

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO: VALIDAÇÃO
DE MÉTODO E ANÁLISE DE INTERAÇÃO COM OMEPRAZOL**

Porto Alegre

2012

CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO: VALIDAÇÃO
DE MÉTODO E ANÁLISE DE INTERAÇÃO COM OMEPRAZOL**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de doutor em ciências da saúde pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS. Área de concentração: Nefrologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos d'Avila

Co-orientadores:

Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Prof. Dr. David Saitovitch

Porto Alegre

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO

O48m Oliveira, Carmen Silvana Araujo de

Monitoramento terapêutico do ácido micofenólico: validação de método e análise de interação com omeprazol / Carmen Silvana Araujo de Oliveira. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

96 f.: il. Inclui dois artigos encaminhados para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Domingos d'Avila.

Co-orientadores: Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen; Prof. Dr. David Saitovitch.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

1. TRANSPLANTE RENAL. 2. ÁCIDO MICOFENÓLICO. 3. OMEPRAZOL. 4. CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA VELOCIDADE (HPLC). 5. MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE DROGAS. 6. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA. 7. ESTUDO TRANSVERSAL CONTROLADO. I. d'Avila, Domingos. II. Thiesen, Flávia Valladão; III. Saitovitch, David. IV. Título.

CDD 617.5505921

CDU. 616-089.84:616.61(043.2)

NLM WJ 368

Isabel Merlo Crespo

Bibliotecária CRB 10/1201

FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas, e no Instituto de Toxicologia (INTOX) da PUCRS em associação com o Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

As fontes financiadoras deste trabalho foram:

- **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**
- **Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS)**
- **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carmen Lia e José Antônio.

*Que há muito sorriram ao meu primeiro choro e choraram ao meu primeiro sorriso.
Muitas vezes trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus.
Para vocês que me ajudaram a superar as minhas decepções e aplaudiram minhas
conquistas. Não somente pais, mas meus heróis! Meu porto seguro! Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupery

Ao Dr. Domingos d’Avila. É uma imensa honra tê-lo como orientador dessa tese! Exemplo de ética e profissionalismo é um orgulho também tê-lo como um dos meus chefes. Agradeço tudo que aprendi durante todo esse tempo, pelo apoio de minhas ideias, pela confiança e liberdade para executá-las. Pela paciência e pela sempre prontidão em me ouvir e auxiliar. Meu muito obrigada!

A Profa. Flavia, minha co-orientadora, professora e amiga. Exemplo de profissional e mulher maravilha que se desdobra e desempenha brilhantemente seu papel de profissional e de mãe. Pela confiança depositada em mim, compartilhado seus conhecimentos e suas experiências. Sei que nossa caminhada ainda será longa e dela colheremos muitos frutos. Meu carinho e minha admiração!

Ao Dr. David Saitovitch, meu co-orientador, por ter me despertado o fascínio pelo transplante de órgãos, por acreditar no potencial de uma formanda querendo fazer mestrado e a partir daí ter me ajudado a escalar o mundo da pós-graduação.

Ao Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Agradeço pelo acolhimento, por acreditarem e confiarem no meu trabalho. Pelo que aprendo a cada dia, bem como nos últimos sete anos. Fazer parte desse grupo (através da Pesquisa Clínica) é um grande orgulho da minha vida profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, em especial os que compõem o corpo docente da Área de Concentração em Nefrologia. Pelo conhecimento transmitido, pela ética e pela motivação que nos transmitem ao ministrarem demonstrando amor a esse exercício.

A equipe do Laboratório de Nefrologia, pela sempre receptividade a qual me faz sentir esse lugar também um pedacinho da minha casa.

Ao Instituto de Toxicologia (INTOX), obrigada pelo apoio e oportunidade de execução desse projeto.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, que incasavelmente me recebiam com um sorriso no rosto e sempre solícitas. Obrigada!

As secretarias do Serviço de Nefrologia, Marcia e Vera. Obrigada por toda a ajuda através das informações de dados dos pacientes contidas no “micro-chip” cerebral que vocês possuem. Memória como de vocês duas, não existe!

Aos bolsistas de Iniciação Científica, agora meus colegas e futuros colegas de profissão e amigos: Marcelo, Karol, Clarissa, Karine, Marina, Sabrina e Frank. Obrigada pela colaboração e pela boa energia de nosso trabalho, que faziam nossas manhãs ficarem mais leves no laboratório. Pelos bons momentos de risadas, de correria, de conversas, de sofrimentos e de vitórias. Por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável.

A minha querida colega de Coordenação de Pesquisa Clínica, Magna Cristina Traesel. Pelo espírito colaborativo, por aguentar minhas aflições, minha ausência pelas palavras de “vai dar tudo certo”, por muitas e muitas vezes não ter medido esforços para “segurar as pontas” quando eu estava envolvida com as atividades e aulas do pós. Nossa sintonia de trabalho faz com que tudo se torne mais leve e divertido. Obrigada por tudo, minha “pequena grande” amiga!

Aos meus exemplos profissionais, Adroaldo Lunardelli e Patrícia Sesterheim (Patty) os quais não me canso de admirar pelo brilhantismo como pesquisadores e oradores. Pelo conhecimento técnico, pela sempre disposta ajuda e pelo carinho incondicional. Agradeço a Deus por poder tê-los na minha vida. A amizade de vocês me engrandece!

Ao Eduardo Caberlon, o Edu! Fostes o primeiro que me abriu as portas desse mundo científico, através de indicação para aluna de iniciação científica no Laboratório de Biofísica. A ti, devo tudo que conquistei esses anos e que ainda caminharei. Nossas longas conversas no lab me trouxeram ensinamentos científicos que estão sempre comigo. Obrigada, amigo!

A minha amiga Ellen Magedanz, que ajudou a dar o pontapé iniciar na minha entrada do doutorado e esteve sempre ao meu lado nessa jornada, incentivando, sofrendo comigo a cada desafio e comemorando cada vitória.

A minha amiga Bárbara Alves, a nossa eterna “estagiarius”, um grande presente que a minha vida profissional me proporcionou. Pelas palavras de incentivo, pelos conselhos de ouro. Estas longes, mas sempre perto: nas lembranças e no coração.

Mais um presente que minha vida profissional me proporcionou: Tássia Marquazan Augusto. Pelo incentivo, acompanhamento dessa jornada e compreensão da minha ausência.

Aos coletadores Marcia e Arthur, que transformaram nossas manhãs de coletas em momentos prazerosos, levando de forma leve e divertida, alegrando cada paciente que chegava para coletar e ao mesmo tempo executando de forma competente todas as tarefas. Vocês são demais, fica aqui minha enorme admiração!

Aos colegas do Centro de Pesquisas Clínicas, meu “ninho” de trabalho. Por toda a parceria e amizade.

A Enfermeira Renata Souza, muito obrigada pela paciência, ajuda e por dividir comigo minha ansiedade nesses últimos tempos.

A minha “super” família, que torce pelo meu crescimento, por ter entendido meus momentos de minha ausência. Pelas palavras de conforto, pela energia positiva me enviada, por sempre acreditarem que posso seguir em frente. tios, tia, dinda, primas e primos: obrigada pela força!

Aos meus pais, minha fortaleza, meu porto seguro, meu pedacinho do céu. Obrigada por todo esforço para me fazer uma mulher, profissional e ser humano melhor. Por sempre apoiarem minhas decisões e torcerem para que eu chegasse aos meus objetivos. Juntos, somos apenas um, um triângulo equilátero perfeito.

Aos meus anjos celestiais, meus avós, dindo, tio e amigos queridos, que mesmo não estando mais presentes no meu dia-a-dia, sei que estão sempre me olhando, guiando e incentivando. Sei que foram vocês que me deram forças de seguir à diante e me iluminaram até aqui.

Ao meu anjo da guarda, a quem eu sei que dou muito trabalho, mas que não desiste de mim. Pela força, pela coragem, pela fé e por toda determinação que precisei nos momentos mais difíceis.

A CAPES, pela oportunidade que me foi concedida com a bolsa durante toda minha pós-graduação.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão dessa tese.

A todos os pacientes! Obrigada pela confiança, pela disponibilidade e pelo carinho. Vocês são a grande força que nos move nessa caminhada...

Muito Obrigada!

RESUMO

O transplante renal constitui-se no tratamento de escolha para pacientes com insuficiência renal crônica terminal. O ácido micofenólico é um imunossupressor muito empregado no transplante, que age como um potente, seletivo, não competitivo e reversível inibidor da enzima inosina-monofosfato desidrogenase.

Atualmente, dois compostos estão disponíveis: o micofenolato de mofetila e o micofenolato sódico, ambos apresentando elevado índice de complicações gastrointestinais. Na prática clínica, os pacientes são rotineiramente prescritos com doses fixas padrão, o que pode levar a uma diferença de pelo menos 10 vezes na exposição à droga.

O monitoramento terapêutico do ácido micofenólico surge como uma ferramenta de apoio clínico, auxiliando no ajuste de doses, na individualização da terapia, e promovendo maior entendimento quanto a interações medicamentosas na farmacocinética do ácido micofenólico. O omeprazol é um dos fármacos muito prescritos para pacientes transplantados, seja na profilaxia de distúrbios gástricos, seja no tratamento de úlceras pépticas. Entretanto, dados da literatura vêm apontando uma possível interação do omeprazol na farmacocinética do ácido micofenólico, por elevar o pH gástrico e diminuir sua absorção.

Assim, o objetivo desse trabalho foi realizar a validação de método para monitoramento terapêutico do ácido micofenólico e realizar uma análise dos efeitos da co-administração de omeprazol nos níveis plasmáticos do ácido micofenólico em grupos de pacientes em uso de micofenolato mofetila ou micofenolato sódico.

O método laboratorial desenvolvido e validado para monitoramento terapêutico do ácido micofenólico apresentou-se condizente com os parâmetros de validação descritos na literatura. A análise dos níveis de ácido micofenólico, quando co-administrado ou não omeprazol em pacientes em uso de micofenolato mofetila ou micofenolato sódico, não demonstrou diferença estatística, mas se observou que tanto o grupo micofenolato mofetila quanto o micofenolato sódico, em co-administração com omeprazol, apresentavam menor variância dos níveis plasmáticos de ácido micofenólico.

ABSTRACT

Renal transplantation has been deemed the best treatment for patients with end stage renal disease. Mycophenolic acid is an immunosuppressant widely used in transplantation, acting as a potent, selective, non-competitive and reversible inhibitor of inosine monophosphate-dehydrogenase enzyme.

Currently, two compounds are available: mycophenolate mofetil and mycophenolate sodium, both presenting with high rate of gastrointestinal complications. In clinical practice, patients are routinely prescribed with fixed doses, which can lead to drug exposure differences as great as 10 times.

Therapeutic monitoring of Mycophenolic acid appears as a helping tool, useful for adjusting doses, individualizing therapy and promoting better understanding of drug interactions on the pharmacokinetics of Mycophenolic acid. Omeprazole is a widely prescribed drug for transplanted patient, either as prophylaxis of gastric disorders or peptic ulcers therapy. However, literature data have hinted at a possible omeprazole interaction on Mycophenolic acid pharmacokinetics, by raising gastric pH and reducing its gastric absorption. The aim of the current study was to evaluate Mycophenolic acid levels in patients using mycophenolate mofetil or mycophenolate sodium with and without co-administration of omeprazole.

The method for therapeutic drug monitoring of Mycophenolic acid seemed consistent with previously established validation parameters. There was no statistical difference in Mycophenolic acid levels of patients using either mycophenolate mofetil or mycophenolate sodium, with or without concomitant omeprazole; yet Mycophenolic acid plasma levels presented lower variance when omeprazole was concomitantly used, in both groups.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular do MPA	20
Figura 2 – Rotas de formação dos metabólitos do MPA	20
Figura 3 – Esquema demonstrando a farmacocinética envolvida após administração de um comprimido de MMF.....	21
Figura 4 - Sequência de etapas seguida na obtenção das amostras de plasma.....	29
Quadro 1 – Concentrações de MPA e MPAG em $\mu\text{g/ml}$ nos pontos empregados para a curva de calibração.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina Trifosfato

AUC - Área sob a curva

BPL - Boas Práticas de Laboratório

C₀ - Nível de pré-dose ou vale

CsA - Ciclosporina

CYP - Citocromo P

CV - Coeficiente de Variação

EC-MPS - Enteric-coated Mycophenolate Sodium

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

HLPC-UV - Cromatografia Líquida de Alta Performance com detector UV

IMPDH - Inosina-Monofosfato Desidrogenase

ISO - International Organization for Standardization

LOD - Limite de Detecção

LOQ - Limite inferior de Quantificação

min - Minuto

ml - Mililitro

mM - Milimolar

mm - Milímetros

MMF - Micofenolato de Mofetila

MMS - Micofenolato Sódico

MPA - Ácido Micofenólico

MPAG - Ácido Micofenólico Glucoronado

MTF - Monitoramento terapêutico de fármacos

N - Normal

nm - Nanometros

p.a. – Para Análise

POP - Procedimento Operacional Padrão

RPM - Rotações por minuto

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Tx - Transplante renal

UV - Ultra violeta

v/v - Volume por volume

μL - Microlitro

μm - Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 TRANSPLANTE RENAL	18
1.2 IMUNOSSUPRESSÃO EM TRANSPLANTE RENAL.....	18
1.2.1 Agentes Inibidores da Síntese de Purinas.....	19
1.3 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO	22
1.4 INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS.....	25
2 OBJETIVO	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 DELINEAMENTO	28
3.2 PACIENTES.....	28
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS.....	28
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	29
3.5 PREPARO DA FASE MÓVEL.....	31
3.6 PREPARO DO PADRÃO INTERNO	32
3.7 PREPARO DA SOLUÇÃO PRECIPITANTE.....	32
3.8 PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
3.9 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO	32
3.10 ANÁLISES DAS AMOSTRAS	32
3.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO	33
3.11.1 Precisão.....	33
3.11.2 Linearidade	33
3.11.3 Sensibilidade.....	33
3.11.4 Exatidão e recuperação.....	33
3.11.5 Estabilidade.....	34
3.12 COLETA DOS DADOS.....	34
3.13 ÉTICA	34
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	35
4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O TRABALHO	36

5 RESULTADOS	37
5.1 CAPÍTULO 1 - ARTIGO 1 SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	37
5.2 CAPÍTULO 2 - ARTIGO 2	57
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO.....	82
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	83
REFERÊNCIAS	84
Anexo A – Confirmação de Submissão do Artigo 1 pelo Editor.....	93
Anexo B – Certificado de Apresentação de Pôster em Congresso.....	94
Anexo C – Certificado de Premiação em Congresso.....	95
Anexo D – Certificado de Apresentação Oral em Congresso	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSPLANTE RENAL

O transplante renal (Tx) constitui-se no tratamento de escolha para pacientes com insuficiência renal crônica terminal, por reduzir a morbidade e a mortalidade dos indivíduos e aumentar sua qualidade de vida. Essa situação é o resultado da lesão renal irreversível do tecido renal por doenças que tornam o rim incapaz de exercer suas funções. Entre as principais doenças que levam à insuficiência renal crônica estão: diabetes mellitus, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrites, pielonefrites, hipertensão arterial sistêmica e doença renal policística. [1,2,3].

