularly isoniazid. In: 17th Conference Chemotherapy Tuberculosis, 1958, Washington D.C. US. Veterans Adm. Army Navy, **Annals of the 17th Conference Chemotherapy Tuberculosis**, p. 77 – 85, 1958.

NAKAJIMA, M.; YAMAMOTO, T.; NUNOYA, K.I.; YOKOI, T.; NAGASHIMA, K.; INOUE, K.; FUNAE, Y.; SHIMADA, N.; KAMATAKI, T.; KUROIWA, Y. Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v. 277; p. 1010 – 1015, 1996a

NAKAJIMA, M.; YAMAMOTO, T.; NUNOYA, K.I.; YOKOI, T.; NAGASHIMA, K.; INOUE, K.; FUNAE, Y.; SHIMADA, N.; KAMATAKI, T.; KUROIWA, Y. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. **Drug Metabolism and Disposition**; v. 24; p. 1212 – 1217; 1996b

NAKAJIMA, M.; YAMAGISHI, S; YAMAMOTO, H.; YAMAMOTO, T.; KUROIWA, Y.; YOKOI, T. Deficient cotinine formation from nicotine is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.67, n.01, p. 57-69, 2000.

NEBERT, D.W.; PETERSEN, D.D; PUGA, S.A. Human AH locus polymorphism and cancer: Inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. **Pharmacogenetics**, v.1, p. 68 – 78, 1991.

NEBERT, D.W. Polymorphism in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? **American Journal of Human Genetics**, v. 60, p. 265 – 271, 1997.

NERI, M.A.F. **Acesso ao documento primário:** Caracterización Fenotípica de Acetiladores Lentos y Rápidos em uma População mexicana. 1993. 75f. Tesis que para obtener el título de química farmaceutica bióloga; Universidad nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Edo. Do México, 1993.

NEWTON, R.; BROUGHTON, L.J.; LIND, M.J.; MORRISON, P.J.; ROGERS, H.J. AND BRADBROOK, I.D. Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.21. p. 45-52, 1981.

NORTON, R.M. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. In: **Medscape Pharmacotherapy**, 2001. <<http://www.medscape.com/medscape/pharmacology/journal/2001/mp7520.nort/mp7520.nort.html>>. Accessed May 4; 2001

NUNOYA, K.I.; YOKOI, T.; KIMURA, K.; KODAMA, T.; FUNAYAMA, M.; INOUE, K.; NAGASHIMA, K.; FUNAE, Y.; SHIMADA, N.; GREEN, C.; KAMATAKI, T. (+)-Cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl) thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502) as a novel substrate for cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v.277; p. 768 – 774, 1996.

NUNOYA, K.I.; YOKOI, T.; TAKAHASHI, Y.; KIMURA, K.; KINOSHITA, M.; KAMATAKI, T. Homologous unequal cross-over within the human CYP2A gene cluster as a mechanism for the deletion of the entire CYP2A6 gene associated with the poor metabolizer phenotype. **Journal of Biochemistry**, v. 126; p. 402 – 407, 1999.

OSCARSON, M.; Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29 (2); p. 91 -95; 2001

PELKONEN, O.; RAUNIO, H.; Individual expression of carcinogen-metabolizing enzymes: cytochrome P4502A. **Journal of Occupational Environmental Medicine**, v.37, n.1, p. 19 – 24, 1995.

PENA, S. D. J.; PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, EUA, v. 100, p. 177-182, 2003.

POIRIER, J. Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease. **Journal Psychiatry Neuroscience**, v.24, n.2, p. 147 – 153, 1999.

POTKIN, S.G.; SHEN, Y.; PARDES, H.; PHELPS, B.H.; ZHOU, D.; SHU, L.; KORPI, E.; WYATT, R.J. Haloperidol concentrations elevated in Chinese patients. **Psychiatry Research**, v.12, p.167 – 172, 1984.

RASHID, T.J.; MARTIN, U.; CLARKE, H.; WALLER, D.G.; RENWICK, A.G.; GEORGE, C.F. Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipina. **Brazilian Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, p. 51 – 58, 1995.

RASTOGI, M. An Overview of Pharmacogenomics. 1999 – 2000; **American Pharmaceutical Association Policy Committee Reports**.. <http://www.aphanet.org/govt/policycomm2000/pharmacobackground.html?clkd=iwm>. Accessed Nov 11, 2003

RAUTIO, A.; KRAUL, H.; KOJO, A.; SALMELA, E.; PELKONEN, O. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy individuals. **Pharmacogenetics**, v.2, p. 227 – 233, 1992.

REGALDO, A. Inventing the pharmacogenome business. **American Journal Health-System Pharmacy**, v.56, p. 40 – 50, 1999.

RENEWICK, A.G. Inter-ethnic differences in xenobiotic metabolism. **Environmental Toxicology and pharmacology**, v.2, p. 165 – 170, 1996.

RITSHEL, W.A. Handbook of Basic Pharmacokinetics. Drug Intelligence Publication, **In Hamilton IL**, 1982, p 1-15 and 133-157.

SARDAS, S.; LAHIJANY, B.; COK, I.; KARAKAYA, A.E. N-acetylation phenotyping with sulfamethazine in an Iranian population. **Pharmacogenetics**, v.3(3), p. 131-134, 1993

SARUWATARI, J.; NAKAAWA, K.; SHINDO, J.; TAJIRI, TAKAHIRO, T.; FUJIEDA, M.; YAMAZAKI, H.; KAMATAKI, T.; ISHIZAKI, T. A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.72, n.2, p.200-208, 2002.

SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; GUENGERICH, F.P. Ethnic-related differences in coumarin 7-hydroxylation activities catalyzed by cytochrome P2402A6 in liver microsome of Japanese and Caucasian populations. **Xenobiotica**, v.23, p.395 – 403, 1996.

SMITH, M.; HOPKINSON, D.D.; HARRIS, H. Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. **Annals of Human Genetics**, v.34, p. 251 – 271, 1971.

SPILKER, B. Special Patient Populations in: **Guide to Clinical Trials**. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 1991; p. 658 – 672

SUNAHARA, S.; URANO. M.; y AGAMA, W.: Genetical and Geographic Studies on isoniazid inactivation. **Science**, v. 134, p. 1530 – 1531, 1961.

SWANSON, H.I.; BRADFIELD, C.A. The AH receptor: genetics, structure and function. **Pharmacogenetic**, v. 3, p.213 – 230, 1993.

TANAKA, E. Clinical importance of non-genetic and genetic cytochrome P450 function tests in liver disease. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 23, p.161-170, 1998.

TANG, B.K.; KALOW, W. Assays for CYP1A2 by testing in vivo metabolism of caffeine in humans. **Methods in Enzymology**, v.272, p. 124 – 131, 1996.

TENG, Y.S.; JEHAM, S.; KIE-INJO, L.E. Human alcohol dehydrogenase ADH2 and ADH3 polymorphisms in ethnic Chinese and Indians of west Malaysia. **Human Genetics**, v.53, p. 87 – 90, 1979.

TENG, Y.S. Human live aldehyde dehydrogenase in Chinese and Asiatic Indians: gene deletions and its possible implications in alcohol metabolism. **Biochemical Genetics**, v.19, p.107 – 114, 1981.

WATBURG, J.P.V.; PAPENBERG, J.; AEBI, H. Atypical human alcohol dehydrogenase. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.43, p.889 – 898, 1965.

WATBURG, J.P.V.; SCHÜRCH, P.M. Atypical human liver alcohol dehydrogenase. **Annals of the New York Academy of Science**, v.151, p.936 – 946, 1968.

WEBER, W.W. The Molecular Basis Hereditary Acetylation Polymorphisms - Commentary. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 14, n.04, p. 377 – 381, 1986.

WILKINSON, G.R. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics** 10th ed. New York: McGraw Hill: HARDMAN, J.G et al (Ed); 2001. chapt.1, p 3-29.

WOOD, A.J.J.; ZHOU, H.H. Ethnic differences in drug disposition and responsiveness. **Clinical Pharmacokinetics**, v.20, n.5, p. 350 – 373, 1991.

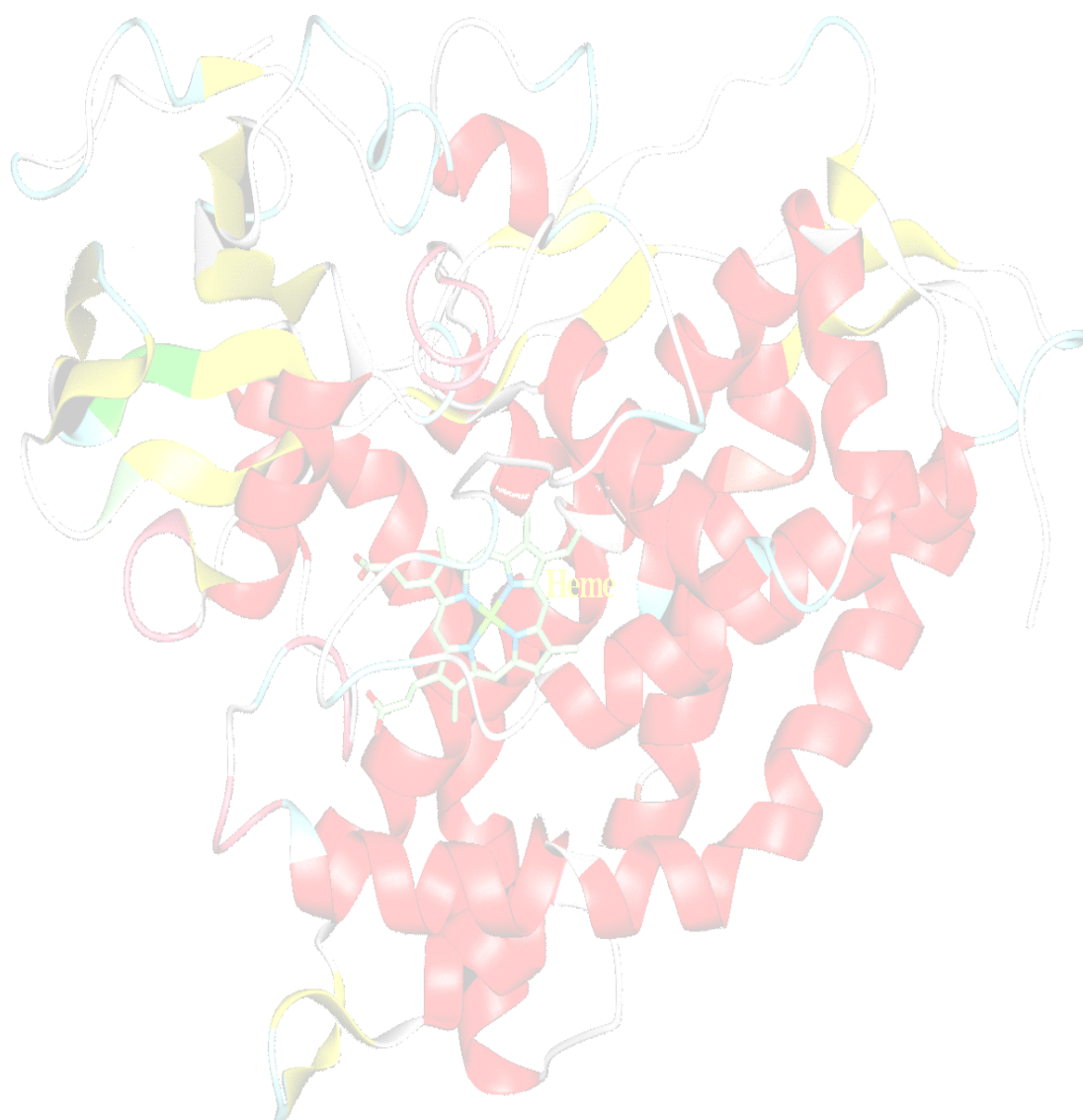
WORMHOUDT, L.W.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Genetic polymorphism of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v.29, n.01, p. 59 – 124, 1999.