Apesar do seu elevado índice de sucesso, o Tx, assim como os transplantes de outros órgãos sólidos, ainda está sujeito a um alto índice de complicações [4]. Existem contra-indicações absolutas e relativas ao Tx [3,5]; da mesma forma, há fatores de riscos que devem ser cuidadosamente avaliados no período pré-transplante. Entretanto, a boa avaliação do receptor, assim como seu preparo, aumentam as chances de sucesso dessa terapia.

O Tx pode ser realizado com órgãos de doadores vivos ou falecidos. A utilização de doadores vivos deve ser considerada quando o risco para o doador for baixo, além de estar este plenamente informado sobre o procedimento proposto; a decisão do doador deve ser totalmente voluntária, e o transplante deve conter uma boa chance de sucesso para o receptor [6]. A utilização de órgãos de doadores falecidos é considerada para todos os pacientes urêmicos terminais em tratamento dialítico inscritos em lista única estadual.

O uso de agentes imunossupressores no transplante renal é essencial para a sobrevivência do enxerto. A escolha da combinação terapêutica imunossupressora, assim como a intensidade da mesma, é decidida com base no risco imunológico de cada paciente de transplante. Novos agentes imunossupressores, com maiores potenciais e seletividade, estão sendo disponibilizados como alternativa para uso em esquemas imunossupressores, permitindo redução significativa na incidência de quadros de rejeição aguda do enxerto [3,7,8].

1.2 IMUNOSSUPRESSÃO EM TRANSPLANTE RENAL

Quando uma terapia imunossupressora é prescrita para o paciente transplantado, o objetivo é manter o equilíbrio de um estado quiescente, minimizando o risco de rejeição do órgão [9]. A prática clínica vale-se do uso de combinações de fármacos imunossupressores

que agem em diferentes estágios da ativação de linfócitos T, com o intuito de estabelecer o estado de equilíbrio entre o enxerto e o sistema imune do receptor, evitando, assim, episódios de rejeição.

Em 1954, foi realizado, em Boston, por John Merrill, Joseph Murray e William Hartwell, o primeiro transplante renal com sucesso, entre irmãos gêmeos univitelinos [10]. Ficou clara, após esta descrição, a importância da barreira genética no sucesso dos transplantes. Como a grande maioria dos doadores é geneticamente diferente dos receptores (alotransplantes), ficou evidente a necessidade de emprego de algum tipo de imunossupressão. Usou-se, inicialmente, irradiação corporal total, tratamento eficaz do ponto de vista imunossupressor. Por sua potência, entretanto, observou-se o surgimento de infecções oportunistas e elevada mortalidade.

O surgimento da azatioprina marcou um grande avanço nos transplantes, sendo que a partir desse momento ocorreu o surgimento de outros imunossupressores capazes de diminuir a resposta imune. A utilização de fármacos imunossupressores representou um marco fundamental para o sucesso do transplante de órgãos. A introdução de inibidores da calcineurina também faz parte desse marco. Com o uso desta classe de medicamentos, no início dos anos 1980, as taxas de rejeição foram diminuídas, promovendo melhor sobrevivência do paciente [11]; entretanto, efeitos associados à dosagem surgiram, devido a sua pouca e imprecisa absorção, estreita janela terapêutica e efeitos adversos, como nefrotoxicidade [12]. Mais adiante, tacrolimo - também inibidor da calcineurina - foi apresentado como alternativa à ciclosporina, especialmente para aqueles pacientes com rejeição resistente a esteróides [13]. Entretanto, sua administração também está correlacionada ao surgimento de efeitos adversos, muitos dos quais em comum com a administração de ciclosporina, como nefro e neurotoxicidade, hiperplasia gengival, hipertensão arterial, dislipidemia, entre outros [14].

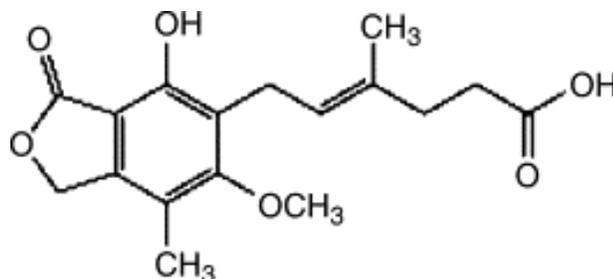
Os inibidores da síntese *de-novo* de purinas, micofenolato mofetil e micofenolato de sódio, também são empregados em Tx, inibindo a proliferação celular de células T e B. Apresentaram menores taxas de rejeição, mas a alta ocorrência de intolerância gastrointestinal e leucopenia são limitantes de seu emprego [15].

1.2.1 Agentes Inibidores da Síntese de Purinas

O ácido micofenólico (MPA) (Figura 1) foi isolado pela primeira vez em 1898, a partir da cultura de *Penicillium glaucum* [16]. O ácido micofenólico age como um potente, seletivo, não competitivo e reversível inibidor da enzima inosina-monofosfato desidrogenase (IMPDH)

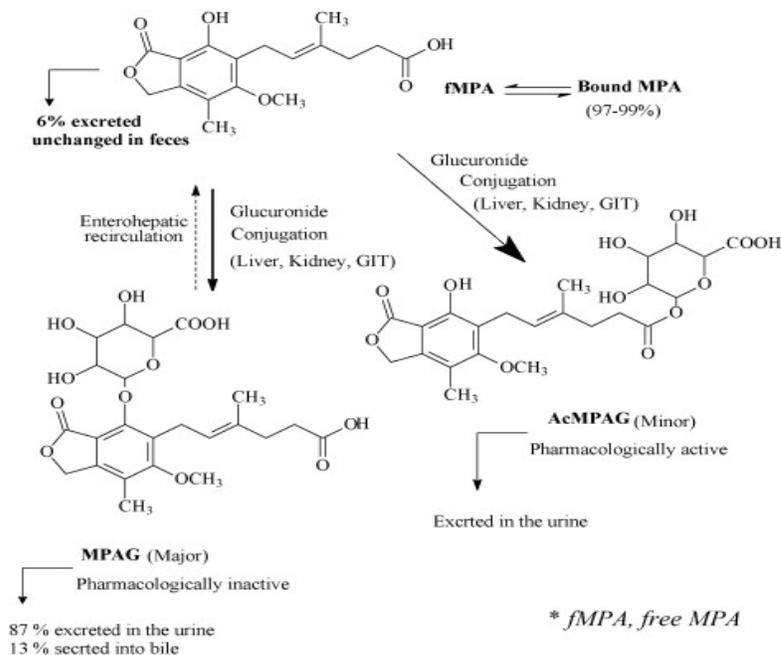
[17], enzima limitante na síntese *de novo* de nucleotídeos da guanosina, interrompendo a divisão de diferentes linhagens celulares [18]. A terapia com ácido micofenólico (MPA) é amplamente utilizada em combinação com os inibidores de calcineurina como imunossupressão de manutenção de receptores de Tx [19].

Figura 1 – Estrutura molecular do MPA [20]



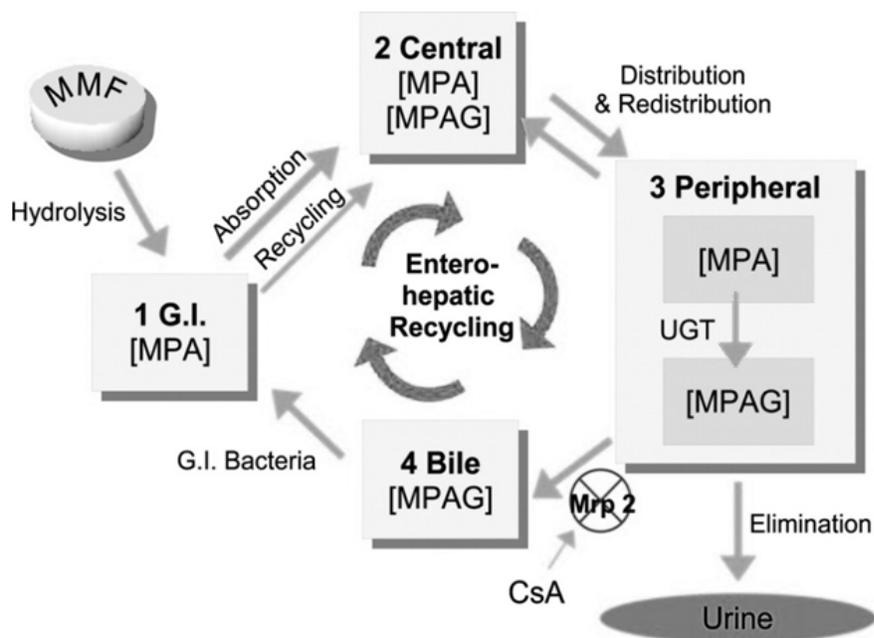
Pelo menos 3 metabólitos secundários são formados, incluindo o ácido micofenólico glucoronado MPAG, que é farmacologicamente inativo e que pode contribuir para os efeitos adversos do micofenolato, tais como diarreia e leucopenia (Figura 2) [21].

Figura 2 – Rotas de formação dos metabólitos do MPA [22]



O MPAG é o principal metabólito do MPA [23]. O MPA circula ligado à albumina, sendo subsequentemente conjugado no fígado na forma de MPAG, que é excretado no intestino através da bile. O MPAG é desconjugado por bactérias colônicas, resultando em reabsorção do MPA, o que implica em significativa re-circulação êntero-hepática, gerando um segundo pico da concentração plasmática de MPA (Figura 3) [24,25,26].

Figura 3 – Esquema demonstrando a farmacocinética envolvida após administração de um comprimido de MMF [25].



Fonte: Shaw LM et al. CJASN 2007;2:1062-1072

Atualmente, dois compostos de ácido micofenólico estão disponíveis: o micofenolato de mofetila (MMF) e o micofenolato de sódio (MMS) [25,27].

Efeitos adversos gastrointestinais são frequentemente observados em pacientes transplantados renais em uso de MMF. Com o intuito de minimizar esses efeitos e melhorar o resultado clínico, foi desenvolvida a formulação de micofenolato sódico, que possui um revestimento gastro-resistente, dissociando-se apenas no intestino [28,29].

Na prática clínica, 1000 mg de MMF é considerado equivalente a 720 mg de MMS. No entanto, as formulações não atendem exatamente à "equivalência química". Mil miligramas de MMF proporciona 2,31 mol (739 mg) de MPA, enquanto que 720 mg de MMS corresponde a 2,24 mol de MPA [29]. Quanto à farmacocinética e à farmacodinâmica do

MPA, tem sido demonstrado que a administração da dosagem quase equimolar de 1000 mg MMF e de 720 mg MMS resulta em uma completa bioequivalência quanto à área sob a curva (AUC) de MPA e semelhante inibição da enzima IMPDH [30, 31 e 32]. A avaliação da exposição do MPA em curva farmacocinética de 12 horas demonstrou que os intervalos terapêuticos são semelhantes para as formulações de MMF e MMS [28].

Em dois ensaios clínicos [33,34], MMF 1000 mg administrado na frequência de duas vezes por dia e MMS 720 mg administrado também na frequência duas vezes ao dia, apresentaram eficácia semelhante e perfis de segurança. A exposição ao MPA, refletida pela AUC, é semelhante durante a administração de 1000 mg de MMF e 720 mg de MMS, mas diferenças em outros parâmetros do perfil farmacocinético têm sido relatados. Durante terapia com MMS, as concentrações plasmáticas de pré-dose MPA (C_0) são mais elevadas, as concentrações de pico de MPA são mais baixas e o tempo para atingir o pico de concentração é maior e varia mais do que com a terapia de MMF [28,29,35].

O MPA apresenta farmacocinética muito variável [36], sendo a variabilidade intra e inter-individual um ponto importante a ser discutido. Estudos demonstram que para concentrações mínimas de C_0 de MPA, o coeficiente médio de variação intra-individual (CV) varia de 36-62%. O CV médio intra-individual de 30 a 47% tem sido descrito em AUC de MPA de 12 horas [37].

O MPA possui alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, sendo amplamente distribuído no plasma ligado à albumina [38]. Aproximadamente, 97 a 99% do MPA e 82% de MPAG circulam ligados a proteínas plasmáticas [39].

Várias interações medicamentosas têm sido relatadas com o MPA. Incluem-se aqui medicamentos como a ciclosporina A, tacrolimo, corticosteroides, sevelamer, carbonato de cálcio, aciclovir, antiácidos e ferro [40,41]. Além disso, o uso de antibióticos, como a norfloxacina e o metronidazol, que prejudicam a flora gastrointestinal podem desativar a desconjugação do MPAG, reduzindo o ciclo entero-hepático de MPA [42,43,44, 45].

Entretanto, até o momento, poucos estudos têm investigado o impacto dos inibidores da bomba de prótons na farmacocinética do MPA.

1.3 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO

Pacientes que são tratados prolongadamente com determinados medicamentos, especialmente aqueles com estreito intervalo entre as doses terapêuticas e tóxicas, devem ser

monitorados, quantificando-se o fármaco, ou seus metabólitos, em líquidos biológicos. O monitoramento terapêutico de fármacos (MTF) é definido, em parte, como a avaliação das concentrações de fármacos nos líquidos biológicos, com o objetivo de ajustar as doses de forma a aumentar sua eficácia e diminuir seus efeitos tóxicos [46,47].

Para fármacos com grande variação interindividual e intraindividual, como o micofenolato, o monitoramento terapêutico é de grande importância, visto que a resposta terapêutica se correlaciona e depende da concentração do fármaco na corrente sanguínea do paciente, em contraposição à dose administrada. Nesses casos, o uso de doses regulares, em intervalos periódicos, não significa que os níveis permanecerão constantes em todos os pacientes, devido às diferenças individuais de absorção, metabolismo, excreção e biodisponibilidade para a medicação administrada, o que influencia o efeito terapêutico final [48]. Além disso, fica cada vez mais claro que os níveis sanguíneos de imunossupressores devem ser determinados para cada população, pois há evidências que a miscigenação étnica tem importante impacto sobre o metabolismo destes fármacos. Desta forma, imunossupressores geram efeitos tóxicos devido à estreita janela terapêutica, exigindo um rigoroso monitoramento de seus níveis sanguíneos, assim como a necessidade de estudos farmacodinâmico e farmacocinético, que permitam individualizar tratamento para cada paciente [49].

Na prática clínica, os pacientes são rotineiramente prescritos com doses fixas padrão de imunossupressores, o que pode levar a uma diferença de pelos menos 10 vezes na exposição ao fármaco ativo em pacientes transplantados de órgãos sólidos [28,36,39,50,51,52].

Razões para a variabilidade farmacocinética identificadas até o momento incluem diferenças de nível plasmático de albumina, de bilirrubina, da concentração de hemoglobina, além de patologias como a insuficiência renal, insuficiência hepática e fibrose cística. O peso corporal, exposição a outra medicação concomitante; tempo pós transplante e polimorfismos genéticos na expressão de uridina difosfato glucuronosiltransferase também são alguns fatores importantes que podem contribuir, alterando a farmacocinética e aumentando a variabilidade dos níveis sanguíneos de MPA e, conseqüentemente, de seus efeitos.

Em consideração à insuficiência renal, a hipoalbuminemia e a co-administração de ciclosporina, é provável que seja particularmente importante na tomada de decisões de dosagem de fármacos [53].

A farmacogenética também pode ser importante, podendo ser uma causa da variabilidade entre sujeitos e desempenha um importante papel no requisito de dosagem de MPA [54,55,56,57,58,59,60].

O papel do monitoramento terapêutico do MPA em transplante de órgãos sólidos requer uma investigação mais aprofundada. A necessidade de orientações práticas sobre a dosagem de MPA tem crescido nos últimos anos, ainda mais considerando as novas possibilidades de individualização de regimes imunossupressores [53]. Embora tenha havido um aumento de interesse em incorporar o monitoramento terapêutico do MPA na prática clínica, este ainda não se está difundido nos Estados Unidos por várias razões, incluindo a falta de aprovação pela Food and Drug Administration de ensaios simples, automatizados, observando a obtenção de baixas taxas de rejeição ao utilizar doses empíricas de MMF em regimes imunossupressores. Além disso, a complexa farmacocinética do MPA e a ausência de toxicidade do órgão evidente comprometem a obtenção dessa aprovação [61].

Cada vez mais, volta-se a atenção para o papel de MTF do MPA para pacientes com elevado risco imunológico, pois encontrar o delicado equilíbrio entre a dose terapêutica, a subterapia e a toxicidade da imunossupressão nestes pacientes é um caminho difícil [61]. Pacientes tratados com protocolos que exploram as possibilidades de minimização de doses dos inibidores da calcineurina, sua retirada gradual, ou até mesmo evitar seu uso, assim como regimes com retirada de esteróides, podem se beneficiar do MTF do MPA. Estudos específicos ainda são necessários para dar resposta a estas questões importantes. A utilidade do MTF do MPA, no tratamento a longo prazo dos receptores de transplante, é ainda menos documentada e pode ser especialmente importante, pois a imunossupressão intensa persistente, em parte facilitada pela atual falta de um alvo terapêutico superior, pode conduzir a complicações graves tais como neoplasias e infecções por vírus BK [53].

Para a realização do MTF do MPA existem três técnicas principais disponíveis, que são a cromatografia líquida de alta performance com detector de ultra-violeta (HLPC-UV), a detecção por espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC-MS) e o imunoenensaio enzimático baseado em técnica de multiplicação de enzima (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique – EMIT) [62,63,64].

Comentários recentes têm sugerido quanto a variação dos intervalos terapêuticos para amostras em C_0 e para AUC de MPA ao usar MMF em combinação com CsA ou tacrolimus. Quando combinado com a CsA, o intervalo terapêutico recomendado é de 1,0 a 3,5 mg/L e 30 a 60 mg/h/L para amostras coletadas em C_0 (as concentrações mínimas) e AUC, respectivamente. Para a combinação com tacrolimus, o intervalo terapêutico sugerido é de 1,9

a 4,0 mg/L para amostras coletadas no vale e 30 a 60 mg/h/L para AUC, respectivamente [52].

1.4 INIBIDORES DA BOMBA DE PRÓTONS

Todos os inibidores da bomba de prótons (IBP) inibem a secreção ácida gástrica, através de ligação com H⁺/K⁺-adenosina trifosfatase nas células parietais gástricas, podendo alterar a liberação intra-gástrica de outros fármacos ao elevar o pH do meio. Os IBP influenciam na absorção de fármacos também através da interação com a adenosina trifosfato (ATP) dependente da P-glicoproteína, ou com o sistema enzimático do citocromo P450 (CYP) [40].

A prescrição de inibidores da bomba de prótons, na prática clínica, tornou rotineira. Devido ao fato de os pacientes transplantados fazerem uso de muitas medicações em co-administração, quer para profilaxia de infecções ou para tratamento e controle de outras patologias envolvidas na história clínica do paciente, os inibidores de bomba apresentam um papel de proteção do estômago. Além disso, são prescritas para tratamento de gastrites e úlceras pépticas, sendo estas complicações comuns após o transplante de órgãos [65].

No Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS), o único IBP dispensado é o omeprazol, sendo a medicação de administração mais frequente entre transplantados que recebem esta indicação de uso.

Pouco se sabe sobre a interação entre MPA e IBP, mas existem evidências indiretas de tal interação [41]. Dados da literatura vêm demonstrando possível interação entre MPA e a co-administração de IBP.

Especula-se que a diminuição dos níveis de MPA, quando IBP é administrado concomitantemente ao MMF, deva-se ao efeito inibitório da secreção de ácido, que pode diminuir a eluição e a hidrólise do MMF e subsequentemente reduzir sua concentração no plasma, bem como a concentração de droga ativa [66,67].

Kees *et al.* [68] realizaram teste *in vitro* de dissolução de 500 mg de MMF e de 360 mg de MMS, utilizando um aparelho de pás USP a 50°C com diferentes condições de pH. O teste foi realizado em 900 ml de tampão. A liberação do produto foi determinada por absorção de ultravioleta e a porcentagem de fármaco liberado foi calculada. Os resultados demonstraram que o comprimido de MMF foi completamente dissolvido em poucos minutos em pH 4,0 e inferiores a 4,0, enquanto que apenas 47% do fármaco foi dissolvido em um pH

de 5,0 e apenas 13% em um pH de 7,0. Quando analisado o comprimido de MMS, esse foi estável durante 2 horas até pH 4,5. A dissolução lenta foi observada após 1 hora em pH 5,0 e o comprimido foi completamente dissolvido em 40 a 60 minutos depois de exposto a um intervalo de tempo de 10 a 20 minutos em pH 5,5 ou superior [67].

Em estudo prospectivo, Kofler et al. [40] investigaram a influência do pantoprazol na biodisponibilidade do MPA, após administração oral de MMS em transplantes de coração ou de pulmão e observaram que as concentrações de MPA e a atividade da IMPDH não mostraram diferença estatística significativa, durante e após retirada do tratamento com IBP.

Porém em outros estudos com MMS e pantoprazol, observou-se uma redução da exposição de MPA em 34% após a administração de pantoprazol, com base na AUC [22,67].

Rupprecht *et al.* [41] realizaram um estudo para investigar a influência da terapia concomitante com pantoprazol e IBP na biodisponibilidade do MPA, após administração oral única de MMF ou MMS, em voluntários jovens, saudáveis. Os voluntários receberam 1000 mg de MMF e foram divididos em dois grupos. As concentrações plasmáticas do MPA e de MPAG foram medidas por HPLC-UV. O tratamento concomitante com omeprazol demonstrou-se estatisticamente significativo na redução da exposição ao MPA, quando concomitante a administração de MMF. A AUC diminuiu 27% quando calculada desde o tempo zero até 12 horas após a administração de MMF. O mesmo não ocorreu no grupo que fez administração de MMS concomitante ao uso do IBP, demonstrando que o pantoprazol não alterou a farmacocinética do MPA nesse grupo [41].

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar a técnica para monitoramento terapêutico de níveis de pré-dose do ácido micofenólico em pacientes transplantados renais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de ácido micofenólico na população estudada, relacionando com níveis terapêuticos, de subterapia e de toxicidade;
- Avaliar os dados demográficos da população apresentada;
- Avaliar o efeito da co-administração de omeprazol sobre os níveis de ácido micofenólico em pacientes transplantados renais em uso de micofenolato de mofetila e micofenolato sódico.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO

Estudo 1 – Estudo de validação de metodologia

Estudo 2 – Transversal, controlado

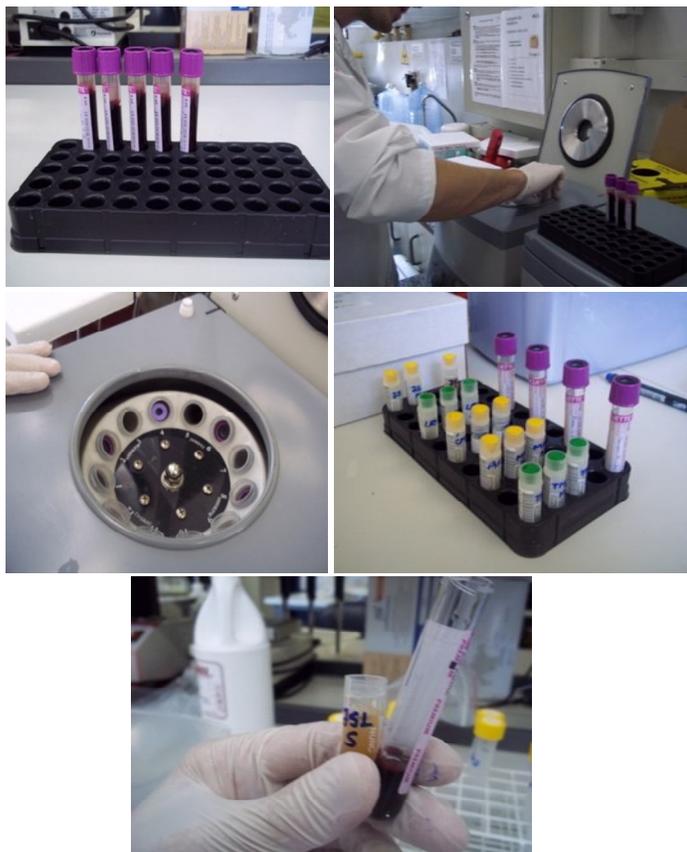
3.2 PACIENTES

Todos os pacientes transplantados renais incluídos nesse trabalho foram recrutados no Ambulatório de Transplante Renal do Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS. O Grupo de Transplantes realizou aproximadamente 1200 Tx até o momento, sendo que aproximadamente 450 pacientes estão em acompanhamento regular no Ambulatório. Neste estudo foram incluídos pacientes com idade entre 18 e 70 anos, peso corporal ≥ 50 kg, incluindo micofenolato de mofetila ou micofenolato sódico em sua terapia de imunossupressão, com ou sem uso de omeprazol (20mg/dia) e que aceitaram participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido. O estudo foi realizado no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, no Instituto de Toxicologia (INTOX) e na Faculdade de Farmácia da PUCRS, em associação com o Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

No período da manhã, foram coletadas amostras de sangue por punção venosa (± 4 ml) de pacientes que iriam realizar coleta de exames de rotina, no seguimento do Tx e que consultariam no Ambulatório no período da tarde. Para todos os pacientes, verificou-se e assegurou-se que os mesmos não tivessem recebido a medicação de interesse (MMF ou MMS) naquele dia. Portanto, as coletas foram realizadas imediatamente antes de o paciente receber a dose matinal do imunossupressor (C0, nível basal, ou pré-dose). As amostras foram levadas do posto de coleta para o Laboratório de Nefrologia, para separação do plasma. Foram, em sequência, centrifugadas (Centribio 80-2B) a 2000 RPM por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após, o plasma foi transferido para microtubos e imediatamente congelado a -20°C , até a determinação dos níveis séricos de MPA (Figura 4).

Figura 4 - Sequência de etapas seguida na obtenção das amostras de plasma.



3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E PREPARO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As soluções padrão de MPA e MPAG (solução de estoque 1,00 mg/ml e 5,00 mg/ml, respectivamente) foram preparadas em metanol p.a.. Tanto para MPA quanto para MPAG, foram preparadas duas concentrações de solução padrão. O preparo foi realizado da seguinte forma:

MPA - Solução padrão de 1,00 mg/ml:

Foram pesados 10,11 mg de MPA (Roche Pharmaceuticals, São Paulo, SP, Brasil) em balança analítica, seguindo-se por diluição em metanol grau HPLC (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) em balão volumétrico de 10,00 ml.

MPA - Solução padrão de 20 µg/ml:

Foram coletados com micro-pipeta (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) 200 μL da solução padrão (1,00 mg/ml) e o volume foi completado com 900 μL de metanol grau HPLC.

- Pontos da curva de calibração:

P0,4: Pipetagem de 100 μL da solução 20 $\mu\text{g/mL}$ de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P1,0: Pipetagem de 250 μL da solução 20 $\mu\text{g/mL}$ de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P2,0: Pipetagem de 500 μL da solução 20 $\mu\text{g/mL}$ de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P5,0: Pipetagem de 25 μL da solução 1 mg/mL de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P10,0: Pipetagem de 50 μL da solução 1 mg/mL de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P20,0: Pipetagem de 100 μL da solução 1 mg/mL de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P40,0: Pipetagem de 200 μL da solução 1 mg/mL de MPA e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

MPAG - Solução padrão de MPAG 5,00 mg/ml:

Foram pesados 10,00 mg de MPAG (Roche Pharmaceuticals, São Paulo, SP, Brasil) em balança analítica, seguindo-se por adição de 2,00 ml de metanol grau HPLC com pipeta volumétrica.

MPAG - Solução padrão de 500 $\mu\text{g/ml}$:

Foram coletados com micro-pipeta 100 μL da solução padrão (5,00 mg/ml) e o volume foi completado com metanol grau HPLC, em balão volumétrico de 10,00 ml.