ZEVIN, S.; BENOWITZ, N.L. Drug interactions with tobacco somoking. An update. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 36, n.06, p. 425 – 438, 1999.

ZHANG-WONG, J.; BEISER, M.; ZIPURSKY, R.B.; BEAN, G.; An investigation of ethnic and gender differences in the pharmacodynamics of haloperidol. **Psychiatry Research**, v.81, p. 333 – 339, 1998.

ZHOU, H.H.; KOSHAKJI, R.P.; SILBERSTEIN, D.J.; WILKINSON, G.R.; WOOD, A.J.; Altered sensitivity to the clearance of propranolol in men of Chinese descent as compared to American whites. **New England Journal of Medicine**, v.320, p. 565 – 570, 1989.

ZHOU, H.H.; SHAY, S.D.; WOOD, A.J.. Contribution of differences in plasma binding of propranolol to ethnic differences in sensitivity. Comparison between Chinese and CASCasians. **Chinese Medicine Journal**, v.106, p. 898 – 902, 1993.



Glossário

GLOSSÁRIO

POLIMORFISMO: Alteração genética presente em cerca de 1% da população. Pode ser produzida por mutações pontuais, conversões gênicas, deleções ou inserções.

FÁRMACO “PROBE”: Também chamado de fármaco de sondagem. Corresponde a um fármaco utilizado como ferramenta farmacológica para avaliação do fenótipo de uma enzima metabolizadora.

ESTUDO FASE I: é estabelecida a segurança do fármaco em função da dose, num pequeno grupo de voluntários sadios (caso haja expectativa de que o fármaco tenha uma toxicidade significativa, tal como ocorre geralmente na terapia de câncer e da AIDS, são utilizados na fase I voluntários portadores da doença e não voluntários normais).

ESTUDO FASE II: a medicação é administrada pela primeira vez em pacientes com a doença-alvo para determinar sua eficácia onde um pequeno grupo de pacientes (10-200) é estudado de modo detalhado.

ESTUDO FASE III: a droga é avaliada em um número maior de pacientes (por vezes milhares deles) para estabelecer melhor sua segurança e eficácia. São de difícil planejamento e caros devido ao grande número de pacientes envolvidos.

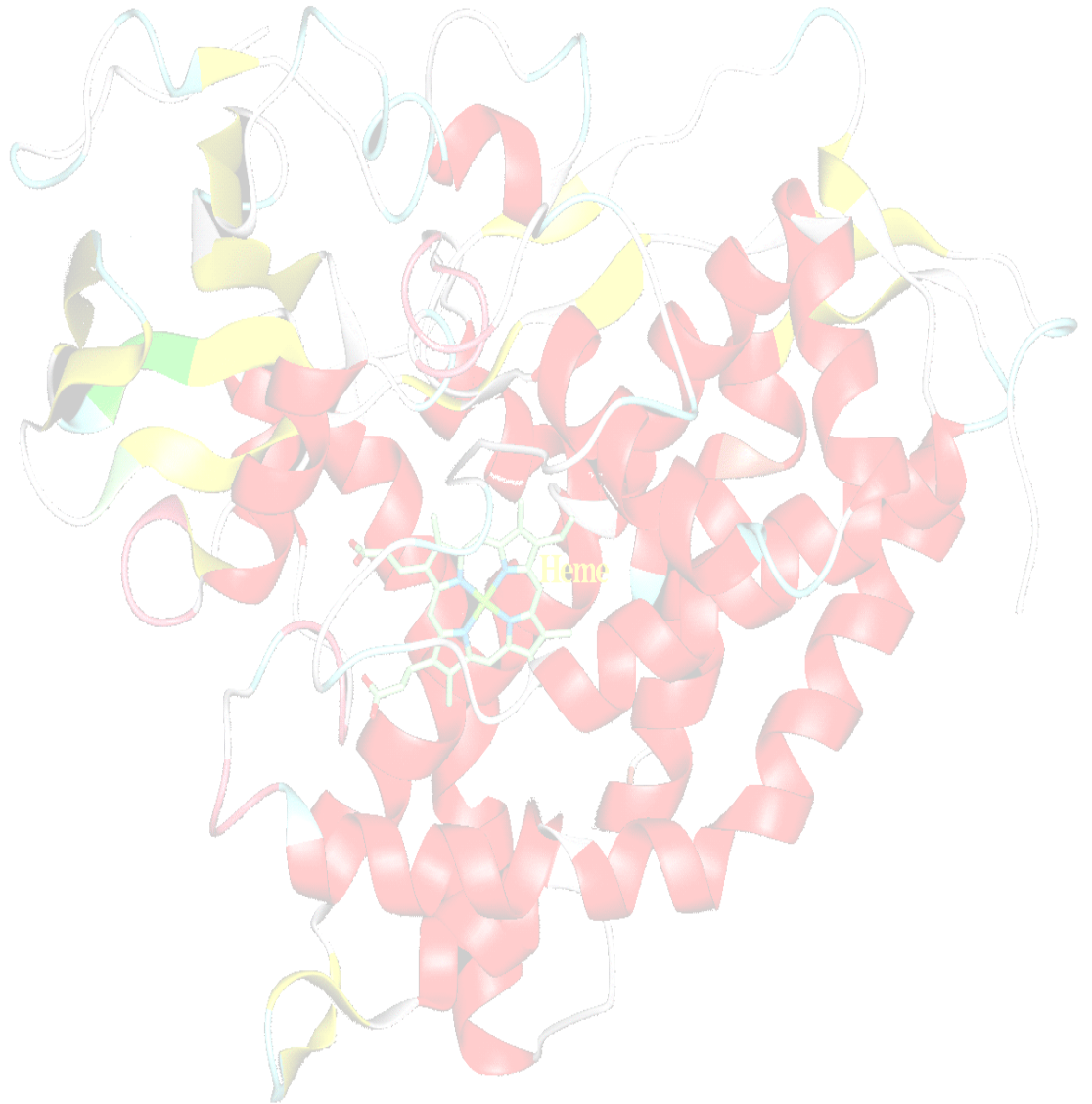
ESTUDO FASE IV: tem início após obter-se a aprovação para a comercialização do fármaco, constitui o monitoramento do fármaco em condições de uso em um grande número de pacientes.

ESTUDO ABERTO: tanto o pesquisador responsável como o sujeito da pesquisa são informados e têm conhecimento sobre a medicação que será administrada.

IMC: Índice de Massa Corpórea (IMC): é a razão do peso (kg) pela altura (m^2) ao quadrado. É o melhor indicador de obesidade, pois enfatiza a adiposidade relativa dos indivíduos e minimiza os efeitos da altura. O valor ideal é de 20 – 27 kg/m^2 segundo Ministry

of National Health and Welfare, Canadá, entretanto, a National Academy of Sciences enfatiza que o IMC aumenta com a idade, de 19 – 24 para adultos jovens e de 24 – 29 para acima de 65 anos.

PADRÃO INTERNO: substância que apresenta semelhanças com a droga em questão, fórmula estrutural e tempo de retenção na determinação analítica. Deve apresentar concentração conhecida, pois funcionará como um controle de qualidade do funcionamento do aparelho que irá quantificar o princípio ativo e/ou seus metabólitos.



Anexos

ANEXO 1 - Valores de Referência dos Exames laboratoriais.

Tabela 27- Valores de referência para a Análise Hematológica

DADOS HEMATOLÓGICOS – VALORES DE REFERÊNCIA		
PARÂMETROS	HOMENS	MULHERES
Hemoglobina (g/dL)	13,5-18	11,5-16,4
Hematócrito (%)	40-54	36-47
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	150 a 450	
Leucócitos totais ($/\text{mm}^3$)	5-10	
Contagem Diferencial		
Bastões	1-3	
Segmentados	40-75	
Eosinófilos	1-6	
Basófilos	0-1	
Linfócitos	20-45	
Monócitos	2-10	

Tabela 28 - Valores de referência para função hepática

PARÂMETROS DE FUNÇÃO HEPÁTICA		
PARÂMETROS	HOMENS	MULHERES
TGO	Até 38	Até 32
TGP	Até 41	Até 31
Gama GT	8 - 61	5 - 36
Fosfatase Alcalina	Até 270	
Proteína Total	6,3 – 8,2	
Bilirrubina	0,32 – 1,1	

Tabela 29 - Valores de referência para função hepática

PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL		
PARÂMETROS	HOMENS	MULHERES
Creatinina (mg/dL)	0,7 – 1,2	0,5 – 0,9
Clearance de Creatinina	-	-

Tabela 30 – Valores de referencia para função Renal

PARÂMETROS DE FUNÇÃO METABÓLICA		
PARÂMETROS	HOMENS	MULHERES
Glicose	70 - 110	
Ácido Úrico	3,4 – 7,0	2,4 – 5,7
Colesterol Total	Até 239	
Triglicérides	Até 200	

ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido

“Avaliação do perfil fenotípico de uma população de voluntários saudáveis”

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidas.

O abaixo-assinado, Nome, idade, RG nº, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos pesquisadores Ma. Elisabete Amaral de Moraes e Gilmara Silva de Melo Santana da Unidade de Farmacologia Clínica do HUWC- UFC.

O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é avaliar o fenótipo de metabolização da cafeína em 200 voluntários saudáveis, da população do Ceará.

ii - Durante o estudo, você será internado nas instalações da Unidade de Farmacologia Clínica, por um período de aproximadamente 13 horas.

iii - O voluntário tomará um comprimido de 200mg de cafeína com um copo d'água de 200mL e permanecerá na Unidade para coleta de plasma nas próximas 12 horas. Serão coletadas amostras de sangue de 6 ml (cada) com butterfly (scalpe) ou catéter venoso heparinizado durante o internamento.

iv - Nas 10 horas que sucederem à administração da cafeína, toda a sua urina deverá ser armazenada em recipiente específico, para posterior análise.

iv - A participação neste estudo não tem objetivo de lhe submeter a um tratamento terapêutico.

v - A administração oral de cafeína, de maneira continuada, pode causar efeitos colaterais como perda do sono, dor de estômago, náusea e vômitos. Entretanto, o aparecimento de efeitos indesejáveis, após administração de dose única da cafeína, tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

vi - Se você faz uso de álcool diariamente, não poderá participar neste estudo. Em caso de qualquer dúvida, por favor pergunte, que você será esclarecido pelos responsáveis da pesquisa.

vii. Será submetido antes da primeira e após a segunda internação aos seguintes exames laboratoriais: de sangue (hemograma, creatinina sérica e clearance de creatinina, bilirrubina, proteína total, albumina, glicemia, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico, γ GT, sumário de urina e do coração (eletrocardiograma). Esses exames tem a finalidade de ajudar ao médico na decisão de incluí-lo ou não neste tipo de pesquisa. Uma cópia dos exames será fornecida para você no final do estudo, conforme solicitação.

viii - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

xi - Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico desta Instituição.

xii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

xiii - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade de Farmacologia Clínica não o(a) identificará por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

xiv - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de ambulatório médico do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC e solicitar que o mesmo contate os médicos responsáveis pelo ensaio clínico, nos telefones abaixo.

xv - A Unidade de Farmacologia Clínica o(a) manterá informado(a) e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme solicitação do voluntário.

xvi - Poderá contatar a Secretaria da Comissão de Ética (fone: 288-8338) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

xvi - De acordo com valores previamente estabelecidos, os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos na realização do supracitado estudo clínico

xvii - É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

xviii - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que não esteja grávida, comprovado pela sorologia (Beta-HCG).

Fortaleza,

Assinatura do voluntário

Maria Elisabete Amaral de Moraes – Fone: 288-8346

Gilmara Silva de Melo Santana – Fone 292.8268

Unidade de Farmacologia Clínica - 288-8250

ANEXO 3 - Valores Individuais de Atividade Enzimática

Tabela 31 - Valores individuais de atividade das enzimas CYP1A2, NAT2, XO e CYP2A6 dos 79 voluntários avaliados, a partir das razões entre os metabólitos da cafeína avaliados (AFMU, 1U, 1X, 17U, 17X). CYP1A2 = (AFMU + 1X + 1U)/ 17U; CYP2A6 = 17U / (AFMU + 1X + 1U + 17X + 17U); NAT2 = AFMU/ (AFMU + 1X + 1U) e XO = 1U/ (1X + 1U).