- Pontos da curva de calibração:

P2,0: Pipetagem de 20 μL da solução 500 $\mu\text{g/mL}$ de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P10,0: Pipetagem de 100 μL da solução 500 $\mu\text{g/mL}$ de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P50,0: Pipetagem de 50 μL da solução 5 mg/mL de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P100,0: Pipetagem de 100 μL da solução 5 mg/mL de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P200,0: Pipetagem de 200 μL da solução 5 mg/mL de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P400,0: Pipetagem de 400 μL da solução 5 mg/mL de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

P500,0: Pipetagem de 500 μL da solução 5 mg/mL de MPAG e adição de plasma até completar o volume de 5 mL

As curvas de calibração foram realizadas pela adição de MPA e MPAG em plasma, para reduzir interferências da matriz. A mesma solução de cada ponto de calibração continha os padrões de MPA e MPAG, nas concentrações encontradas na tabela 1.

Quadro 1 – Concentrações de MPA e MPAG em $\mu\text{g/ml}$ nos pontos empregados para a curva de calibração.

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
MPA ($\mu\text{g/ml}$)	0,4	1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	40,0
MPAG ($\mu\text{g/ml}$)	2,0	10,0	50,0	100,0	200,0	400,0	500,0

3.5 PREPARO DA FASE MÓVEL

Para preparo da fase móvel usou-se acetonitrila grau HPLC (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) e tampão fosfato 40 mM (6:4, v:v). O tampão fosfato foi preparado com 2,7 ml de ácido fosfórico concentrado (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) e ajuste de pH para 3,0 com KOH (7,8 N). A solução final da fase móvel foi filtrada em membrana millipore de nylon 0,45 μm (Nylon XZC, Millipore Co., Mass.), e colocada no ultra-violeta, sendo acondicionada em frasco de vidro âmbar devidamente rotulado.

3.6 PREPARO DO PADRÃO INTERNO

A solução de padrão interno adotada nas análises foi a carbamazepina, preparada pela adição de 1,00 mg de carbamazepina (Sigma[®] Chemical Company, Saint Louis, MO, USA), diluída até 1,00 ml com metanol (grau HPLC).

3.7 PREPARO DA SOLUÇÃO PRECIPITANTE

A solução precipitante foi obtida pipetando 250 µL da solução padrão de carbamazepina (1 mg/ml), completando o volume de 50,00 ml com acetonitrila (grau HPLC), em balão volumétrico.

3.8 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO

O processo para extração de MPA do plasma foi realizado no Laboratório Análises de Toxicológicas (INTOX) e na Faculdade de Farmácia da PUCRS. As amostras foram retiradas do freezer -20°C e expostas em temperatura ambiente até descongelamento total.

A extração do MPA e MPAG foi realizada transferindo 100 µL de amostra para microtubo 1,5 ml e adicionando 200 µL da solução precipitante. A seguir, as amostras foram agitadas em mixer por 10 segundos e centrifugadas por 5 min a 12.000 RPM. Após, 200 µL do sobrenadante foi pipetado e diluído em 200 µL de água Milli-Q em outro microtubo de 1,5 ml. Essa solução final foi analisada por HPLC.

3.9 ANÁLISES DAS AMOSTRAS

A análise das amostras foi realizada no Instituto de Toxicologia (INTOX) e na Faculdade de Farmácia da PUCRS. Os sobrenadantes obtidos através do processo acima descrito, foram injetados em equipamento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), empregando comprimento de onda de 215nm (HPLC-UV) (Agilent series[®] 12000, Agilent Technologies Inc. Califórnia, USA). Foram utilizadas coluna de fase reversa Nucleodur[®], 100-5 C18 ec (4,6x150mm) e pré-coluna Nucleodur[®] 100-5 C18 ec (8/4), mantidas a 20 ± 2°C. A fase móvel composta de tampão fosfato:acetonitrila (60:40 v/v, pH 3,0); foi submetida à coluna a um fluxo de 0,7ml/min.

3.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO

Foram seguidos os parâmetros de validação da norma da ANVISA [69] e de Peters et al [70], utilizando-se para registro dos dados o programa GraphPad (GraphPad® Inc. San Diego, Califórnia, EUA). Exatidão, precisão e critérios de aceitação de recuperação foram fixados em 15%, em todos os níveis da curva de calibração, exceto para o limite inferior de quantificação (LOQ), fixado em 20%.

3.10.1 Precisão

A precisão intra e inter-ensaio foi determinada para o MPA e para o MPAG e permitiu avaliar a proximidade dos resultados do valor real. Determinaram-se os valores de precisão encontrados, utilizando as concentrações dos pontos 2,4,5 e 6 para MPA e 2,4,5 e 6 para o MPAG, sempre analisando cada ponto em sextuplicata, durante uma semana. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA).

3.10.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada juntamente com a precisão. Analisaram-se os calibradores de diferentes concentrações, abrangendo a faixa de concentração de interesse no mesmo procedimento acima descrito.

3.10.3 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi avaliada pela determinação do limite de detecção (LOD) e do limite inferior de quantificação (LOQ). Ambos foram calculados através da curva de calibração, que foi repetida em três dias consecutivos. No primeiro e no segundo dia a análise foi da curva completa, em todos os pontos. No terceiro dia, a análise foi de uma curva simples com duplicata para cada ponto. Na análise do LOQ, o pico cromatográfico de resposta do analito deveria ser identificável e reprodutível, com precisão de 20% e exatidão de 80 – 120%.

3.10.4 Exatidão e recuperação

A exatidão do método foi avaliada por adição de MPA e MPAG em plasma e em metanol, com posterior determinação da concentração em três níveis de concentração. A recuperação foi avaliada juntamente com o parâmetro exatidão, sendo realizada em duas etapas. O desvio padrão aceitável foi fixado em $\leq 15\%$.

3.10.5 Estabilidade

Amostras de plasmas com adição de MPA e MPAG foram preparadas e armazenadas 2 a 8°C e testadas por uma semana. A cada dia se fez uma alíquota da amostra e a mensuração, para avaliar se MPA e MPAG mantinham-se estáveis durante o tempo de análise. A estabilidade foi avaliada determinando o coeficiente de variação dos dados obtidos entre os valores das concentrações de MPA e MPAG.

3.11 COLETA DOS DADOS

Dados registrados em prontuários e em pastas de fluxo de pacientes, com informações clínicas e resultados de exames laboratoriais, foram coletados para completar a análise do perfil farmacocinético dos fármacos. Foram registrados dados como idade, sexo, peso, altura, dose e frequência de administração da medicação imunossupressora, doses e frequência de medicações concomitantes, tempo de transplante e comorbidades. Foram coletados, também, dados laboratoriais tais como: hemograma e marcadores de função renal.

3.12 ÉTICA

Este trabalho somente teve início após a aprovação pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o número 06/02965. A todos os pacientes convidados a participar deste estudo foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo CEP da PUCRS, antes de qualquer procedimento.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Variáveis categóricas foram descritas como frequência ou porcentagem. Para variáveis contínuas utilizou-se média e desvio padrão (DP), e na presença de assimetria, mediana e amplitude interquartil (AIQ).

Variáveis assimétricas foram convertidas a seu logaritmo (base 10) antes da realização da análise e o teste de análise de variância empregado foi o ANOVA.

Empregou-se o pacote *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 17.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) em todas as análises estatísticas.

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O TRABALHO

O Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul não exige um formato específico para apresentação da tese. Optou-se por apresentar os resultados em dois capítulos compostos por dois artigos. O primeiro artigo foi submetido à revista *Therapeutic Drug Monitoring*, e o segundo será submetido à revista *Transplantation*. As referências bibliográficas seguiram as normas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver), e as citações indicadas no texto seguiram o sistema de citações em seqüências com indicação numérica.

A abreviatura dos títulos dos periódicos está de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

5 RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1 - ARTIGO 1 SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

HIGH-PERFORMANCE LIQUID UV-CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF MYCOPHENOLIC ACID AND ITS GLUCURONIDE METABOLITE.

Carmen S. A. Oliveira¹, Carlos E. Leite², Guilherme O. Petersen², Clarissa Fleck^{2, 3}, Karoline Fleck^{2,3}, Salvador Gullo Neto¹, David Saitovitch¹, Ana Lígia Bender², Flavia V. Thiesen^{2, 3}, Domingos O. d'Avila¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil². Instituto de Toxicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil³. Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondent Author:

Carmen Silvana Araujo Oliveira
Hospital São Lucas da PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 – 4º andar – Partenon
Porto Alegre/RS. Brazil. CEP: 90610-000
E-mail: silarol@hotmail.com
Phone: 55 51 3320 3479
Fax: 55 51 3320 3479

ABSTRACT

Mycophenolic acid is an active immunosuppressant molecule to prevent solid organ transplants acute rejection. Mycophenolic acid, and its main metabolite, plasmatic concentration presents large inter and intra-individual variability, following oral administration of any of the prodrugs in current clinical use. Therefore, its therapeutic monitoring might reduce transplant acute rejection episodes. Monitoring of mycophenolic acid plasma level may contribute to lessen its variability, diminishing both the rate of acute rejection, and drug toxicity episodes. In the current study, a simple and efficient high-performance liquid chromatography procedure for simultaneous determinations of mycophenolic acid and 7-ortho- mycophenolic acid-glucuronide in human plasma has been developed. A high-performance liquid chromatography system, equipped with ultraviolet detector was used. The procedure evaluated the following assay parameters: sensitivity, specificity, precision, accuracy and recovery. Reliable separation of the analytes was achieved, with adequate retention times for routine analysis, using short runs. Precision, accuracy, linearity, sensitivity, absolute and relative recovery demonstrated good correlation with criteria used for method validation. The current HPLC-UV analytical procedure for mycophenolic acid and 7-ortho- mycophenolic acid-glucuronide determinations is accurate and inexpensive enough to justify its clinical use.

Key words: HPLC, mycophenolic acid, therapeutic drug monitoring

INTRODUCTION

Mycophenolic acid (MPA) is an active immunosuppressant molecule to prevent solid organ transplants acute rejection. It is commercially available either as the ester prodrug Mycophenolate Mofetil (MMF) (CellCept®), or the enteric-coated Mycophenolate Sodium salt (Myfortic®) (MPS) [1]. MPA and its main metabolite plasmatic concentrations present large inter and intra-individual variability, following similar prodrug oral doses [2,3]. However, compared to other immunosuppressive drugs, such as cyclosporine or tacrolimus, MPA presents a less variable pharmacokinetics profile [4]. Following oral administration and gastric or enteric disintegration, MMF and MPS are absorbed, and esterase-hydrolyzed to MPA [5]. Enteric and liver UDP-glucuronosyltransferase metabolizes MPA into 7-orthomycophenolic acid-glucuronide (MPAG), an inactive and predominantly protein-bound metabolite, also detected in urine and biliary fluid [4,5,6]. MPAG is usually identified in plasma at concentrations 20 to 100 times higher than MPA [7]. In bile, MPAG is hydrolyzed by bacterial glucuronidases, and re-absorbed as MPA. This enteric re-absorption leads to a secondary plasma peak, occurring between 6 and 12 hours, after a single dose. Such peak comprises approximately 37% (ranging from 10% to 61%) of a 72-hour area under the curve (AUC) plot [4,5]. The mean half-life of MPA varies between 9 and 17 hours [6].

MPA therapeutic drug monitoring (TDM) aims at improving transplant organ and patient survivals. Its rationale is the association of pharmacokinetic (PK) parameters, such as total MPA area under the concentration-time curve (AUC₀₋₁₂), and occurrence of acute rejection episodes. Determining and monitoring MPA plasma levels may add to diminish MPA plasma concentration variability, and to possibly reduce acute organ rejection episodes, or drug toxic occurrence [8,9]

High-performance liquid chromatography (HPLC) is currently the method of choice for quantitative determination of MPA and MPAG, even though other methods have been developed for human plasma, or serum, level determinations [4,10]. Yet such alternative methods suffer from laborious work and inadequate run times, or require special apparatus, unsuitable for routine drug monitoring [3,11,12]. The aim of this study was to develop a simple, fast and efficient HPLC procedure for simultaneous determinations of MPA and MPAG in human plasma.

MATERIALS AND METHODS

Chemical Reagents: All reagents were HPLC grade: Methanol, acetonitrile, phosphoric acid and potassium hydroxide (Merck[®], Darmstadt, Hessen, Germany) and carbamazepine (CBZ) (Sigma[®] Chemical Company, Saint Louis, MO. USA). MPA and MPAG were kindly provided by Roche Pharmaceuticals[®] (Roche[®], São Paulo, SP, Brazil). Deionized water was used throughout (Millipore[®] Corporation, Billerica, MA, USA).

Standard Solutions: Stock standard solutions of MPA and MPAG (1.0 mg/ml and 5.0 mg/ml) were prepared in methanol. Solutions were made by spiking the stock solution in drug-free human plasma to achieve MPA and MPAG final concentrations of 0.4, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 µg/ml, and 2.0, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 and 500.0 µg/ml, respectively, to a final volume of 10.0 ml with calibrated micropipettes (Thermo Scientific[®], Waltham, MA, USA). CBZ was used as internal standard (IS).

Sample Preparation: A plasma pool built from MPA-unexposed subjects, available at the clinical pathology laboratory, was aliquoted and kept frozen (-20°C) to be used during the study. Acetonitrile (200 µL), spiked with IS to a final concentration of 5.0 µg/ml, was added to a 100 µL plasma aliquot. Tubes were stirred for 10 seconds, and centrifuged (12,000 g) for 5 min. A supernatant aliquot (200 µL) was diluted in water (200 µL) - 20 µL injected into the HPLC system.

Chromatographic Conditions: A HPLC system equipped with an isocratic pump, ultraviolet detector (215 nm), degasser, and a manual injection system (Agilent[®] Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) was used throughout. Chromatographic separation was performed in a 150x4.6 mm (particle size 5 µm) column (Nucleodur[®] C18 ec, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany) protected by a guard column (Nucleodur[®]

C18 ec, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany), all kept at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Acetonitrile:phosphate buffer (40:60 v/v, pH 3.0) mobile phase was kept at 0.7 ml/min, with detector's wavelength set at 215 nm. The HPLC analytical process was quantitatively evaluated for sensitivity, specificity, precision, accuracy, linearity and recovery.

Validation Parameters: Peters and col. validation procedure parameters were used [12]. A GraphPad Prism[®] (GraphPad[®] Software Inc., San Diego, CA, USA) software was used for statistical analyses. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated. Precision, accuracy, and recovery acceptance criteria were set at 15%, at all levels of the calibration curve, except for the limit of quantification (LOQ), which was set at 20%.

Statistical analysis: Continuous variables are presented as mean \pm SD, or median and inter-quartile range (IQR). Categorical variables are presented as frequency, percentage, or ratio. Data were stored in a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft Office[®] 2007, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and a Statistical Package for Social Sciences (SPSS 17.0 for Windows[®], SPSS Inc, Chicago, IL, USA) software was used in all statistical analyses. The level of significance was set as $P\leq 0.050$.