VOLUNTÁRIO		CYP1A2	NAT2	XO	CYP2A6
01	MMA	1,6812	0,1571	0,0947	0,2179
03	TMA	1,4728	0,0219	0,0841	0,3038
04	MPE	1,8235	0,0964	0,1369	0,2460
05	AOD	1,5400	0,0065	0,2197	0,2182
06	ASS	1,6476	0,1870	0,1242	0,2236
07	FMA	1,2493	0,2038	0,1456	0,3274
08	CVSO	2,1346	2,3149	0,1634	0,1955
09	ARAP	0,8466	1,5844	0,2568	0,2226
10	MHPA	1,0059	1,6091	0,2466	0,2696
11	MZCM	1,0375	0,4248	0,4144	0,2609
12	SRO	2,1164	1,7673	0,2142	0,2047
13	TRS	1,1506	1,1932	0,2295	0,2857
14	TRL	1,9792	1,2705	0,1779	0,2342
16	FAMA	0,6815	3,0027	0,2844	0,2941
17	WM	3,2333	3,1451	0,3742	0,1566
18	GBP	1,2097	0,0985	0,1453	0,2601
19	AV	0,8601	0,7345	0,1194	0,2071
20	DCA	1,5054	1,4602	0,1679	0,2300
21	ASO	1,3002	0,2795	0,2837	0,2751
22	VSM	2,2206	1,4658	0,2551	0,2088
23	DSC	1,2764	0,7345	0,1006	0,2627
24	EQA	2,9719	0,7345	0,2778	0,1250
25	SVN	1,2373	0,1140	0,2211	0,2423
26	RFL	2,1496	1,4338	0,3064	0,2389

VOLUNTÁRIO		CYP1A2	NAT2	XO	CYP2A6
27	FAAA	1,1819	0,3044	0,2966	0,2913
28	JGR	1,3874	1,4114	0,2532	0,2984
29	CEBP	2,0364	0,1262	0,4308	0,2398
30	FABR	2,1990	2,1632	0,1760	0,2571
31	FGR	1,4674	0,4231	0,0927	0,2661
32	FSM	3,9525	4,2238	0,0807	0,1982
33	CLSG	1,8939	1,2134	0,1503	0,2572
34	ALFV	3,0083	2,2855	0,1237	0,1791
35	MCL	1,7615	0,1198	0,1810	0,2308
36	MRSP	0,7183	0,3514	0,3808	0,3936
37	MOM	1,5401	0,0438	0,1793	0,2685
38	MFH	2,5726	1,6275	0,1825	0,1831
39	FAK	0,4988	3,8769	0,5374	0,2804
40	SDDF	1,9019	0,9602	0,1079	0,2685
43	IMB	1,4568	0,1300	0,1703	0,3085
44	VPT	3,0362	2,1538	0,2118	0,2030
45	MGS	0,9051	1,0758	0,3521	0,2051
46	APRS	1,7959	2,8220	0,3353	0,2112
47	MFG	0,8262	0,4015	0,2616	0,3038
48	BAC	1,1733	0,0101	0,1734	0,3199
49	FHSA	1,1868	0,2916	0,1565	0,2229
50	RTL	2,8091	2,5674	0,2965	0,1716
51	KQS	1,1292	6,5261	0,5777	0,2706
52	RFA	1,3377	0,6613	0,1732	0,2403
53	FWPC	3,4099	3,3992	0,3090	0,1736
54	LNL	0,7900	0,3966	0,2011	0,2074
55	JBR	0,6395	0,4434	0,1281	0,2860
56	FEOM	1,8169	0,1165	0,1190	0,1813
57	GVA	0,4263	0,7725	0,2650	0,2654

VOLUNTÁRIO		CYP1A2	NAT2	XO	CYP2A6
58	OLMN	1,1820	3,2699	0,4836	0,1824
59	RMA	1,8707	0,5669	0,3536	0,2305
61	JIOBR	0,7605	1,6253	0,3814	0,3531
62	AVM	0,9936	0,2610	0,2939	0,2714
63	MCLS	1,8907	0,1824	0,1962	0,2055
64	JFSJ	2,1609	1,0306	0,1124	0,2007
65	PDOC	0,5570	0,2024	0,2979	0,3619
66	MCR	2,0895	0,1892	0,2084	0,2741
67	FGSF	1,1760	1,9751	0,3864	0,3006
68	RFP	0,9111	0,2948	0,0476	0,3453
70	JILF	1,0813	0,1346	0,2252	0,2486
71	JSDL	1,6477	0,0353	0,1058	0,2233
72	FRSC	3,6136	0,1703	0,4690	0,1780
73	SAA	0,7916	0,4390	0,2958	0,3442
74	MLOM	2,1840	1,0362	0,1409	0,2391
75	IOV	0,5890	0,5337	0,2298	0,4806
76	MLSC	1,2388	0,0546	0,1575	0,2978
77	SMLC	1,8073	1,6042	0,0890	0,2551
78	FMFP	1,5132	1,4606	0,1213	0,2669
79	AAS	0,4258	0,2742	0,2913	0,4045
80	CGRF	1,2026	0,3998	0,3064	0,2652
81	FCAA	0,6131	0,8548	0,5103	0,4011
82	ALAA	0,6565	0,6279	0,2076	0,2883
83	ALBT	0,9888	0,2517	0,2093	0,2164
84	GCS	1,6224	4,5546	0,2391	0,2831
85	FMNC	1,3942	0,3706	0,2746	0,2491
Média		1,5366	1,1073	2337	0,2540
Desvio Padrão (SD)		0,7656	1,2310	0,1140	0,0641

ANEXO 4 - Abreviaturas dos Parâmetros Farmacocinéticos

ASC: Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo, relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção do fármaco pode ser calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.

ASC_{0-t} : Área sob a Curva do Tempo Zero ao Tempo T, relaciona-se com a quantidade do fármaco absorvida do tempo zero ao tempo t, onde t é a última coleta determinada experimentalmente (no caso do nosso estudo o t é igual a 24 horas).

ASC_{0-inf} : Área sob a Curva do Tempo Zero ao infinito, corresponde à ASC 0-t somada à extrapolação para o tempo infinito.

ASC_{0-inf/0-t} : Relação entre a área sob a curva do tempo zero ao infinito e a área sob a curva do tempo zero ao tempo t. Não deve ser inferior a 0,8.

Cmax: Concentração Máxima Atingida no Plasma, concentração mais elevada do fármaco atingida na circulação sanguínea após administração de um fármaco. Relaciona-se a intensidade da resposta farmacológica. O Cmax ideal deve estar dentro da janela terapêutica.

Tmax: Tempo necessário para atingir a concentração máxima no plasma, é obtido através da observação direta.

ke: Constante de Eliminação, representa a soma de todas as taxas constantes para remoção do fármaco do corpo.

t_{1/2}: Meia Vida de Eliminação do fármaco, representa o tempo em que a concentração do fármaco no plasma é reduzida a metade. Calcula-se através do logaritmo neperiano (ln) de 2 (ln2= 0,693) dividido pela constante de eliminação. $t_{1/2} = \ln 2 / K$.

CL: Clearance

Vd: Volume de Distribuição

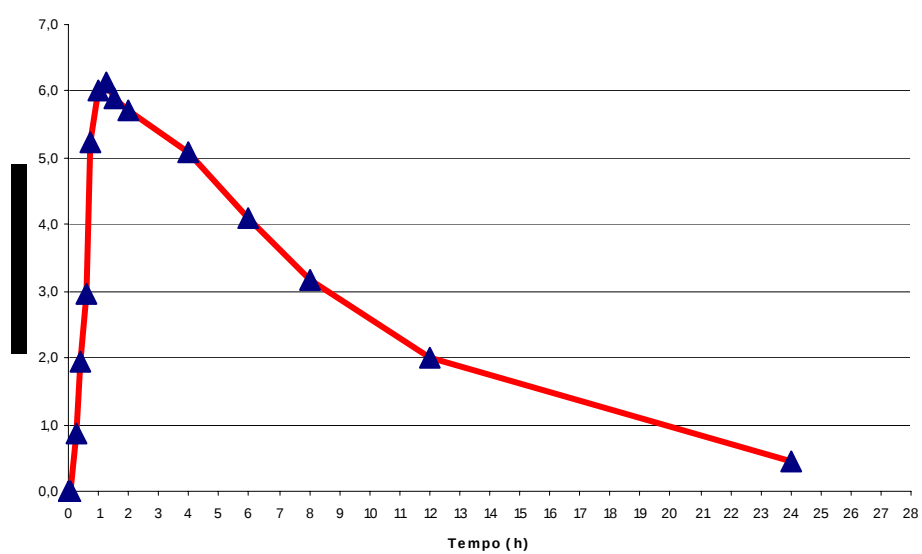
Vd/kg: Volume de Distribuição por kilograma

ANEXO 5 - Dados Farmacocinéticos dos Voluntários

DADOS DO VOL 03 TMA

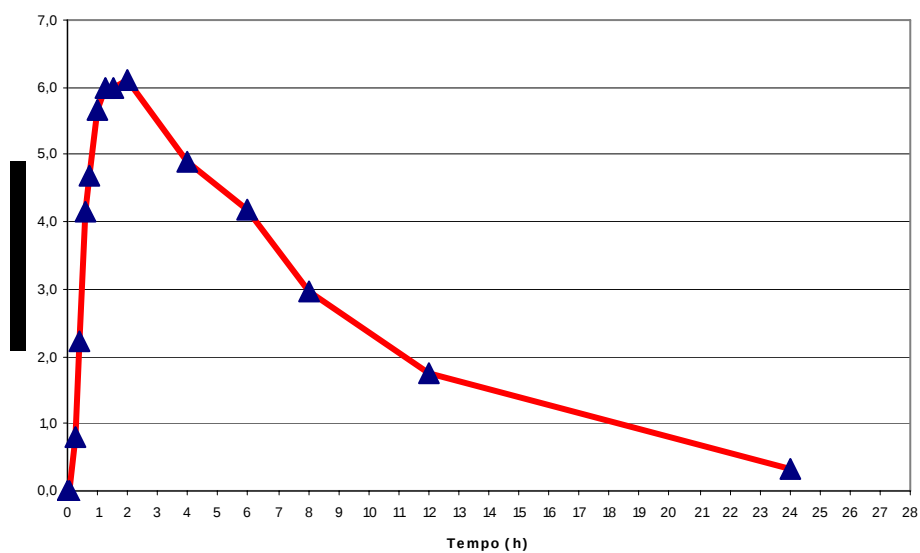
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	61,08927
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	65,11312
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,938202
ke (h ⁻¹)	0,11409
t _{1/2} (h)	6,07546
C _{max} (µg/mL)	6,138233
T _{max} (h)	1,25
CL (mL/h)	291,7999
V _d (L)	2,557636
V _d (L/kg)	0,044097