RESULTS

Chromatographic Performance and Specificity: Figure 1 shows representative drug-free human plasma, and a patient's plasma sample chromatogram (after a 500 mg single MMF oral dose)). To determine specificity, methanol and plasma samples containing often used drugs, as well as those mostly used by kidney transplant patients, were tested for possible interference with the HPLC procedure. Samples contained drug standards reflecting their usual therapeutic levels. Drugs, MPA and MPAG retention times are shown in Table 1. Reliable separation of the analytes was achieved with adequate retention times for routine analysis, with runs <13 min. The procedure's specificity was evaluated by analyzing different drug-free human plasma samples (n=20) to check for interference of endogenous components. All drug-free human samples tested, and frequently used drug-spiked plasma samples were assay interference-free.

Precision and Accuracy: Precision and accuracy were ascertained by inter and intra-day replicate (n=6) from pooled human plasma samples containing MPA and MPAG, at three different concentrations covering low, medium and high ranges of the calibration curves. Intra and inter-day precision and accuracy data are shown in Table 2 and Table 3. Precision was expressed as percent CV; accuracy was expressed as percentage of the added concentration (found/added * 100). Inter-day precision and accuracy were determined over a one week-period.

Linearity: Calibration curves were linear using different serum calibrating standards containing known amounts of MPA, ranging from 0.4 to 40.0 µg/ml, and MPAG ranging from 2.0 µg/ml to 500.0 µg/ml, respectively. Linearity of the method was evaluated by processing a six-point calibration curve in five different days. The mean calibration equations were $y = 0.5865x + 0.0020$; $r = 0.9999$ for MPA, and $y = 0.3258x +$

0.0879; $r = 0.9991$ for MPAG, respectively [$y =$ peak area; $x =$ concentration (in $\mu\text{g/ml}$); $r =$ correlation coefficient]. The analysis fully covered the expected drugs therapeutic range.

Sensitivity: Limit of detection (LOD) was obtained by injecting six drug-free plasma samples. The noise peak area/IS area ratio was quantified, using the calibration curve - mean + 3 SD taken as LOD. The method's detection limit was $0.001 \mu\text{g/ml}$ for MPA, and $0.530 \mu\text{g/ml}$ for MPAG, respectively - values similar to those obtained by Mass Spectrometry methods. A previous study reported MPA and MPAG LOD of $0.050 \mu\text{g/ml}$ and $0.500 \mu\text{g/ml}$, respectively [13,14]. LOQ was the lowest detected amount measured with precision and accuracy, reproducible to less than 20% CV, and with 80–120% accuracy [12,15]. LOQ for MPA and MPAG were: $0.0937 \pm 0.0008 \mu\text{g/ml}$; CV: 8.26%; accuracy: 93.69% and $1.81 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$; CV: 5.67%; accuracy: 90.56%, respectively.

Absolute and relative recovery: The absolute recovery for MPA and MPAG were determined by spiking known quantities of standards into drug-free plasma in methanol, to obtain three different concentrations (low, medium and high ranges of the calibration curve). Results were obtained by computing concentrations of MPA or MPAG in plasma sample, factored by their concentrations in methanol sample, multiplied by 100. The relative recovery was obtained by the same process - theoretical concentrations added to the plasma sample, instead of the methanol sample. Data on absolute and relative recoveries are shown in Table 4.

Stability: Stored at $2-8^{\circ}\text{C}$, MPA and MPAG samples were stable for seven days (CV lower than 5%). According to previous studies, whole blood samples should be kept at 4°C or, otherwise, centrifuged within two hours to avoid plasma concentration changes.

Stored at -20°C, MPA plasma levels were stable for six months, and MPAG levels for at least one month,. Samples were tested in low, medium and high concentrations [16].

DISCUSSION

Plasma MPA and MPAG concentration monitoring may be a useful tool in adjusting MMF dose-regimen in solid organ transplant patients, thus maintaining therapeutic levels and reducing drug toxicity. The current method's total analytical run time was less than 13 minutes, allowing for the sequential assaying of multiple samples in considerably short period. Minimal sample manipulation and short analytical run time result in significant financial advantage, compared to currently available methods, especially in what concerns to operator time-expenditure [11]. The analytical procedure has a straightforward handling of a small plasma volume. Detection at UV wave length results in good separation, under isocratic-condition characteristics usually found in many analytical laboratories. There are other MPA and MPAG assaying methods, using solid phase extraction, solid phase micro-extraction, and liquid/liquid extraction [11,15,16,17,18]. Yet their pre-processing procedures involve long and expensive extractions, or generate toxic waste carrying significant health risks to the analyst. Moreover, some of those procedures do not quantify MPAG [14,19,20]. Greater specificity is obtained when chromatographic methods are coupled with diode array, or mass spectrometry (MS) detectors, giving rise to better metabolites differentiation. However, MS detectors operation is more expensive, besides requiring highly trained personnel.

CONCLUSION

The current HPLC with UV analytical procedure for MPA and MPAG plasma level determination is accurate and inexpensive enough to warrant its clinical use. The validated method may be a reliable option for MPA and MPAG levels fast determination in human plasma.

REFERENCES

1. Oremus M, Zeidler J, Ensom MH, et al. Utility of monitoring mycophenolic acid in solid organ transplant patients. *Evid Rep Technol Assess.* 2008;164:1-131.
2. Knight SR, Morris PJ. Does the evidence support the use of mycophenolate mofetil therapeutic drug monitoring in clinical practice? A systematic review. *Transplantation.* 2008;85(12):1675-85.
3. de Loor H, Naesens M, Verbeke K, et al. Stability of mycophenolic acid and glucuronide metabolites in human plasma and the impact of deproteinization methodology. *Clin Chim Acta.* 2008;389(1-2):87-92.
4. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(1):13-58.
5. Indjova D, Kassabova L, Svinarov D. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;817(2):327-30.
6. Kuhn J, Prante C, Kleesiek K, et al. Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry assay. *Clin Biochem.* 2009;42(1-2):83-90.
7. Blanchet B, Taieb F, Conti F, et al. Comparison of a new enzymatic assay with a high-performance liquid chromatography/ ultraviolet detection method for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in adult liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008;14(12):1745-51.
8. Zivanović L, Licanski A, Zecević M, et al. Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid

- glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;47(3):575-85.
9. Mino Y, Naito T, Matsushita T, et al. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronides in human plasma using isocratic ion pair high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(3):603-8.
 10. Leite CE, Petersen GO, Lunardelli A, et al. A high-performance liquid chromatography method for the determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide and its comparison with chemiluminescent immunoassay. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(4):458-63.
 11. Elbarbry FA, Shoker A. Simple highperformance liquid chromatographic assay for mycophenolic acid in renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(2):788-92.
 12. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci In.* 2007;165(2-3):216-24.
 13. Premaud A, Rousseau A, Le MY, et al. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and consequences for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2004;26(6):609–19.
 14. Premaud A, Rousseau A, Picard N, et al. Determination of mycophenolic acid plasma levels in renal transplant recipients co-administered sirolimus: comparison of an enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2006;28:274–7.
 15. Akhlaghi F, Patel CG, Zuniga XP, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid and metabolites in diabetic kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2006;28(1):95–101.

16. Patel CG, Akhlaghi F. High-performance liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human plasma. *Ther Drug Monit.* 2006;28(1):116–22.
17. Zambonin CG, Aresta A, Palmisano F. Determination of the immunosuppressant mycophenolic acid in human serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;810:197-202.
18. Bahrami G, Mohammadi B. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid–liquid extraction: application to human pharmacokinetic studies. *Clin Chim Acta.* 2006;370(1-2):185–90.
19. Mendonza AE, Gohh RY, Akhlaghi F. Analysis of mycophenolic acid in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2006;28:402–6.
20. Srivatsan V, Dasgupta AK, Kale P, et al. Determination of mycophenolic acid in human plasma by highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2004;1031(1-2):259–64.

TABLES

Table 1: Retention time for several drugs.

Drug	Retention time (min)
MPAG	2.60
CBZ (IS)	6.79
MPA	12.34
Sirolimus	ND
Tacrolimus	ND
Cyclosporine	ND
Prednisone	4.44
Clonazepam	10.04
Flunitrazepam	13.48
Lorazepam	8.33
Diazepam	21.13
Bromazepam	5.01
Caffeine	2.43
Acetaminophen	2.44
Cotinine	ND
Acetyl salicylic acid	4.33
Indometacin	ND
Sodium Diclofenac	ND
Enalapril	ND
Fluoxetine	8.22
Hydrochlorothiazide	3.10
Nortriptyline	ND
Amitriptyline	7.53
Furosemide	ND
Spirolactone	ND
Propranolol	3.58

MPA: Mycophenolic acid; MPAG: 7-ortho-mycophenolic acid-glucuronide; CBZ (IS): Carbamazepine internal standard.

Table 2: Intra-essay precision and accuracy determinations (n=6).

	Added ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	Final Value (mean \pm SD) ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	Precision CV (%)	Accuracy (%)
MPA	1.0	1.02 \pm 0.01	1.14	102.33
	5.0	4.57 \pm 0.04	0.96	91.50
	10.0	9.47 \pm 0.10	1.09	94.73
	20.0	19.86 \pm 0.18	0.89	99.32
MPAG	10.0	10.58 \pm 0.13	1.20	105.85
	100.0	103.93 \pm 2.67	2.57	103.93
	200.0	208.51 \pm 3.06	1.47	104.25
	400.0	399.89 \pm 7.56	1.89	99.89

SD: Standard deviation; CV: coefficient of variation; MPA: Mycophenolic acid;

MPAG: 7-ortho-MPA-glucuronide.

Table 3: Inter-essay precision and accuracy determinations (n=6).

	Added ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	Final Value (mean \pm SD) ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	Precision (CV (%))	Accuracy (%)
MPA	1.0	0.97 \pm 0.02	1.59	97.36
	5.0	4.30 \pm 0.10	2.28	86.03
	10.0	9.12 \pm 0.21	2.29	91.21
	20.0	18.89 \pm 0.33	1.76	94.47
MPAG	10.0	9.94 \pm 0.28	2.85	99.43
	100.0	100.85 \pm 1.16	1.15	100.85
	200.0	204.82 \pm 2.19	1.07	102.41
	400.0	393.20 \pm 8.08	2.00	98.30

SD: Standard deviation; CV: coefficient of variation; MPA: Mycophenolic acid;

MPAG: 7-ortho-MPA-glucuronide.

Table 4: Absolute and relative recoveries from human plasma (n=6).

	Added ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	Absolute recovery (mean percentage \pm SD)	Relative recovery (mean percentage \pm SD)
MPA	1.0	98.09 \pm 0.98	102.22 \pm 1.37
	5.0	100.73 \pm 0.1.76	91.21 \pm 1.24
	10.0	98.13 \pm 1.78	95.04 \pm 1.40
	20.0	100.31 \pm 1.32	99.30 \pm 0.61
			\pm
MPAG	10.0	99.83 \pm 2.36	106.27 \pm 0.63
	100.0	95.45 \pm 1.45	104.84 \pm 2+90
	200.0	91.45 \pm 1.73	105.14 \pm 1.26
	400.0	90.11 \pm 2.19	99.23 \pm 2.10

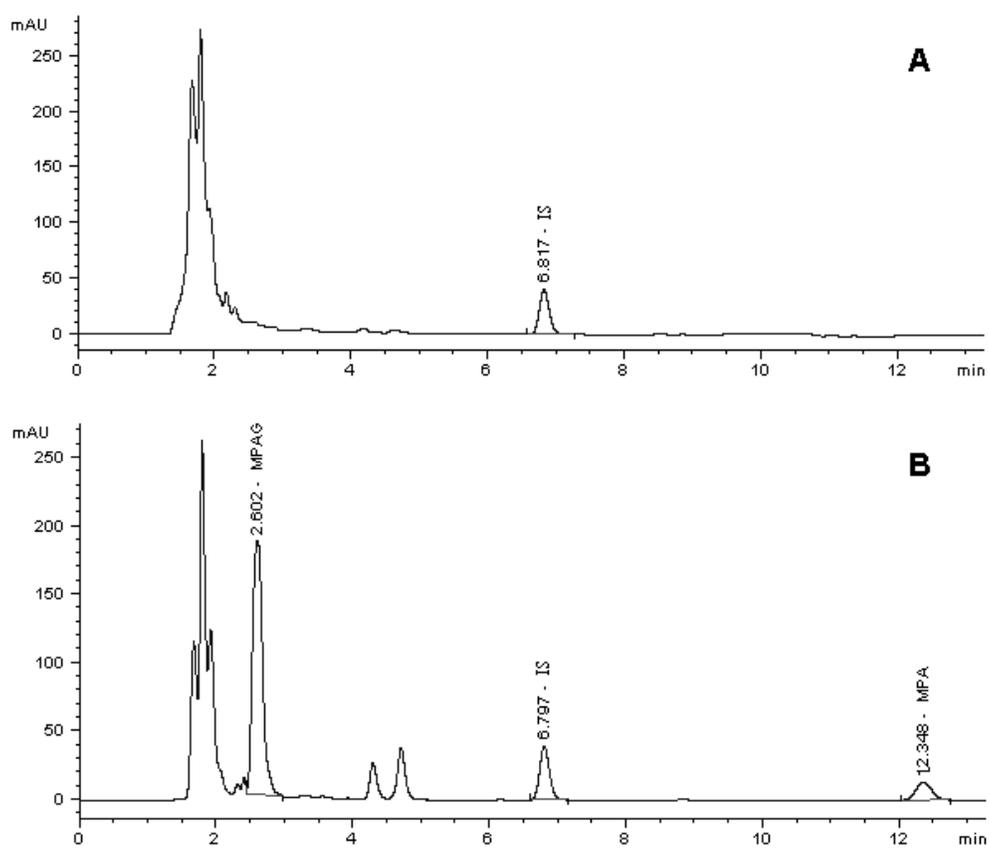
SD: Standard deviation; MPA: Mycophenolic acid; MPAG: 7-ortho-MPA-glucuronide.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Typical chromatograms obtained at 215 nm from drug-free human plasma (**A**) and plasma from a kidney transplanted patient receiving MMF (**B**).

FIGURE

Figure 1



5.2 CAPÍTULO 2 - ARTIGO 2

ORAL OMEPRAZOLE AND MYCOPHENOLIC ACID PLASMA LEVELS IN KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS.

Carmen S. A. Oliveira¹, Marcelo Zimmer^{2,3}, Karoline Flack^{2,3}, Franck Xavier^{2,3}, Flavia Valladão Thiesen^{2,3}, Domingos O. d'Avila¹.