AUC Vol 03 TMA



DADOS DO VOL 04 MPE

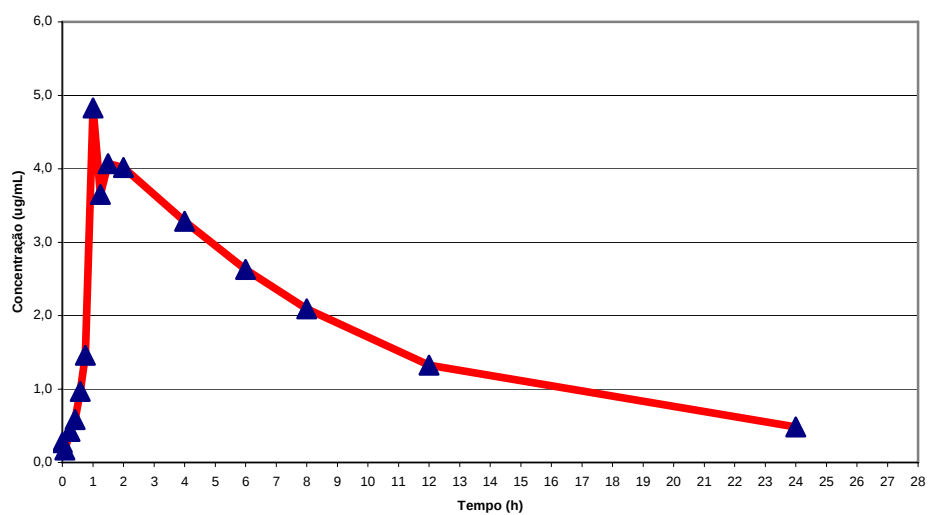
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	57,95221
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	60,34453
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,960356
ke (h ⁻¹)	0,135542
t _{1/2} (h)	5,113884
C _{max} (µg/mL)	6,117939
T _{max} (h)	2
CL (mL/h)	314,8587
V _d (L)	2,322957
V _d (L/kg)	0,045548

AUC Vol 04 MPE

DADOS DO VOL 05 AOD

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	40,92853
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	45,93662
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,890978
ke (h ⁻¹)	0,096682
t _{1/2} (h)	7,169324
C _{max} (µg/mL)	4,827809
T _{max} (h)	1
CL (mL/h)	413,6134
V _d (L)	4,278065
V _d (L/kg)	0,060682

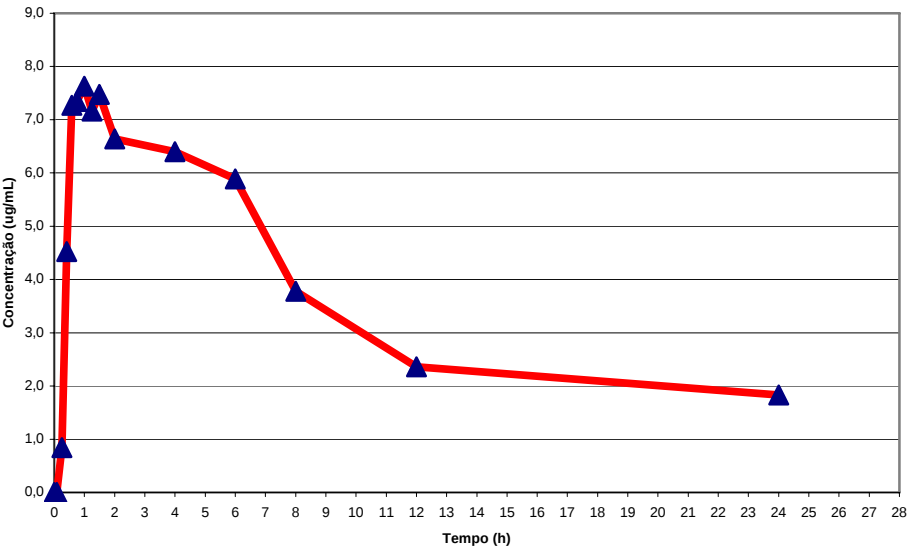
AUC Vol 05 AOD



DADOS DO VOL 08 CVSO

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	84,24397
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	111,4294
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,75603
ke (h-1)	0,067515
t _{1/2} (h)	10,26659
Cmax (µg/mL)	7,629544
Tmax (h)	1
CL (mL/h)	170,5115
Vd (L)	2,525542
Vd (L/kg)	0,051542

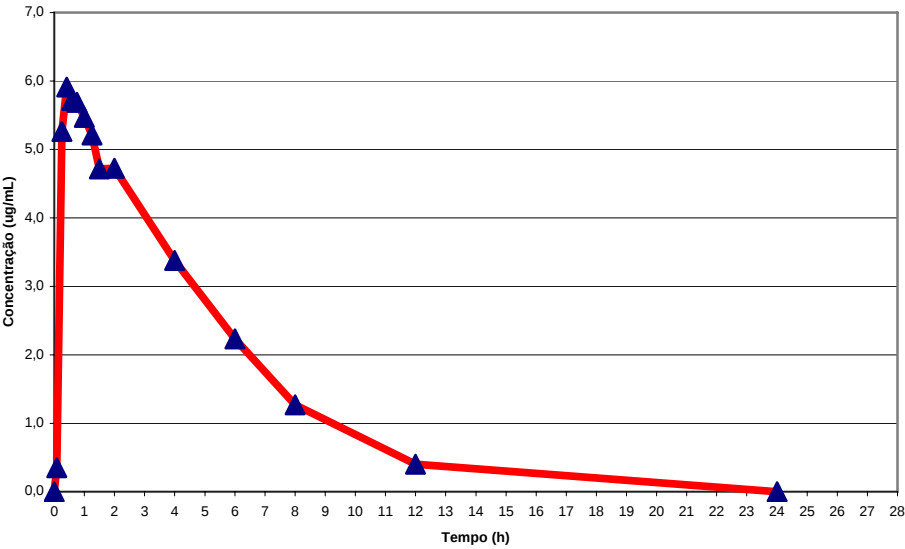
AUC Vol 08 CVSO



DADOS DO VOL 17 WM

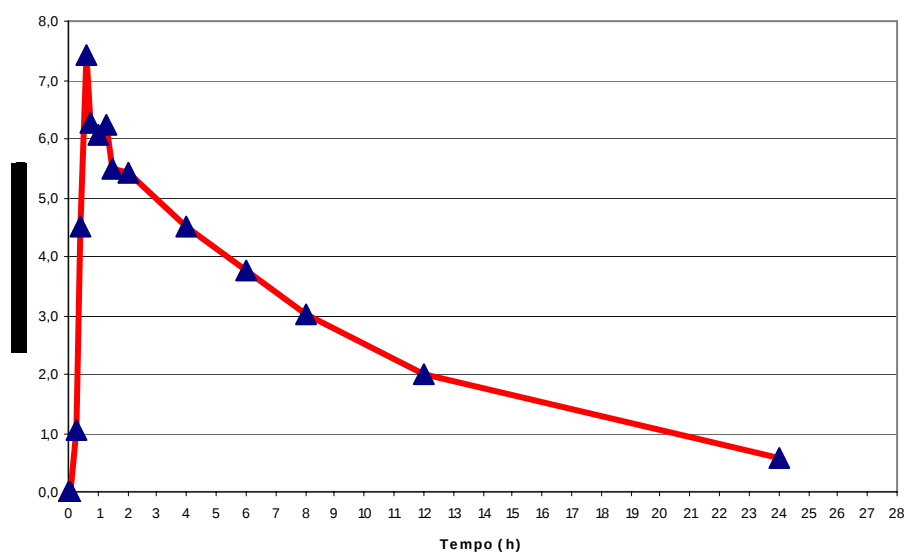
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS		
	a	b
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	32,64512	
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	32,64512	32,64512
AUC _{0-inf/ 0-t}	1	32,64512
ke (h-1)	0,191761	142,4936
t _{1/2} (h)	3,614647	0,249926
Cmax (µg/mL)	5,910315	2,773413
Tmax (h)	0,41666	5,910315
CL (mL/h)	582,0165	
Vd (L)	2,328758	
Vd (L/kg)	0,038176	

AUC Vol 17 WM



DADOS DO VOL 18 GBP

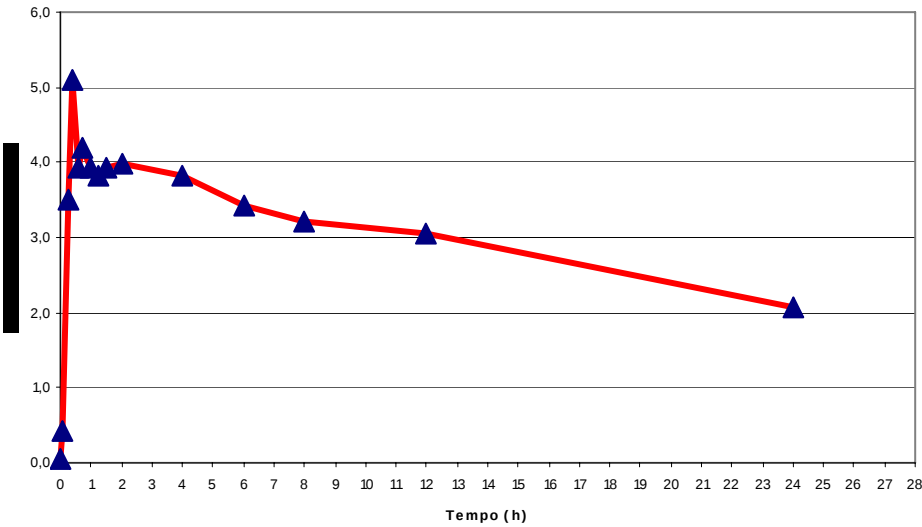
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	60,67608
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	66,5068
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,912329
ke (h ⁻¹)	0,101305
t _{1/2} (h)	6,842203
Cmax (µg/mL)	7,426964
Tmax (h)	0,58333
CL (mL/h)	285,6851
Vd (L)	2,820058
Vd (L/kg)	0,043722

AUC Vol 18 GBP

DADOS DO VOL 24 EQA

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	72,39613
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	143,9079
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,503073
ke (h-1)	0,029064
t _{1/2} (h)	23,84883
Cmax (µg/mL)	5,099056
Tmax (h)	0,41666
CL (mL/h)	132,0289
Vd (L)	4,542665
Vd (L/kg)	0,064435

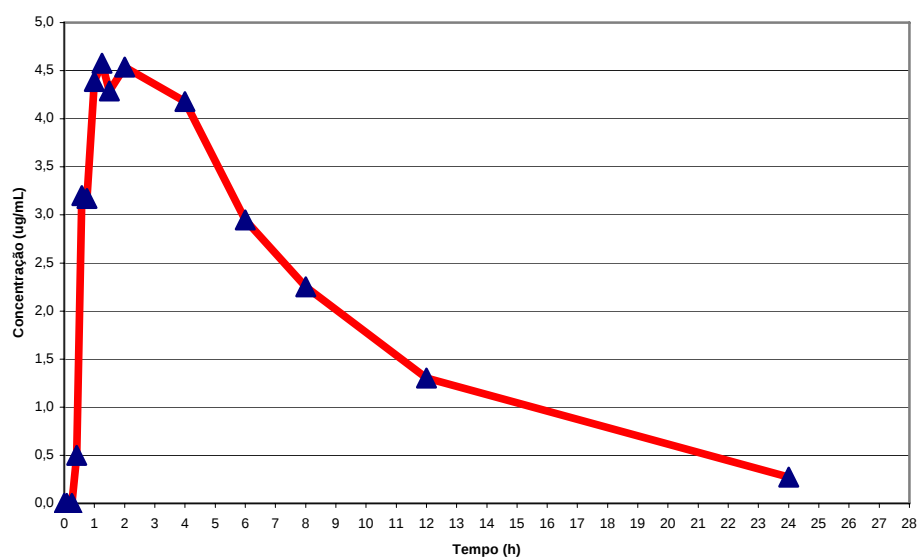
AUC Vol 24 EQA



DADOS DO VOL 29 CEBP

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	43,88231
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	45,96628
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,954663
ke (h ⁻¹)	0,131374
t _{1/2} (h)	5,276152
C _{max} (µg/mL)	4,57738
T _{max} (h)	1,25
CL (mL/h)	413,3465
V _d (L)	3,146343
V _d (L/kg)	0,047672

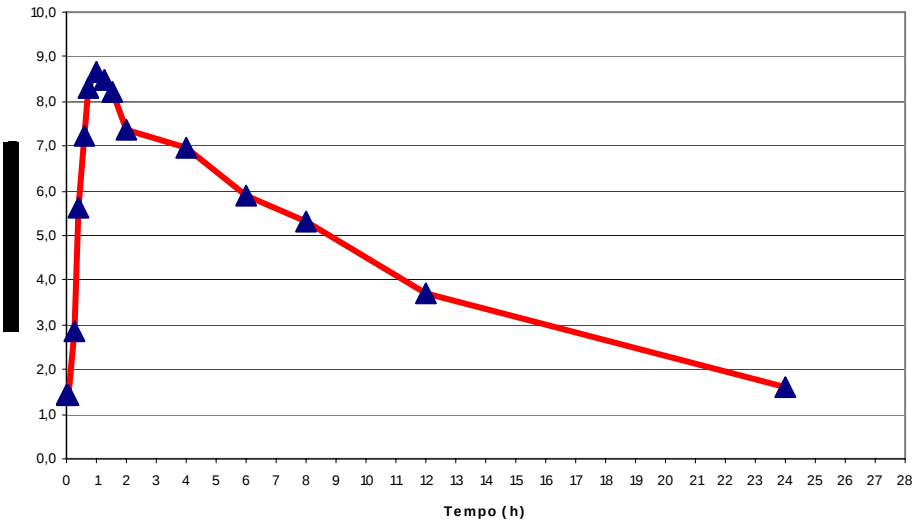
AUC Vol 29 CEBP



DADOS DO VOL 32 FSM

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	101,9515
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	124,1751
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,82103
ke (h-1)	0,072426
t _{1/2} (h)	9,570425
Cmax (µg/mL)	8,6494
Tmax (h)	1
CL (mL/h)	153,0097
Vd (L)	2,112637
Vd (L/kg)	0,038412

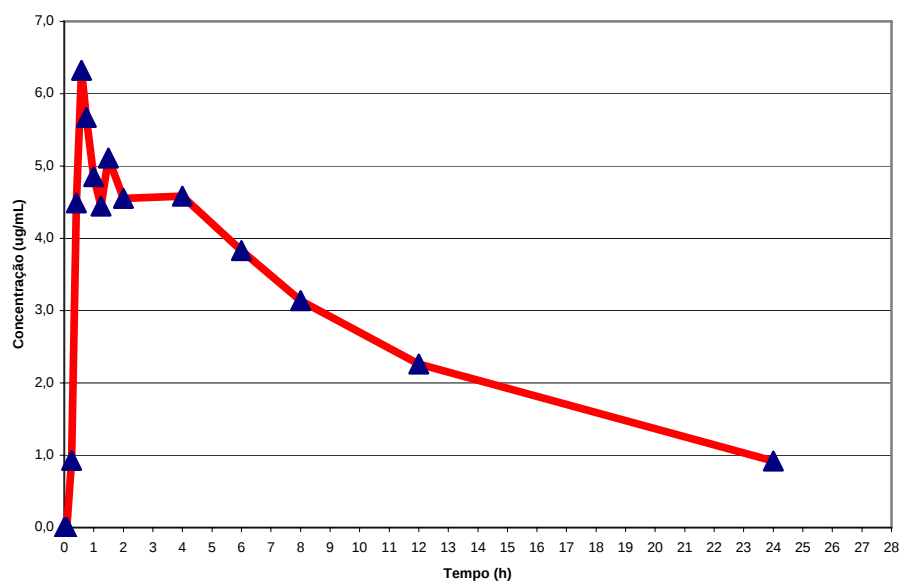
AUC Vol 32 FSM



DADOS DO VOL 34 ALFV

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	62,94605
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	74,53242
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,844546
ke (h-1)	0,079533
t _{1/2} (h)	8,715224
Cmax (µg/mL)	6,32519
Tmax (h)	0,58
CL (mL/h)	254,9226
Vd (L)	3,205247
Vd (L/kg)	0,048935

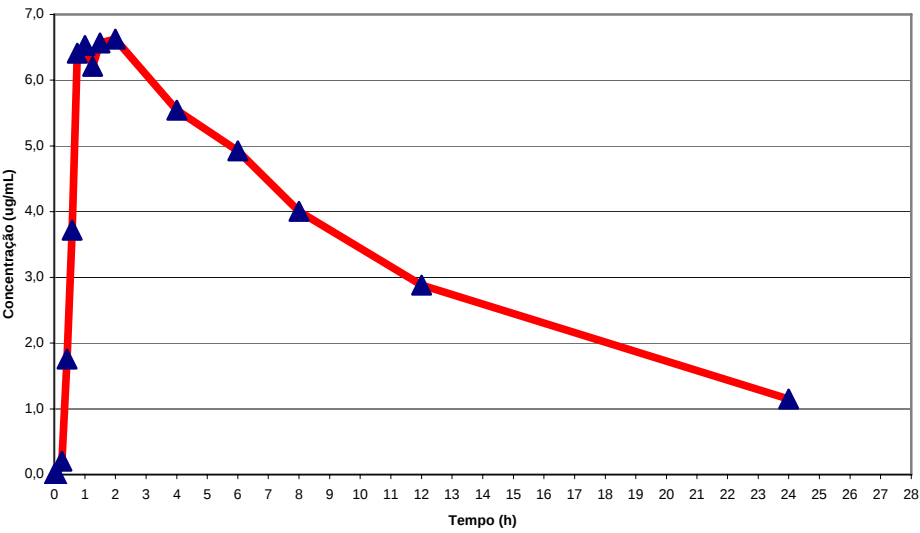
AUC Vol 34 ALFV



DADOS DO VOL 36 MRSP

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	79,10014
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	93,46623
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,846296
ke (h-1)	0,079838
t _{1/2} (h)	8,681952
Cmax (µg/mL)	6,62741
Tmax (h)	2,00
CL (mL/h)	203,282
Vd (L)	2,54619
Vd (L/kg)	0,046294

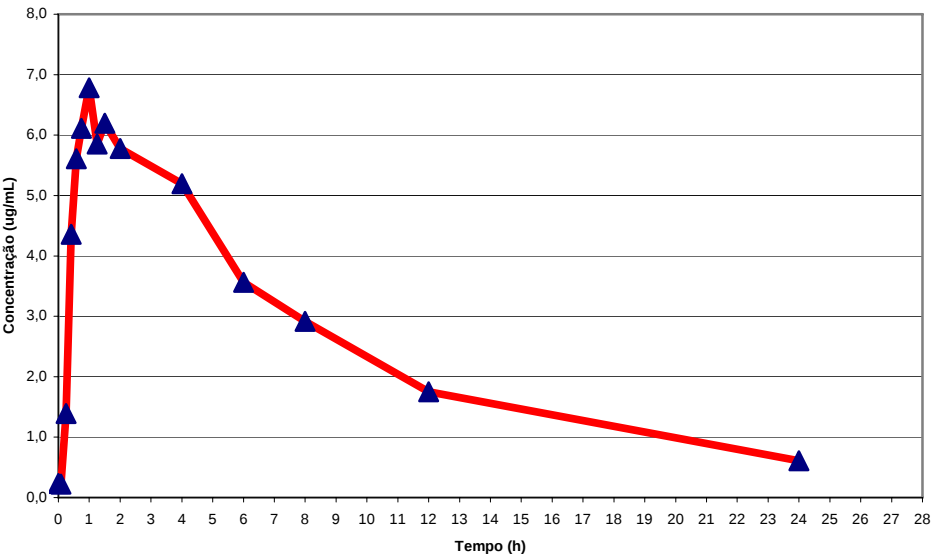
AUC Vol 36 MRSP



DADOS DO VOL 37 MOM

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	59,84348
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	65,66551
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,911338
ke (h-1)	0,104875
t _{1/2} (h)	6,609283
Cmax (µg/mL)	6,77970
Tmax (h)	1,00
CL (mL/h)	289,3452
Vd (L)	2,758958
Vd (L/kg)	0,057478

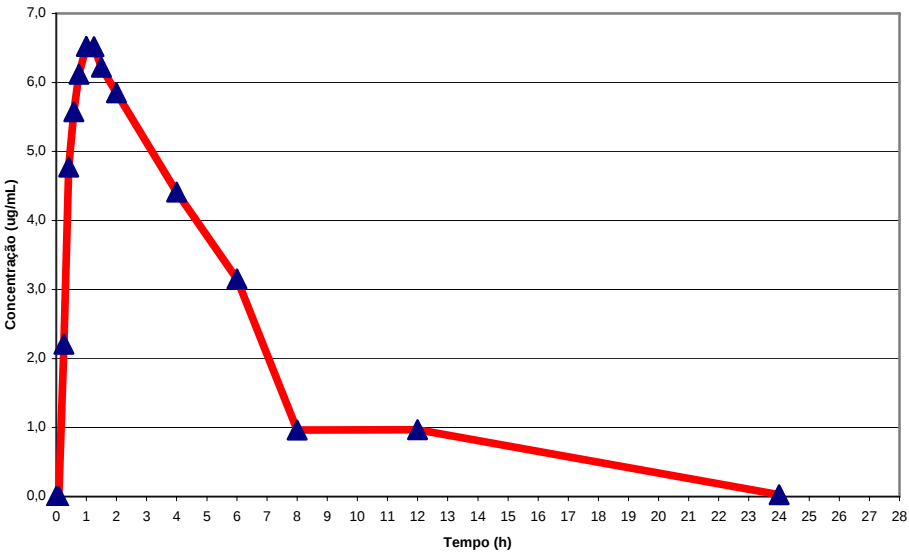
AUC Vol 37 MOM



DADOS DO VOL 38 MFH

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	42,21231
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	42,32712
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,997288
ke (h-1)	0,241709
t _{1/2} (h)	2,867694
Cmax (µg/mL)	6,52341
Tmax (h)	1,00
CL (mL/h)	448,8848
Vd (L)	1,857129
Vd (L/kg)	0,036414

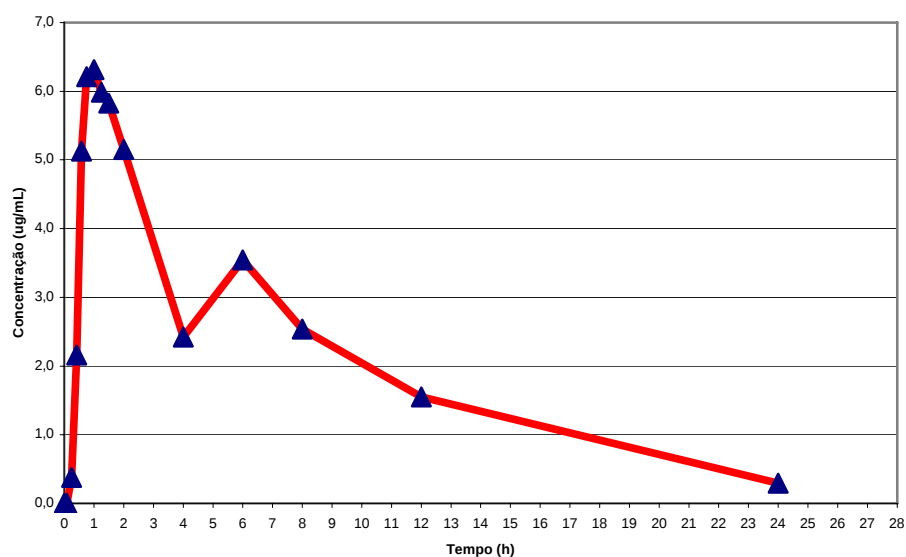
AUC Vol 38 MFH



DADOS DO VOL 39 FAK

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	47,98774
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	50,12265
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,957406
ke (h ⁻¹)	0,137198
t _{1/2} (h)	5,052156
C _{max} (µg/mL)	8,6494
T _{max} (h)	1
CL (mL/h)	379,0701
V _d (L)	2,762936
V _d (L/kg)	0,050235