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde¹, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Instituto de Toxicologia², Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Faculdade de Farmácia³, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running title: Mycophenolic acid plasma level and oral omeprazol.

Correspondent Author:

Carmen Silvana Araujo Oliveira

Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga, 6690 – Partenon

Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

E-mail: sil_arol@hotmail.com

Phone: [55] (51) 3320 3479

Fax: 55 51 3320 3479

Authors' contribution and Addresses

Carmen Silvana Araujo de Oliveira. Project elaboration and writing, patients enrollment, samples collection and processing, preparation of reagents, mycophenolic acid quantification, data analysis, and paper writing and final editing. Correspondence address: Centro de Pesquisas Clínicas, Hospital São Lucas Av. Ipiranga 6690. Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

Marcelo Zimmer. Samples collection, preparation of reagents, mycophenolic acid quantification. Correspondence address: Centro de Pesquisas Clínicas, Hospital São Lucas Av. Ipiranga 6690. Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

Karoline Flack. Samples collection, preparation of reagents, mycophenolic acid quantification. Correspondence address: Centro de Pesquisas Clínicas, Hospital São Lucas Av. Ipiranga 6690. Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

Franck Xavier. Samples collection, preparation of reagents, mycophenolic acid quantification. Correspondence address: Centro de Pesquisas Clínicas, Hospital São Lucas Av. Ipiranga 6690. Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

Flavia Valladão Thiesen. Project elaboration and writing, data analysis, final text review. Correspondence address: Centro de Pesquisas Clínicas, Hospital São Lucas Av. Ipiranga 6690. Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

Domingos O. d'Avila. Data analysis, paper writing and final editing. Correspondence address: Centro de Pesquisas Clínicas, Hospital São Lucas Av. Ipiranga 6690. Porto Alegre/RS. Brazil. 90610-000

Acknowledgement: Carmen Silvana Araujo de Oliveira was supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) scholarship.

Potential conflicts of interest: None of the authors has any conflict of interest to disclose.

ABSTRACT

Background: Mycophenolic acid (MPA) is an active immunosuppressant molecule, commercially presented as the oral prodrugs: mycophenolate mofetil (MMF) and enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS). MPA pharmacokinetics is quite unreliable - variability between and within-subjects being significantly large. Many drugs interact with MPA. Otherwise, proton pump inhibitors block gastric acid secretion, possibly changing other drugs absorption rate. The study aim was to evaluate the omeprazole oral administration effect upon MPA plasma levels of kidney transplant recipients on treatment by a MPA prodrug.

Methods: The study enrolled 103 kidney transplant patients followed at the outpatient clinic using MMF or EC-MPS, and separated into four groups by drug use: MMF, MMF plus omeprazole, EC-MPS or EC-MPS plus omeprazole. Blood samples were collected just before a drug morning dose. Plasma was separated by spinning, and processed to determine MPA plasma levels by high performance liquid chromatography with UV detector.

Results: MMF was in use by 55 (53.4%) patients, while 48 (46.6%) were employing EC-MPS. Of those using MMF, 41 (74.5%) used oral omeprazole, while 27 (56.3%) among those using MPS also received omeprazole. One-way ANOVA was employed to compare groups. No significant statistical differences ($p=0.358$) among groups were demonstrated.

Conclusion: Omeprazol, concomitantly used with MMF or EC-MPS seems not to significantly affect MPA plasma levels, in kidney transplant patients.

Key words: Drug interaction, kidney transplant, mycophenolic acid, omeprazole

INTRODUCTION

Mycophenolic acid (MPA) is a potent, selective, non-competitive and reversible inhibitor of inosine-monophosphate-dehydrogenase (IMPDH) enzyme that has significant immunosuppressive activity (1). Mycophenolate mofetil (MMF) and enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS) are two mycophenolic acid-derived drugs available for clinical use (2). MPA has a highly unpredictable pharmacokinetics, presenting with significantly large variability between and within-subjects (3).

Drugs interaction with MPA, causing its plasma level to significantly change, has been previously reported (4). Cyclosporin A, tacrolimus, steroids, rifampicin, sevelamer, calcium carbonate, acyclovir, norfloxacin, metronidazole, antacids and iron are among them (4,5). Also, by possibly changing the patient's enteric flora, administration of some antibiotics, such as norfloxacin and metronidazole may alter MPAG deconjugation rate, reducing MPA enterohepatic cycling (6-9). All proton pump inhibitors (PPIs) block acid secretion by binding to parietal cells H^+/K^+ -adenosine triphosphatase, raising gastric pH, thus potentially affecting release of many oral drugs. PPIs influence absorption of drugs through interaction with adenosine triphosphate (ATP)-dependent P-glycoprotein, but also by affecting cytochrome P450 enzyme system (CYP) (10).

Little is known about PPIs effect on MPA plasma levels. Yet there are indirect evidences for such interactions (5). Previous data suggested a possible reduction on MPA level, when a PPI was concurrently administered with MMF. Such outcome has been generally ascribed to reduced gastric acid secretion that decreases EC-MPS elution, and subsequent hydrolysis, thus reducing its plasma concentration and that of the active molecule MPA, as well (11,12).

The aim of the study was to evaluate the influence of omeprazole on MPA plasma levels, in kidney transplant patients treated with MMF or EC-MPS.

PATIENTS AND METHODS

Patients: The study enrolled 103 kidney transplant recipients, regularly attending the Kidney Transplant Outpatient Clinic at Hospital São Lucas da PUCRS. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee, and all patients read and signed an Informed Consent Form before enrollment. All were following immunosuppressive regimens that included a calcineurin inhibitor, MMF or EC-MPS, and prednisone for no less than three months. Omeprazol was used as a single morning dose. The study population's estimated glomerular filtration rate was $38 (\pm 16)$ mL/min/1.73 m².

Sample Collection: Blood was drawn into EDTA-containing vacuum tubes, just before the MMF or EC-MPS morning dose. It was centrifuged (5,000 g) for 5 minutes, plasma separated and frozen (-20°C). In a microtube, 100µL of plasma was added to 200µL of the precipitating solution (250 µL of carbamazepine solution [in methanol: 1 mg/mL]) and 50 ml Acetonitrile. After a 10-second mixing, the sample underwent spinning (12,000 g) for 5 minutes. Following, a 200 µL supernatant aliquot was diluted in 200 µL deionized water, for MPA quantification.

MPA Quantification: Sample analysis was carried on a HPLC system equipped with an isocratic pump, ultraviolet detector (215 nm), degasser, and a manual injection system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). For the chromatographic separation, a 150x4.6 mm (particle size 5 µm) column (Nucleodur C18 ec, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany) protected by a guard column (Nucleodur® C18 ec, Düren, North Rhine-Westphalia, Germany) maintained at 20±2°C, was employed. Acetonitrile:phosphate buffer (40:60 v/v, pH 3.0) mobile phase was kept at 0.7 ml/min and the detector's wavelength was set at 215 nm.

Statistical Analysis: Continuous variables are presented as mean and standard deviation (SD), or median and range. Categorical variables are presented as frequency,

percentage, or ratio. MPA plasma level values were \log_{10} -converted before analysis. Continuous variables with normal distribution were compared by one-way ANOVA. The *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 17.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) software was used in all statistical analyses. The level of significance was set as $P \leq 0.050$.

RESULTS

Among the 103 participants, 64 (62%) were female; the study population age was 46 (± 13) years. A majority (95%) of patients had received a first graft, evaluated at 18 [6-51] months post-transplant. Table 1 depicts relevant demographic and clinical data of the study population.

Patients were ascribed to one of four groups, according to the drug combination in regular use: MMF; MMF plus omeprazol; EC-MPS; EC-MPS plus omeprazol. MMF was used by 55 patients (53.4%), while EC-MPS was used by 48 patients (46.6%). Omeprazol was in concomitant use by 14 (25.5%) and 27 (56.3%) of MMF and EC-MPS using subjects, respectively. MPA plasma level in MMF group was 1.93 (0.29- 11.60) $\mu\text{g/ml}$; in MMF plus omeprazol it was 2.04 (0.23-5.29) $\mu\text{g/ml}$. Otherwise, in EC-MPS group, MPA plasma level was 2.95 (0.25-12.90) $\mu\text{g/ml}$, while in EC-MPS it was 2.04 (0.34-7.62) $\mu\text{g/ml}$. No statistical differences among the four evaluated groups was evidenced ($p=0.358$). Results are depicted in Table 2 and Figure 1.

Only 30 (29%) patients had MPA levels within the suggested therapeutic limits (≥ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and ≤ 3.0 $\mu\text{g/mL}$) (13). Those on MPS plus omeprazole presented with the highest ratio of adequate MPA plasma levels, followed by MMF plus omeprazole group; patients on MPS group more often were out of the expected range, even statistical analysis not showing significant differences.

DISCUSSION

Proton pump inhibitors (PPIs) are regularly prescribed in the immediate post-transplant period, to avoid possible gastric complications. Peptic disease is a significant complication of organ transplant therapy, and PPI long-term prescription is not unusual in that population (10,14). There is indirect evidence for PPIs interaction with MPA plasma levels, yet little has been known with certainty on such effects (5). The current study analyzed MPA plasma levels on 103 kidney transplant patients, independently of the mycophenolate formulation in use - with or without the concurrent administration of omeprazole. **MPA plasma levels were asymmetrically distributed over a large range of values – they were log-converted before analysis.**

MPA levels comparison, among the four different groups, did not demonstrate any significant difference. However, it may be said that no effect of oral omeprazole upon plasma levels of MPA, in this particular study population, was demonstrated. Contrary to a previous report, decreased levels of MPA in patients receiving MMF concomitantly with oral omeprazole could not be shown (15). MMF and EC-MPS solubility in aqueous buffer solutions, at different pH values, was evaluated in that study. MMF solubility ranged from 4.0 mg/L at pH 4.0, to as low as 0.24 mg/L at pH 5.2 (15). Therefore, increased gastric pH, similar to that induced by oral omeprazol administration might lead to reduced MMF solubility, reduced drug absorption, and lower MPA plasma levels (15). However, no such a change was demonstrated in the current study. Increased gastric pH caused by omeprazole oral administration seemed not to interfere with MPA plasma levels, suggesting that MMF absorption may be not entirely dependent on gastric pH. Nevertheless, results for the EC-MPS group endorse previous data, demonstrating no significant changes in MPA levels. *In vitro* experiments established that MPS tablets remains virtually intact up to pH 5.0 (15). It has been said that such EC-MPS formulation remains unbroken all through the acidic

environment, being released upon reaching the jejunum, where tablets become soluble, at higher pH (16-18). Although no significant differences among groups could be perceived, there was suggestion for diminished MPA plasma level values variance in the two groups using omeprazole. Data suggest that MPA plasma levels became less variable when patients were simultaneously using omeprazole. Furthermore, both groups on omeprazole had more individuals within therapeutic drug limits, than the other groups. No possible explanation for such finding could be found. Yet most patients used, simultaneously, a variety of drugs which could also interfere with MPA plasma level. So, interesting as it was, such effect cannot be singly ascribed to omeprazole. Determination of MPA area under the concentration-time curve from 0 to 12 hours (AUC_{12}) in the same groups of patients might help clarifying such effect.

In conclusion, no significant differences in MPA level with, or without, simultaneous administration of omeprazole in patients using MMF or EC-MPS were demonstrated. However, MPA plasma levels were more stable when omeprazole was concomitantly dispensed.

REFERENCES

1. Del Tacca M. Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tolls – a review. *Transplant Proc* 2004; 36: 687.
2. Oremus M, Zeidler J, Ensom MH, et al. Utility of monitoring mycophenolic acid in solid organ transplant patients. *Evid Rep Technol Assess* 2008; 164: 1.
3. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and Pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 13.
4. Kofler S, Wolf C, Shvets N, et al. The proton pump inhibitor pantoprazole and its interaction with enteric-coated mycophenolate sodium in transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 565.
5. Rupprecht K, Schmidt C, Raspé A, et al. Bioavailability of mycophenolate mofetil and enteric-coated mycophenolate sodium is differentially affected by pantoprazole in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2009; 49: 1196.
6. Schmidt LE, Rasmussen A, Norrelykke MR, Poulsen HE, Hansen BA . The effect of selective bowel decontamination on the pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients. *Liver Transplant* 2001; 7: 739.
7. Naderer OJ, Dupuis RE, Heinzen EL, Wiwattanawongsa K, Johnson MW, Smith PC. The influence of norfloxacin and metronidazole on the disposition of mycophenolate mofetil. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 219.
8. Bullingham RE, Nicholls Aj, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 429.
9. Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, et al. The magnitude and time course of changes in mycophenolic acid 12-hour predose levels during antibiotic therapy in mycophenolate mofetil-based renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2007; 29: 122.

10. Troppmann C, Papalois BE, Chiou A, et al. Incidence, complications, treatment and outcome of ulcers of the upper gastrointestinal tract after renal transplantation during the cyclosporine era. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 433.
11. Kofler S, Deutsch MA, Bigdeli AK, et al. Proton pump inhibitor co-medication reduces mycophenolate acid drug exposure in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28: 605.
12. Díaz B, Gonzáles Vilchez F, Almenar L, et al. Gastrointestinal complications in heart transplant patients: MITOS study. *Transplant Proc* 2007; 39: 2397.
13. Tredger JM, Brown NW, Adams J, et al. Monitoring mycophenolate in liver transplant recipients: toward a therapeutic ranges. *Liver Transpl.* 2004;10(4):492-502.
14. David-Neto E, Takaki KM, Agena F, et al. Diminished mycophenolic acid exposure caused by omeprazole may be clinically relevant in the first week post transplantation. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 331.
15. Kiberd BA, Wrobel M, Dandavino R, Keown P, Gourishankar S. The role of proton pump inhibitors on early mycophenolic acid exposure in kidney transplantation: evidence from the CLEAR study. *Ther Drug Monit* 2011; 33: 120.
16. Arns W, Breuer S, Choudhury S, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 2005; 19: 199.
17. Sanford M, Keating GM. Enteric-coated mycophenolate sodium: a review of its use in the prevention of renal transplant rejection. *Drug* 2008; 68: 2505.
18. Arns W. Noninfectious gastrointestinal (GI) complications of mycophenolic acid therapy: a consequence of local GI toxicity? *Transplant Proc* 2007; 39: 88.

TABLES

Table 1 – Demographic and clinical characteristics (n=103)

Parameter	Data
Age (years): mean (\pm SD)	46 (\pm 13)
Female: n (%)	64 (62)
Caucasians: n (%)	98 (95)
Weight (Kg): mean (\pm SD)	71 (\pm 15)
Baseline disease: n (%)	
Unknown	31 (30)
Hypertension	21 (20)
Diabetes mellitus	11 (11)
Polycystic kidney disease	11 (11)
Others	39 (38)
Comorbidities: n (%)	
No comorbidities	59 (57)
Hypertension	25 (24)
Diabetes	3 (3)
Others	16 (16)
Time from transplant (months): median [range]	18 [6-51]
Cadaver donor: n (%)	78 (76)
First transplant: n (%)	98 (95)
MMF/EC-MPS time in use (months): median [range]	19 [8-51]
Creatinine (mg/dL): median [range]	1.77 [0.90-5.42]
GFR (mL/min/1.73m ²): mean (\pm SD)	38 (\pm 16)

SD: Standard deviation; MMF: Micofenolato mofetil; EC-MPS: Micofenolate sodium; GRF: Glomerular filtration rate.

Table 2 – MPA levels among the studied groups (n=103)

Group	Mean (SD)	Median	Minimum	Maximum
MMF	2.59 (2.37)	1.93	0.29	11.6
MMF plus Omeprazol	2.26 (1.45)	2.04	0.23	5.29
EC-MPS	4.03 (3.47)	2.95	0.25	12.90
EC-MPS with Omeprazol	2.43 (1.68)	2.04	0.34	7.62

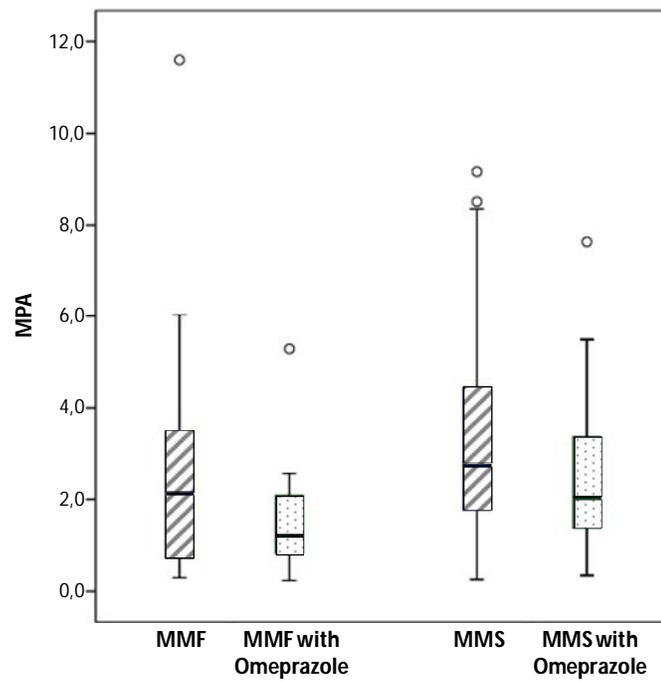
SD: Standard deviation; MMF: Micofenolato mofetil; EC-MPS: Micofenolate sodium.

FIGURE LEGEND

Figure 1: MPA plasma levels in patients using MMF or EC-MPS, with or without omeprazol

– Boxplot.

FIGURE



6 DISCUSSÃO

O MTF de medicações imunossupressoras constitui-se de uma ferramenta de apoio clínico para aperfeiçoar a eficácia da medicação que, junto com a anamnese do paciente e com dados laboratoriais, pode evitar que as concentrações sanguíneas desses fármacos se encontrem em nível subterapêutico (culminando com episódios de rejeições do enxerto) ou tóxicos (acompanhando-se por episódios de toxicidade). Também se torna uma ferramenta útil para individualização dos regimes imunossupressores [22].

O MPA é muito empregado na prática clínica, por sua potente ação imunossupressora, mas seu efeito adverso de intolerabilidade gastrointestinal, com o surgimento de dores abdominais e episódios de diarreias é sabido da literatura [21,28,29].

Por não haver técnica rotineira de MTF do MPA em grande parte dos Centros de Transplante, o ajuste de doses do MMF e do MMS baseia-se no achado de leucopenia e de sintomas gastrointestinais. Geralmente, com a redução da dose, os pacientes apresentam melhora clínica. Entretanto, quadros de diarreia podem se apresentar com alguma frequência e resolver-se de forma espontânea.

Para o estudo de validação de método, o preparo da amostra foi realizado com a precipitação de proteínas por acetonitrila, conforme técnicas já padronizadas na literatura [20,71,72,73,74,75]. Embora este método não proporcione a extração “limpa”, como ocorre na metodologia com extração líquido-líquido e também na metodologia com extração em fase sólida, é muito mais simples e acaba sendo mais rápida e menos dispendiosa, se comparada às duas últimas formas de extração. Além disso, a utilização da precipitação de proteína pode ser aplicada universalmente a todos os tipos de analitos, independentemente da natureza do medicamento a ser analisado. Tal vantagem é importante para a separação e quantificação simultânea de MPA e seus metabólitos, que têm diferença significativa de polaridade [76].

Utilizou-se no estudo uma coluna cromatográfica de 150 x 4,6 mm, com C18, mantida a 20°C±2°C. Colunas para a determinação do MPA e de seus metabólitos são quase que exclusivamente de fase reversa, e incluem tanto C8 e C18, variando de 150 a 300 mm de comprimento, geralmente com diâmetro interno variando de 3,0 a 4,6 milímetros [22]. Estes dados demonstram que a coluna utilizada estava de acordo com a literatura e é facilmente encontrada na maior parte dos laboratórios.

Fases móveis são geralmente compostas de um solvente aquoso binário e polar, tal como o ácido acético aquoso, o ácido fosfórico, ou um tampão de pH baixo (solvente A) e um menos polar (solvente B), tal como solvente orgânico (metanol ou acetonitrila),

eventualmente acidificado [22]. Empregou-se, como fase móvel, o tampão fosfato:acetona (60:60 v/v), pH 3,0.

O sistema de HPLC empregado possuía detector de UV que, para a validação, detectava substâncias em um comprimento de onda de 215 nm. Estudos prévios da literatura demonstram que o MPA absorve na região UV. Devido a sua ampla disponibilidade, o detector de UV foi usado para detectar MPA e seus metabólitos. O espectro UV de absorção máxima é demonstrado nos comprimentos de onda de 215, 250 e 304 nm para MPA e 215, 251 e 295 para MPAG [71]. Embora a sensibilidade maior tenha sido obtida em 215 nm, algumas investigações relatam alto risco de interferência de materiais endógenos séricos, neste comprimento de onda [75,77,78]. No entanto, não foi detectada interferência para os compostos testados, apesar desse dado poder apontar uma limitação desta validação.

Para a realização da validação de procedimentos quantitativos bioanalíticos, pelo menos os seguintes parâmetros devem ser avaliados: seletividade, modelo de calibração (linearidade), estabilidade, acurácia, precisão e limite inferior de quantificação. Os parâmetros adicionais que podem ser relevantes incluem: limite de detecção (LD), recuperação, reprodutibilidade e robustez [79,80,81,82].

No artigo 1, realizou-se a validação da metodologia para realizar dosagem de MPA. A validação de um método é um elemento básico de sistemas de qualidade laboratorial, como o proposto por Boas Práticas de Laboratório (BPL) [83] e ISO 17025 [85]. A validação visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão dos resultados. Nosso grupo de pesquisa elaborou um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleceu os parâmetros de validação de métodos analíticos, tais como linearidade, intervalo dinâmico, curva de calibração, sensibilidade, limite de detecção, limite inferior de quantificação, precisão, exatidão, recuperação, especificidade e robustez.

A especificidade visa à capacidade de um método para detectar o analito de interesse, quando presentes outros compostos da matriz. Isso determina a seletividade do método. Na análise de especificidade, foi alcançada separação segura dos analitos, e o tempo de retenção foi adequado para uma análise de rotina, sendo de aproximadamente 13 minutos. A carbamazepina foi utilizada como padrão interno. Todas as medicações testadas como possíveis interferentes são medicações prescritas na rotina dos pacientes transplantados, e que podem estar presente em grande parte das análises, durante a rotina de dosagem laboratorial.

A precisão é a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medições, obtidas a partir de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea,

nas condições descritas. Pode ser considerada em três níveis: precisão, repetibilidade e reprodutibilidade intermediária [85].

A precisão e a acurácia foram analisadas em 3 diferentes concentrações de MPA e MPAG, abrangendo as concentrações baixa, média e alta, da curva de calibração. Analisou-se a precisão intra e inter-dia e avaliou-se a proximidade entre várias medidas (n=6) efetuadas de uma mesma amostra. A linearidade, determinada pela análise de calibradores de diferentes concentrações, abrangeu a faixa de concentração de interesse no trabalho. As curvas apresentaram-se lineares e as análises abrangem todas as medicações testadas.

O limite inferior de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração detectável. O limite de detecção (LOD) determina a sensibilidade do método. Consiste na verificação da menor concentração de uma substância química que pode ser identificada e diferenciada do ruído. A obtenção do LOD foi feita usando seis amostras de plasma livres fármacos. O valor encontrado foi de 0,001 µg/ml para MPA e 0,530 µg/ml para MPAG. O valor encontrado para o MPA mostrou que a validação é mais sensível que a do método desenvolvido por Premaud et al., que obteve um LOD de MPA de 0,05 µg/ml [82]. Quanto aos valores do LOD para MPAG, os valores assemelham-se ao de outro estudo, que foi de 0,50 µg/ml.

A estabilidade, último parâmetro da verificação, foi determinada em amostras armazenadas entre 2 e 8°C. Demonstrou-se estabilidade de MPA e MPAG nas amostras de sangue total por um período de sete dias. O CV destas amostras foi ≤ 5%.

Semelhante a outros métodos publicados, foi utilizado um sistema de eluição de gradiente para a separação e quantificação simultânea de MPA e seus metabolitos [85,86,87,88]. No entanto, a validação deste estudo demonstrou-se de boa resolução, com exatidão e precisão, com tempo de retenção de aproximadamente 13 min.

Para que um medicamento requiera TDM, é importante mostrar que seu índice terapêutico é estreito - há relação entre concentrações de droga e eficácia clínica, toxicidade, e variabilidade intra-individual e inter-individual, farmacocinética e farmacodinâmica.

Para MPA, com base nos dados atuais, esses requisitos não são totalmente preenchidos. O mais importante deles é a falta de clara relação entre concentrações e resultado clínico, especialmente relacionados a eventos adversos. Seriam importantes estudos que melhor caracterizassem a relação entre níveis de MPA e toxicidade [53].

A aplicabilidade e a utilidade do MTF do MPA em Tx passam por várias condições: (1) Existe uma relação entre a exposição ao MPA e eficácia e/ou toxicidade? (2) O que causa a variabilidade na farmacocinética do MPA? (3) Podem ser definidos valores de referência

alvos para exposição ao MPA? (4) Como pode ser alcançada a concentração terapêutica na prática clínica? (5) Qual é o custo-benefício para manter o paciente dentro da janela terapêutica? Nos últimos anos, grandes ensaios clínicos e estudos farmacocinéticos de receptores renais têm fornecido novas percepções nesta discussão [53].

A técnica empregada para realização do MTF deve ser compatível com o ambiente hospitalar, as práticas ambulatoriais e as instalações do laboratório. Deve ser economicamente viável e ter seus resultados disponíveis em tempo hábil para melhorar os resultados clínicos e ser aplicável. A escolha do tipo de ensaio a utilizar vai depender de uma série de fatores como: aparelhos e capacidade disponíveis no laboratório, a carga de amostras, se o ensaio usará fração livre ou ligada a proteína plasmática e as concentrações de metabólitos de MPA ou MPAG. Em geral, laboratórios têm um pequeno número de amostras para analisar, ou recebem amostras com pouca frequência. Aqueles com uma carga grande de amostras, e aqueles com interesses de pesquisa, têm mais facilidade em adotar a técnica cromatográfica [53].

Apesar de HPLC com detecção de massa ser muitas vezes descrito como padrão-ouro, a técnica não é isenta de interferentes. Entre estes, estão a supressão da ionização por componentes da matriz da amostra, levando a resultados falsamente baixos e a fonte de fragmentação do MPAG, levando a resultados falsamente elevados. Não existe fonte comercial de uma forma marcada com isótopos estáveis de MPA para utilização como padrão interno. A validação do ensaio, de acordo com as normas internacionais, é essencial para todas as técnicas cromatográficas, independentemente do método de detecção [89].

Nesse trabalho foi empregada a técnica de MTF do MPA pela HPLC com detector UV, por ser esse um padrão ouro para pesquisas, no qual poderia-se analisar interferentes nos cromatogramas, além de metabólitos inativos. Nossa limitação, neste trabalho, foi no estudo 2 não poder disponibilizar os níveis de MPAG, pois no momento em que foram realizadas as análises, não estava mais disponível o padrão de MPAG.

Em média, a partir de dados de ensaios de proficiência, o acordo entre os vários métodos para cegamento de amostras que contenham concentrações conhecidas de MPA é bom.

No entanto, a precisão do calibrador deve ser tida em mente, especialmente para os centros que usam técnicas cromatográficas, pois a maioria prepara seus próprios calibradores. A precisão de calibração é um fator importante em longo prazo para a consistência de resultados e para a partilha de dados de vários centros de estudos clínicos [53].

Para padronização da análise de MPA, uma amostra de plasma com EDTA tem sido recomendada como a matriz de amostra [90]. No entanto, amostra de plasma heparinizado pode ser usada, apesar de a matriz utilizada dever estar de acordo com os folhetos de ensaios de plataforma ou os dados devam ser gerados especificamente para demonstrar a aptidão de uma matriz [90]. O mesmo cuidado deve ser mantido durante e após a coleta, no armazenamento e procedimentos de manuseio da amostra, e devem ser padronizados. As concentrações plasmáticas de MPA têm se mostradas estáveis, permanece constantes até pelo menos 8 horas à temperatura ambiente, 96 horas a 4 °C, e 11 meses a -20 °C [89]. A análise de estabilidade apresentada nesta tese demonstrou-se, portanto, validada.

As amostras em que há concentração muito elevada de MPAG podem resultar em concentrações de MPA falsamente elevadas. Pacientes com eliminação comprometida de glucuronídeos, como os que foram alvo recente de um transplante renal e apresentaram retardo na função do enxerto podem ter concentrações elevadas do metabólito - por vezes mais elevadas do que as do composto de interesse. O MPAG é instável em pH neutro ou alcalino, com perda de aproximadamente 25%, após 12 horas, e cerca de 40% após 24 horas a temperatura ambiente [91]. Há protocolos que podem-se utilizar para ultrapassar o problema pré-analítico [89,92,93].