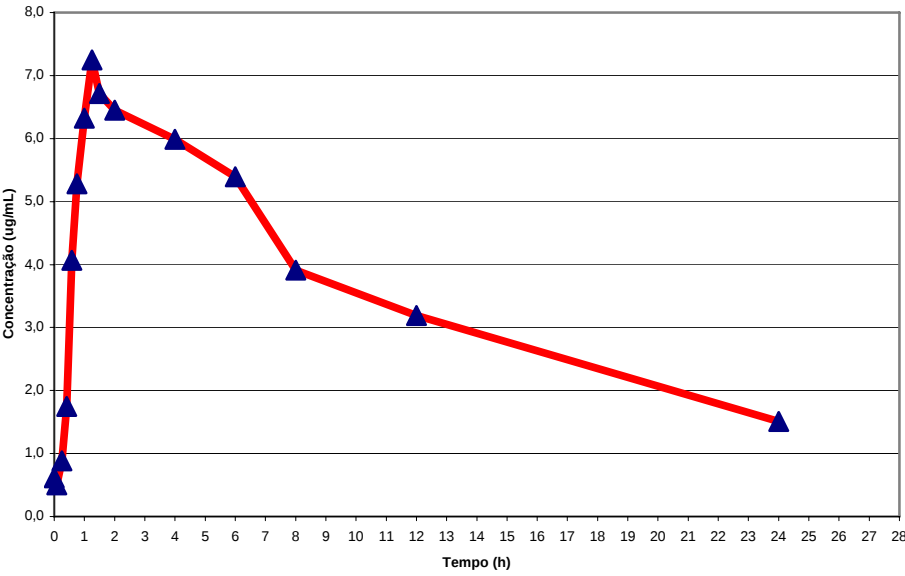
AUC Vol 39 FAK



DADOS DO VOL 48 BAC

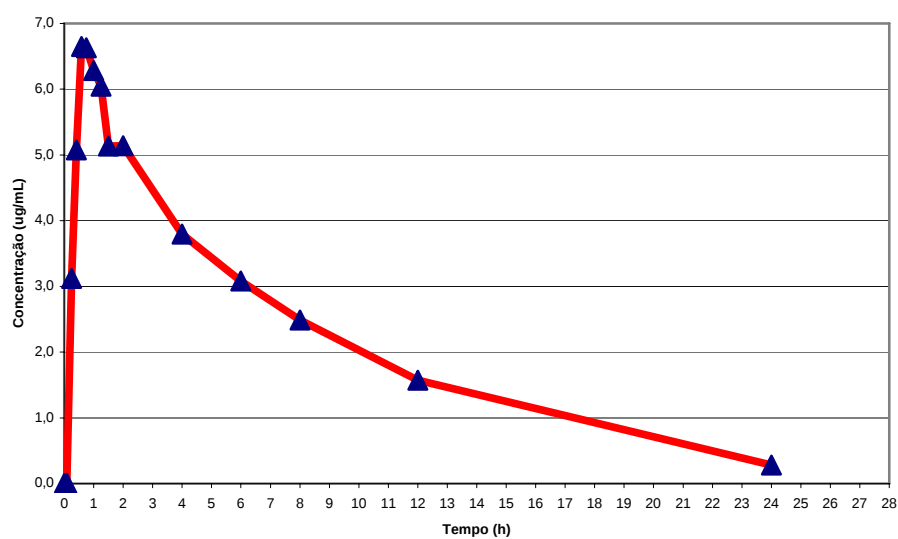
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	85,37976
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	107,4498
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,794601
ke (h-1)	0,06846
t _{1/2} (h)	10,12484
Cmax (µg/mL)	7,24612
Tmax (h)	1,25
CL (mL/h)	176,8267
Vd (L)	2,582918
Vd (L/kg)	0,047832

AUC Vol 48 BAC



DADOS DO VOL 50 RTL

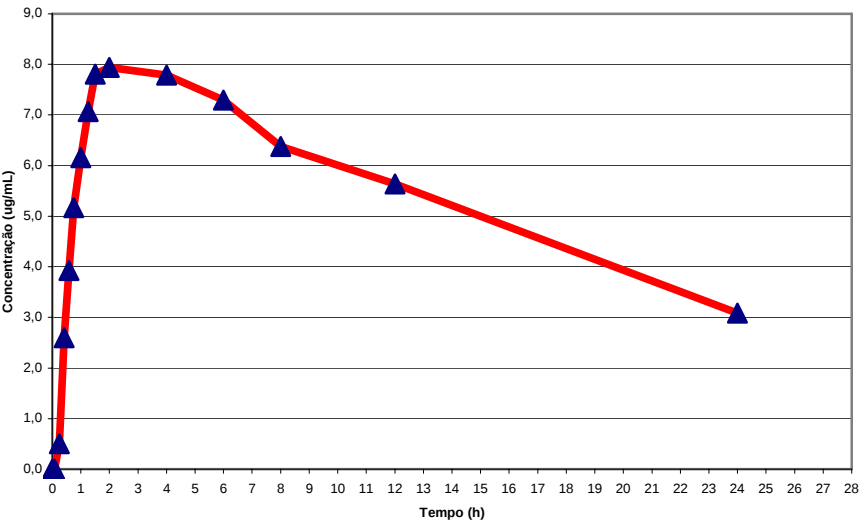
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	50,79198
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	52,91857
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,959814
ke (h ⁻¹)	0,132078
t _{1/2} (h)	5,248005
Cmax (µg/mL)	6,64775
Tmax (h)	0,58
CL (mL/h)	359,0422
Vd (L)	2,718406
Vd (L/kg)	0,042146

AUC Vol 50 RTL

DADOS DO VOL 51 KQS

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	131,3076
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	200,7324
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,654143
ke (h-1)	0,044433
t _{1/2} (h)	15,59978
Cmax (µg/mL)	7,94075
Tmax (h)	2,00
CL (mL/h)	94,65337
Vd (L)	2,130243
Vd (L/kg)	0,042183

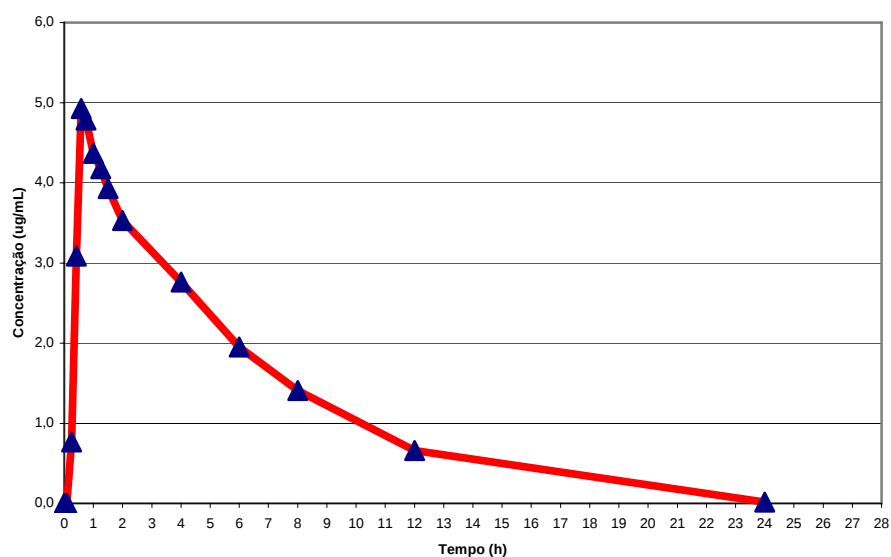
AUC Vol 51 KQS



DADOS DO VOL 53 FWPC

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	29,49955
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	29,56414
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,997815
ke (h ⁻¹)	0,234447
t _{1/2} (h)	2,95652
C _{max} (µg/mL)	4,92485
T _{max} (h)	0,58
CL (mL/h)	642,6704
V _d (L)	2,741218
V _d (L/kg)	0,031875

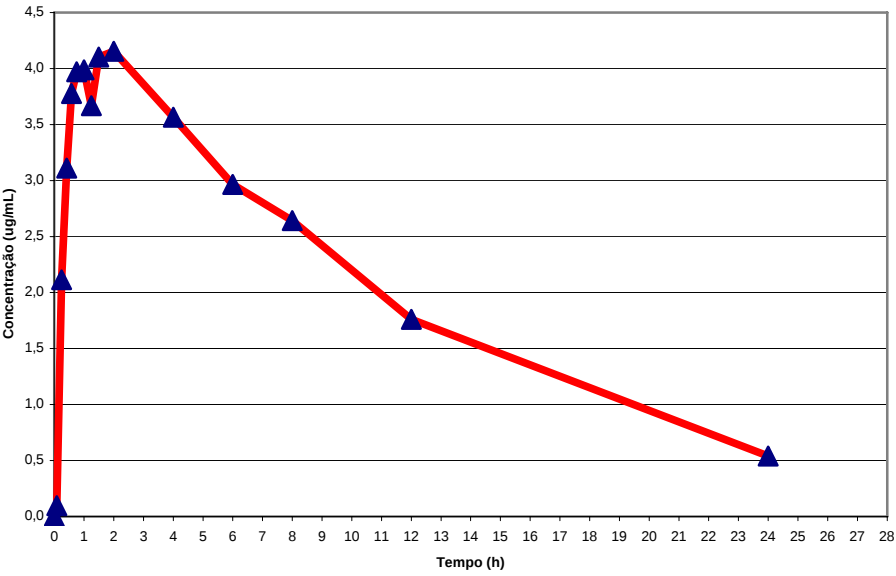
AUC Vol 53 FWPC



DADOS DO VOL 54 LNL

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	49,28279
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	55,05751
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,895115
ke (h-1)	0,093514
t _{1/2} (h)	7,412217
Cmax (µg/mL)	4,15458
Tmax (h)	2,00
CL (mL/h)	345,0937
Vd (L)	3,690284
Vd (L/kg)	0,052718

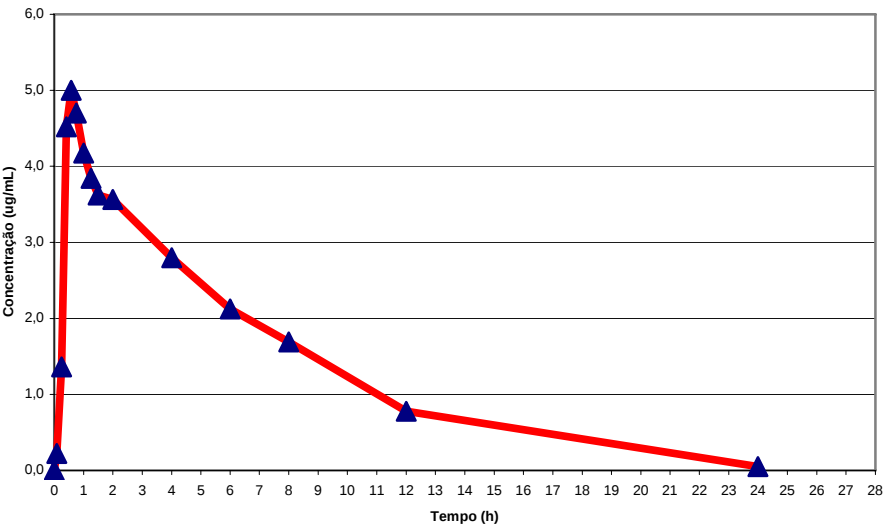
AUC Vol 54 LNL



DADOS DO VOL 55 JBR

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	32,09896
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	32,36121
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,991896
ke (h-1)	0,186898
t _{1/2} (h)	3,708683
Cmax (µg/mL)	4,99910
Tmax (h)	0,58
CL (mL/h)	587,1226
Vd (L)	3,141399
Vd (L/kg)	0,041885

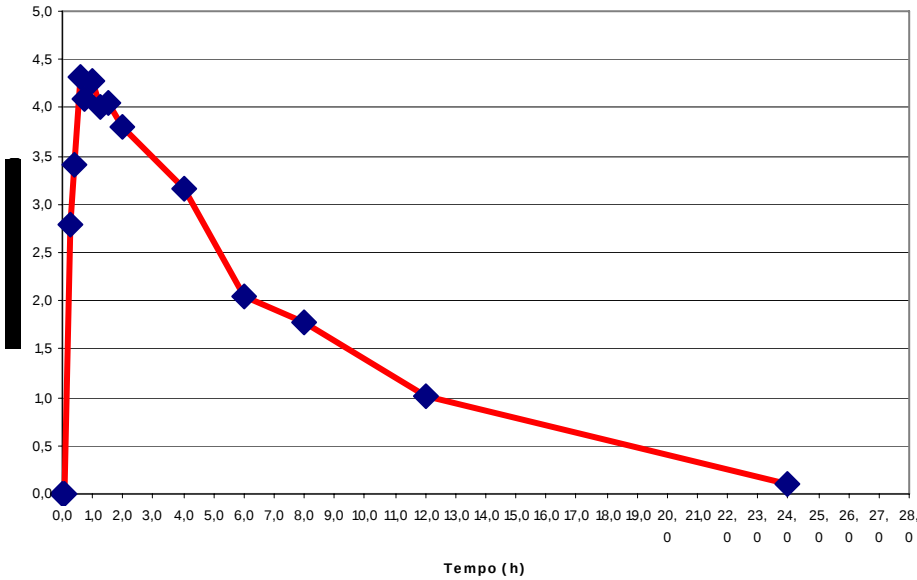
AUC Vol 55 JBR



DADOS DO VOL 56 FEOM

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	35,44213
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	36,0781
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,982372
ke (h-1)	0,162386
t _{1/2} (h)	4,268512
Cmax (µg/mL)	4,31762
Tmax (h)	0,6
CL (mL/h)	526,6352
Vd (L)	3,243105
Vd (L/kg)	0,047002

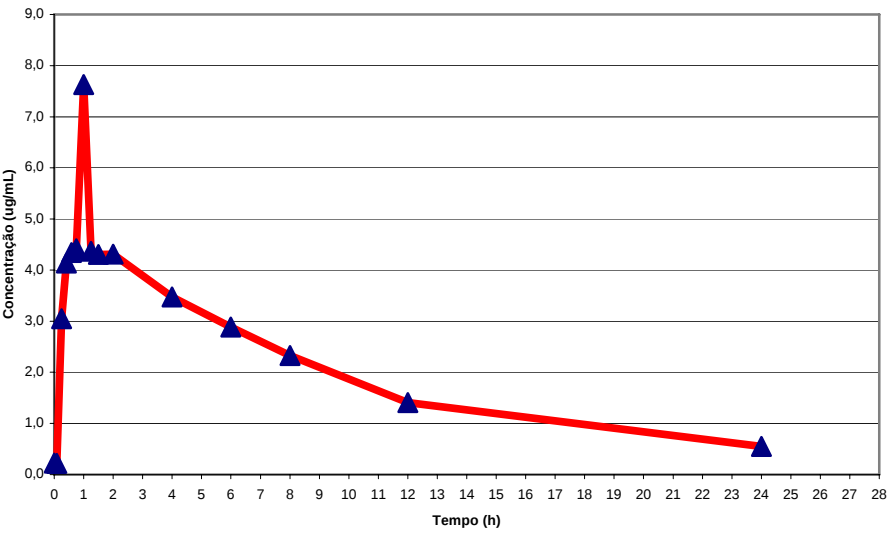
AUC Vol 56 FEOM



DADOS DO VOL 58 OLMN

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	47,13348
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	52,99023
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,889475
ke (h-1)	0,09405
t _{1/2} (h)	7,369956
Cmax (µg/mL)	7,62954
Tmax (h)	1,0
CL (mL/h)	358,5567
Vd (L)	3,812389
Vd (L/kg)	0,042836

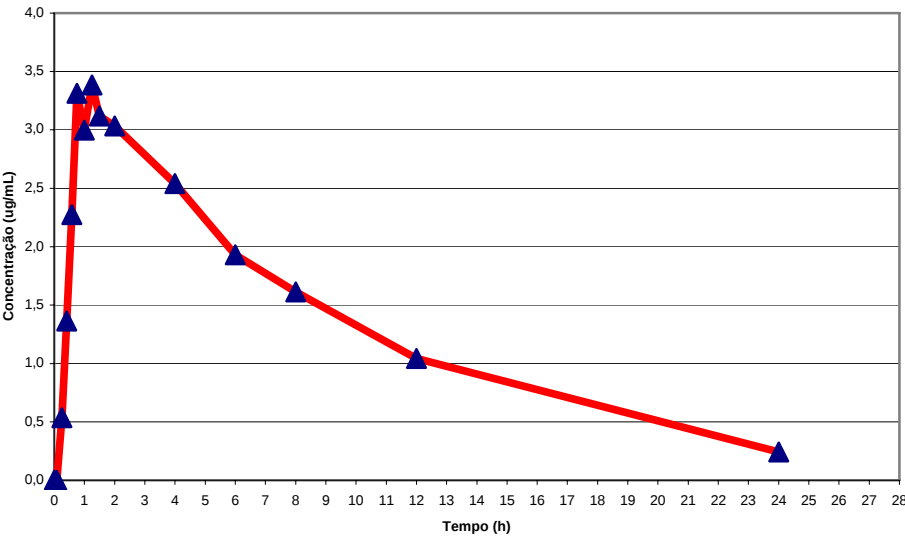
AUC Vol 58 OLMN



DADOS DO VOL 61 FIOBR

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	31,5373
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	33,68335
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,936288
ke (h-1)	0,113878
t _{1/2} (h)	6,08674
Cmax (µg/mL)	3,38529
Tmax (h)	1,3
CL (mL/h)	564,0769
Vd (L)	4,953333
Vd (L/kg)	0,055037

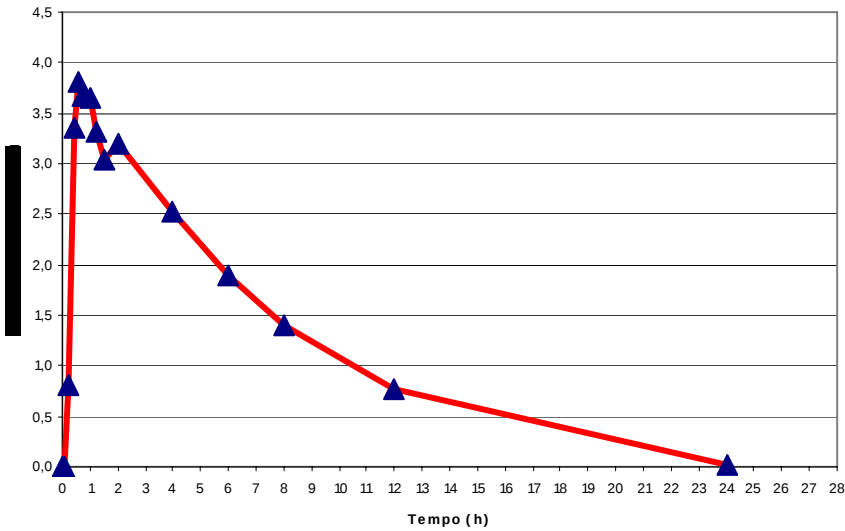
AUC Vol 61 FIOBR



DADOS DO VOL 64 JFSJ

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	28,2452
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	28,32532
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,997171
ke (h-1)	0,236179
t _{1/2} (h)	2,934835
Cmax (µg/mL)	3,81574
Tmax (h)	0,6
CL (mL/h)	670,7779
Vd (L)	2,840122
Vd (L/kg)	0,034218

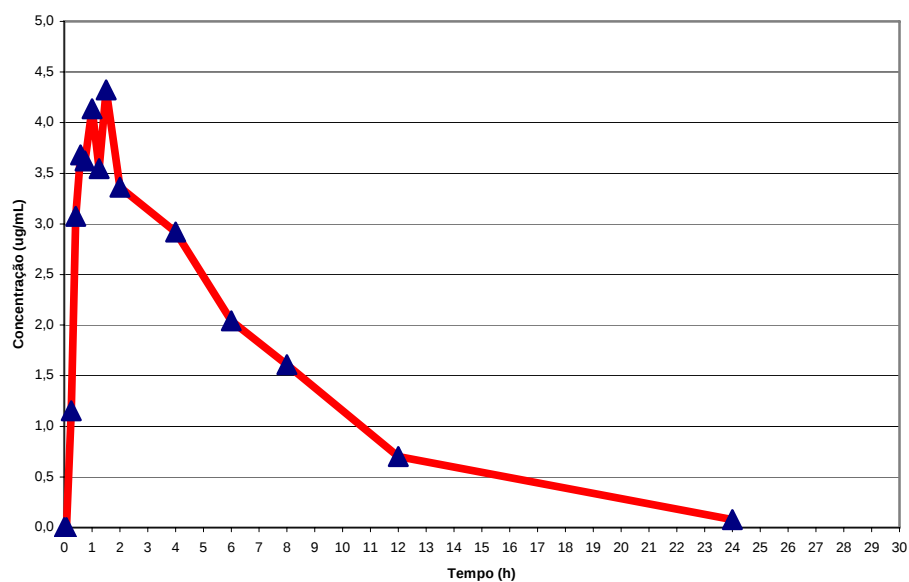
AUC Vol 64 JFSJ



DADOS DO VOL 65 PDOC

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	30,65953
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	31,11834
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,985256
ke (h-1)	0,174975
t _{1/2} (h)	3,961409
Cmax (µg/mL)	4,32440
Tmax (h)	1,50
CL (mL/h)	610,5724
Vd (L)	3,489485
Vd (L/kg)	0,045259

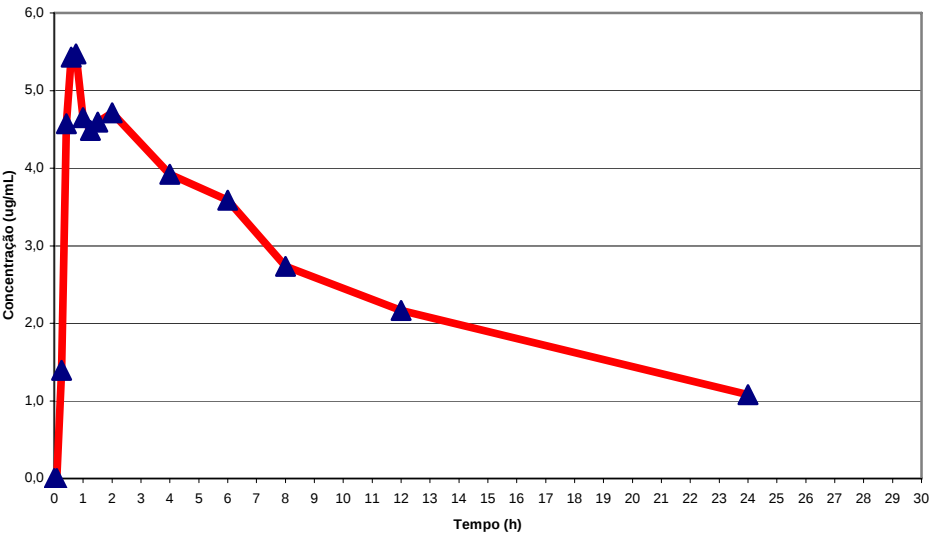
AUC Vol 65 PDOC



DADOS DO VOL 68 RFP

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	59,97303
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	76,28489
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,786172
ke (h-1)	0,066326
t _{1/2} (h)	10,45063
Cmax (µg/mL)	5,47100
Tmax (h)	0,75
CL (mL/h)	249,0664
Vd (L)	3,75519
Vd (L/kg)	0,043163

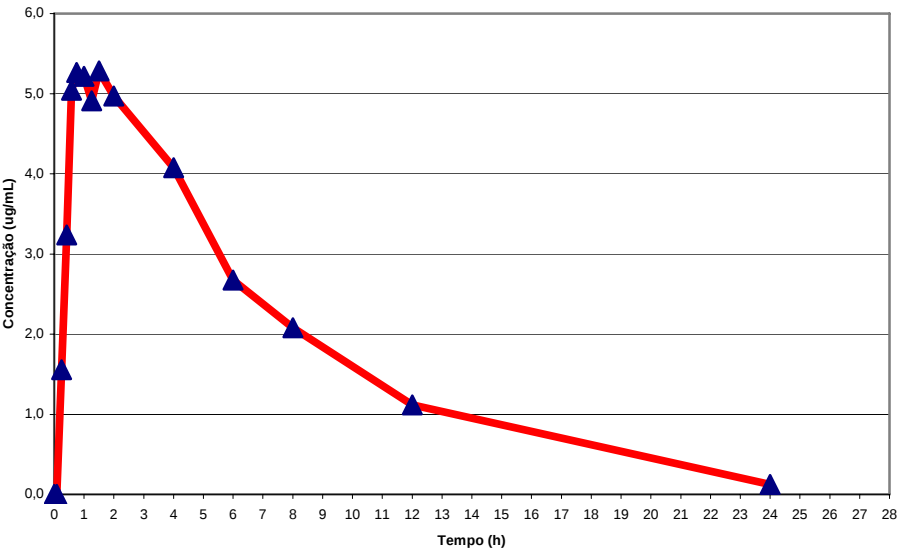
AUC Vol 68 RFP



DADOS DO VOL 71 JSDL

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	42,87896
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	43,62072
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,982995
ke (h-1)	0,167372
t _{1/2} (h)	4,141351
Cmax (µg/mL)	5,28675
Tmax (h)	1,50
CL (mL/h)	435,5729
Vd (L)	2,60242
Vd (L/kg)	0,036397

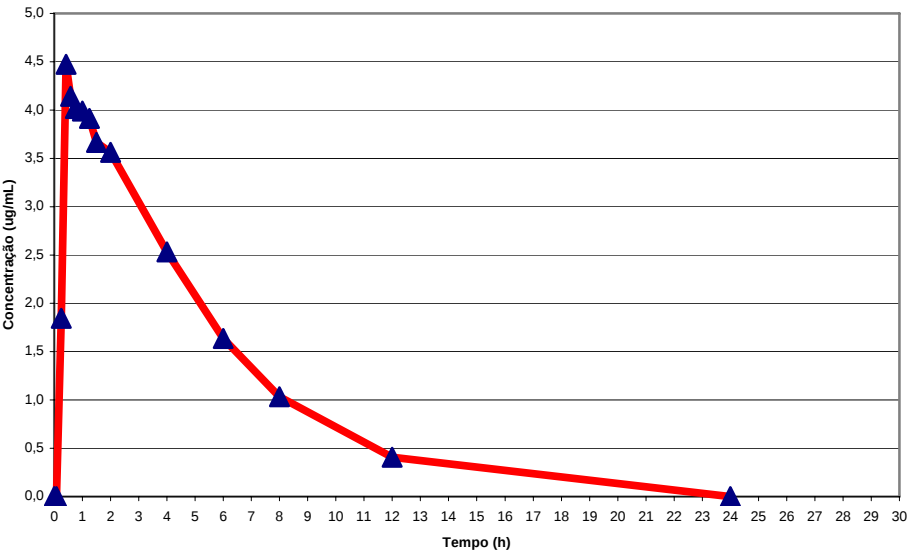
AUC Vol 71 JSDL



DADOS DO VOL 72 FRSC

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	25,07234
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	25,07234
AUC _{0-inf/ 0-t}	1
ke (h-1)	0,200642
t _{1/2} (h)	3,454648
Cmax (µg/mL)	4,47465
Tmax (h)	0,42
CL (mL/h)	757,8072
Vd (L)	3,776914
Vd (L/kg)	0,049436

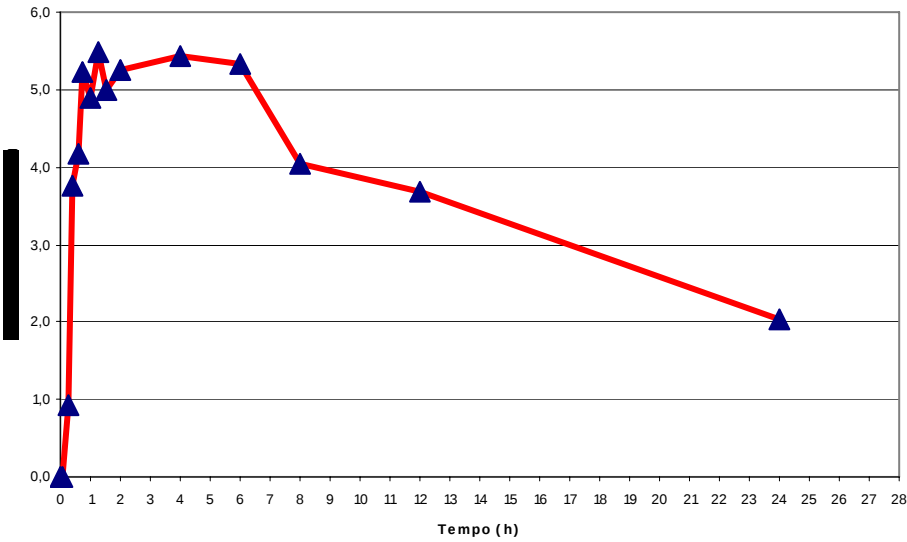
AUC Vol 72 FRSC



DADOS DO VOL 75 IOV

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	89,0205
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	129,8051
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,685801
ke (h-1)	0,049727
t _{1/2} (h)	13,93901
Cmax (µg/mL)	5,47520
Tmax (h)	1,25
CL (mL/h)	146,3733
Vd (L)	2,943528
Vd (L/kg)	0,038731

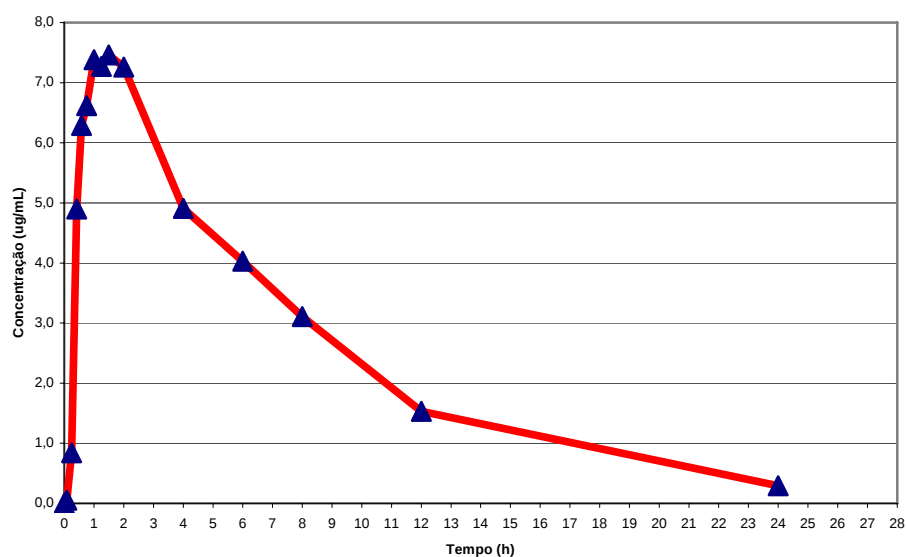
AUC Vol 75 IOV



DADOS DO VOL 76 MLSC

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	60,1584
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	62,18433
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,967421
ke (h ⁻¹)	0,144844
t _{1/2} (h)	4,785468
C _{max} (µg/mL)	7,46328
T _{max} (h)	1,50
CL (mL/h)	305,5432
V _d (L)	2,109462
V _d (L/kg)	0,042359

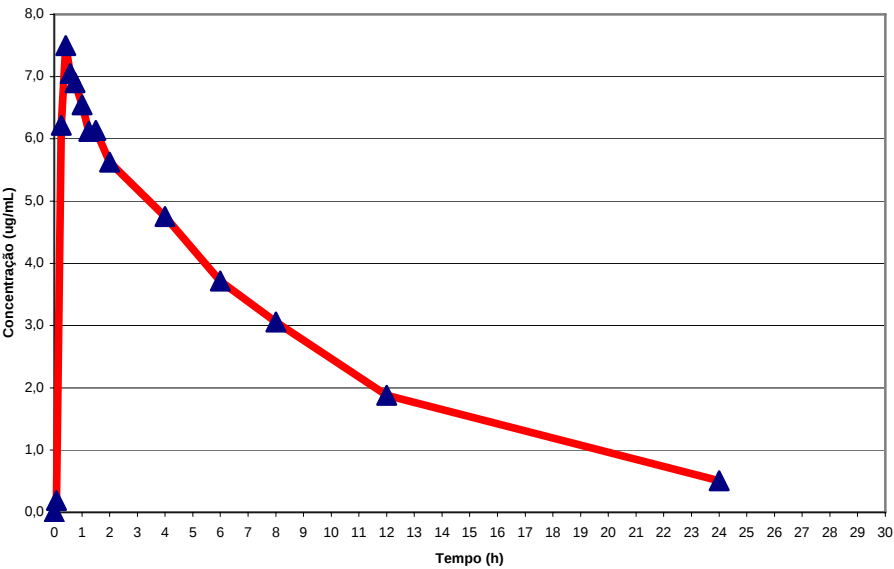
AUC Vol 76 MLSC



DADOS DO VOL 79 AAS

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	61,63699
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	66,19447
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,93115
ke (h-1)	0,111784
t _{1/2} (h)	6,200766
Cmax (µg/mL)	7,49870
Tmax (h)	0,42
CL (mL/h)	287,0331
Vd (L)	2,567744
Vd (L/kg)	0,044656

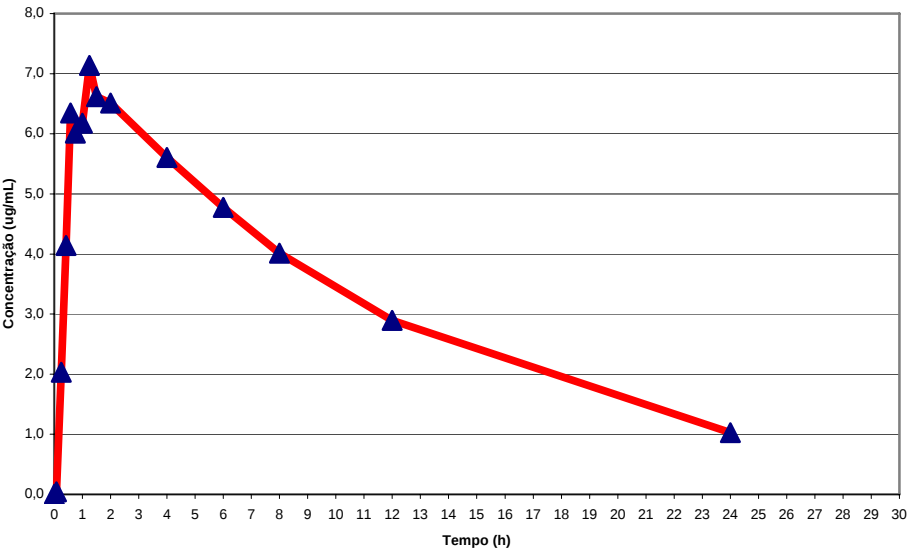
AUC Vol 79 AAS



DADOS DO VOL 81 FCAA

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	79,41919
ASC _{0-inf} (µg.h /mL)	91,65127
AUC _{0-inf/ 0-t}	0,866537
ke (h-1)	0,083902
t _{1/2} (h)	8,261389
Cmax (µg/mL)	7,13538
Tmax (h)	1,25
CL (mL/h)	207,3076
Vd (L)	2,470829
Vd (L/kg)	0,047516

AUC Vol 81 FCAA



ANEXO 6 – Aprovação do Comitê de ética.

ANEXO 7 – outras publicações no período do doutorado.