A validação aqui apresentada demonstrou um tempo total de corrida analítica inferior a 13 min, fato que permitiu o ensaio sequencial de múltiplas amostras, em período relativamente curto. Isso se torna-se muito importante para a padronização da técnica para análises de amostras na rotina, permitindo análise, e retorno ao clínico, de forma relativamente rápida e segura.

O procedimento analítico deste trabalho empregou um pequeno volume de amostra, com extração simples de MPA.

Nesse trabalho, realizou-se coleta do sangue venoso em tubos de coleta contendo EDTA. Imediatamente após a coleta, os tubos foram centrifugados e o plasma estocado em freezer a -20°C. As amostras foram todas analisadas dentro de um prazo máximo de 60 dias após a coleta. Todos os procedimentos pré-analíticos seguiram rigorosamente o protocolo (POP), desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, sendo que todos os membros da equipe responsável pela coleta estavam devidamente treinados para realizar esse procedimento. Com isso, reduziu-se a possibilidade de erros pré-analíticos.

A análise da fração livre de MPA parece ser uma alternativa de grande importância no MTF do MPA, embora seja essa uma análise mais trabalhosa, o que pode limitar seu emprego na prática clínica. Em casos específicos, essa análise pode auxiliar no ajuste de dose, como

em pacientes com insuficiência renal, principalmente durante o período de pós-transplante imediato, quando o paciente apresente retardo na função do enxerto. Acumulando MPAG, o MPA desloca-se a partir da proteína de ligação [94]. A acidose e a ureia também diminuem a ligação de MPA à albumina. Isto leva a um aumento da fração livre de MPA que, por sua vez, pode aumentar sua remoção (gerando concentrações mais baixas) [95,96]. Por outro lado, há dados mostrando que, em pacientes com função renal pior, não só MPAG se acumula, como também MPA. A análise da fração livre de MPA, se puder ser feita com precisão para determinar as concentrações ativas, real e livre, pode ser benéfico em doentes com insuficiência renal grave [97,98,99]. Em estudo populacional, envolvendo 468 pacientes transplantados renais, o clearance de creatinina estimado (fórmula de Cockcroft e Gault) explicou 19% da variabilidade de MPA [39]. A função renal tem efeito clinicamente relevante na depuração MPA, quando o clearance de creatinina é ≤ 25 ml/min/1,73m². Nestes casos, pode haver benefício na medida de MPA livre, ao invés de usar somente a concentração total [95,96].

Ainda, no que diz respeito à fração livre de MPA, hipoalbuminemia reduz o número de sítios de ligação disponíveis para MPA e MPAG [93,96]. Diminuição da albumina sérica tem se associado a aumento da fração de MPA livre, que por sua vez pode levar a aumento do clearance de MPA, e diminuição da concentração total de MPA plasmático (de novo causando baixa mensuração da exposição total de MPA) [100]. Hipoalbuminemia parece ter o maior efeito clínico na depuração de MPA, quando a albuminemia é inferior a 3,10 g/dL [96]. A albumina sérica \leq a 3,10 g/dL pode ser utilizada para prever em quais pacientes deve-se considerar a monitorização da exposição ao MPA livre. Em estudo populacional, envolvendo 468 pacientes com Tx, em 12% a albumina sérica explicou a variabilidade intra-pacientes e em 5% a variabilidade inter-paciente foi associada com clearance de MPA [39]. Frente a esses dados, torna-se de grande utilidade a realização do MTF da fração livre do MPA. Validar o método, aplicado à fração livre do MPA é um dos próximos objetivos de nosso grupo de pesquisa.

O estudo APOMYGRE forneceu sugestões importantes para o desenvolvimento futuro do MTF do MPA: (1) A utilização de um estimador Bayesiano que se baseia em um LSS de três pontos de tempo (20 minutos, 1 hora e 3 horas após a dosagem MMF) para guiar os ajustes de dosagem, foi adequado em mais de 80% dos casos; (2) Ajuste clínico de dose para atingir uma AUC de MPA 12 horas > 30 mg \times h/L em 67% dos doentes no dia 14 e em 91% em 1 mês, em comparação com apenas 31 e 56% no grupo com dose fixa de MMF, respectivamente; (3) A dosagem de MMF média necessária no grupo de concentração

controlada foi de 3 g/d durante os primeiros três meses e em mais de seis meses as doses de MMF foram reduzidos a uma média de 2 g/d. Houve grande distribuição de doses (1-4 g), com 80% dos pacientes necessitando doses maiores que 2 g/d; (4) Análise retrospectiva não mostrou diferenças nos custos financeiros entre os grupos de concentração controlada e de dose fixa, com MTF representando apenas 1% do total de custos [101].

A AUC de 12 horas é considerada padrão para o critério de monitorização do MPA - que é um reflexo da exposição à droga. Se um protocolo de amostragem, acoplado com regressão múltipla ou estimativa de Bayes é usado para determinar este parâmetro, ele deve ser usado apenas para a população em que o modelo foi desenvolvido, e deve incluir, pelo menos, um ponto depois de 4 horas (de preferência cerca de 8 ou 9 horas após a administração do MMF). Se um ponto de tempo único for ser usado e extrapolado para uma AUC de 12 horas pela concentração de MPA, ainda que mais prática, do ponto de vista farmacocinético não será o melhor ponto de tempo para escolher [29].

Inibidores da bomba de proton (IBP) são frequentemente prescritos pós-transplante para prevenir complicações gástricas. Úlcera péptica é uma complicação comum após o transplante de órgãos e, em longo prazo, a administração de agentes antiulcerosos é necessária em pacientes transplantados [68,102]. Há evidências indiretas de interação dos IBP com o MPA. Entretanto, pouco sabe-se sobre o fato [41].

Os IBP podem modificar a liberação intragástrica de outras drogas, aumentando o valor do pH [102]. Estudos têm demonstrado interação importante entre administração de IBP com MMF, entretanto o mesmo não tem sido observado quando da administração de IBP com MMS.

No estudo 2, realizou-se a análise de 103 pacientes transplantados renais, independentemente do tipo de micofenolato em uso, utilizando ou não omeprazol oral. Os pacientes foram randomizados para cada grupo após coleta de sangue e conhecimento das medicações em uso (coleta em prontuários e folhas de fluxo). Analisando a população em estudo, 64 (62%) pacientes era do sexo feminino. A idade da população foi de 46 (± 13) anos. Noventa e cinco por cento da população eram caucasianos. Portanto, fatores étnicos não podem ser interferentes na análise. A doença de base mais prevalente foi desconhecida (30%), seguida por hipertensão arterial sistêmica (20%) e diabetes mellitus (11%). A maioria recebera um primeiro transplante (95%), sendo que o tempo médio de transplante até o momento da coleta foi de 18 (6-51) meses. O tempo de uso de dose estável de micofenolato (seja MMF ou MMS) foi 19 (8-51) meses. A creatinina foi de 2,09 ($\pm 1,44$) mg/dl e a DCE estimada 36 (24-50) ml/min/1,73m².

O IBP estudado foi o omeprazol. A escolha deveu-se ao fato de que o omeprazol é o IBP dispensado pela Secretária de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, onde a maioria dos pacientes recebe a medicação e sendo, portanto, o IBP mais utilizado pelos pacientes transplantados renais atendidos no Hospital São Lucas da PUCRS.

Os valores obtidos para as dosagens de MPA formam bastante assimétricos e para análises comparativas, sofreram prévia transformação a escala logarítmica. Aparentemente, não houve interação entre o uso de omeprazol e os níveis plasmáticos de MPA. Esperava-se uma aproximação aos resultados da literatura prévia, e redução dos níveis de MPA em pacientes que usavam MMF, juntamente com omeprazol. Entretanto, para nossa surpresa, esse resultado não foi observado. Este talvez seja um resultado de importância terapêutica no uso

de MPA. O embasamento para a observação anterior é a de que, após a administração oral, o MMF sofre desesterificação, que é significativamente inibida pelo aumento do pH [66]. Estudo anterior investigou a solubilidade de MMF e MMS soluções tampão aquosas a diferentes valores de pH. A solubilidade de MMF foi de 4 mg/L em pH 4, caindo para apenas 0,24 mg/L em pH 5,2 [103]. Portanto, o aumento do pH gástrico (que ocorre quando o indivíduo recebe omeprazol) pode reduzir a solubilidade de MMF, levando a menor absorção de MPA [101]. Os achados presentes contrariam essa idéia.

Resultados semelhantes foram relatados anteriormente com outros ésteres de pró-fármacos, como cefalospirinas administradas por via oral [32]. Neste trabalho, o possível aumento do pH gástrico, pelo uso de omeprazol, não pareceu interferir na dissociação do comprimido de MMF, pois os níveis plasmáticos não foram significativamente modificados.

Conclusão semelhante ao estudo acima, sobre o efeito do pH gástrico sobre a biodisponibilidade da MMF é sugerida a partir de estudo recente em pacientes transplantados, tratados com lansoprazol e MMF [104].

Os IBP são metabolizados e inativados no fígado, principalmente por CYP2C19. A inibição da secreção ácida, e o pH do estômago, depende também de diferenças genotípicas na atividade do sistema CYP2C19 [105,106].

Os resultados do grupo de MMS usando omeprazol sobrepuseram-se a os dados da literatura prévia, demonstrando não haver interação de MMS sobre os níveis de MPA.

Estudos *in vitro* demonstraram que o revestimento entérico de MMS permanece praticamente intacto até pH 5.0. Logo, a passagem pelo ambiente ácido do estômago não parece afetar a entrega sistêmica direta de MPA; apenas quando atinge o intestino delgado (pH>5.0) é que o comprimido de MMS se torna solúvel [30,109,110].

Em contraste ao MMF, o MMS pode ser estável por duas horas, em pH 5,0 e por 40 minutos em um pH 5,5. A liberação rápida de MPA ocorreu, apenas, quando o pH foi elevado para 6,0 ou mais [30].

A alteração da biodisponibilidade também pode ocorrer por diminuição da absorção de MPA, ou sua depuração metabólica aumentada. Glicocorticoides, por exemplo, aumentam a transformação de MPA em MPAG, por indução da atividade de UDP-glucuronil-transferase, diminuindo as concentrações plasmáticas de MPA [41].

Além disso, podem influenciar a absorção e o metabolismo do fármaco, por interação com trifosfato de adenosina dependente de P-glicoproteína, ou com a enzima citocromo P450 [109]. Sugere-se que o sistema citocromo P450 esteja envolvido na interação com MMF [105].

Fato interessante foi a observação de que, embora não se tenha encontrado diferença estatística entre os quatro grupos, a co-administração de omeprazol - tanto o grupo MMF quanto para o grupo MMS - reduziu a variância dos valores de níveis plasmáticos de MPA. Pareceu ter ocorrido maior “estabilidade” nos níveis de MPA, tanto para MMF, como para MMS com a administração concomitante de omeprazol. Os níveis de MPA se mantinham dentro da faixa terapêutica. Não há explicação óbvia para o fato e a literatura, tanto quanto possamos saber, não contempla o resultado encontrado.

A grande variabilidade nos níveis de MPA, nos pacientes em estudo, tanto com MMF quanto com MMS, poderia ser um fator confundidor para nossos resultados. O mesmo poderia acontecer se os pacientes estudados - como ocorre na maioria dos pacientes transplantados - fizessem uso de uma grande variedade de outros fármacos, como anti-hipertensivos, hipoglicemiantes orais, anti-lipidêmicos, quimioterápicos e antibióticos profiláticos. Essa variabilidade de drogas, usadas concomitante, poderiam alterar a absorção de MMF e de MMS. Assim, não podemos afirmar que a maior estabilidade dos níveis de MPA ocorreu, apenas, por uso de omeprazol. O resultado imediato pode levar a esse raciocínio, entretanto, para afirmá-lo será necessário realizar um estudo de AUC com os mesmos grupos já estudados, para avaliar com segurança o que ocorre, farmacocineticamente, com esses pacientes. Esse estudo já está programado como perspectiva futura em nosso grupo de pesquisas.

Como acontece com muitos outros imunossuppressores, o MPA apresenta um aumento tempo-dependente da biodisponibilidade [53,110]. O aumento poderia fazer o efeito do IBP menos importante, após certo tempo do transplante [103]. A população estudada apresentou variação significativa do tempo pós transplante, quando avaliada. Entretanto, com um estudo

de AUC, esse parâmetro poderia também ser avaliado, recrutando pacientes dentro de uma mesma faixa de tempos após transplante a ser delimitada.

Os pacientes recrutados, em uso de omeprazol, recebiam 20 mg de omeprazol pela manhã. A persistência da secreção ácida durante a noite quando IBP são administrados pela manhã pode ocorrer devido à presença de síntese ácida "*de novo*" de bombas que nunca foram expostos a IBP [111,112]. Assim, o efeito observado na farmacocinética diurna não pode ser estendida para aquele durante a noite, o que pode fazer com que o efeito do IBP seja ainda menos importante, clinicamente [102].

Não é clara a significância clínica dos IBP exposição do MPA e nos episódios de rejeição. Doses maiores de MMF no período pós-transplante inicial podem ser necessárias para exposição adequada, se o paciente recebe IBP. Dada a grande variabilidade, monitorização terapêutica pode ser útil nos casos em que o médico esteja preocupado com a exposição ao MPA, principalmente se considerando o uso associado de inibidor da calcineurina ou de esteróides, quando adequada exposição ao MPA pode ser crítica [103,113].

Quando realizamos a análise dos grupos, com referência ao nível terapêutico, percebemos que tanto o grupo com MMF quanto o com MMS, recebendo omeprazol, apresentavam porcentagem de pacientes dentro da faixa terapêutica, comparativamente aos grupos de MMF e MMS que não recebiam. A observação mostra que houve uma menor variância nos valores do nível de MPA, que estiveram mais frequentemente na faixa terapêutica. Entretanto, os dados não alcançaram significância estatística. Para tanto, seria necessário aumentar o "n" da amostra em aproximadamente oito vezes. Outra vez, não podemos afirmar que o efeito sugerido seja dependente, apenas do uso concomitante de omeprazol – outras drogas podem se associar para produzir o resultado observado.

7 CONCLUSÃO

A validação de um método de análise para níveis plasmáticos de MPA foi devidamente realizada, atingindo todos os parâmetros obrigatórios. Na análise de possível interação de omeprazol com MMF ou MMS sobre os níveis plasmáticos de MPA, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre grupos. Entretanto, ocorreu tendência a menor variância dos valores do nível plasmático de MPA em pacientes que usavam omeprazol concomitantemente com MMF ou MMS. Talvez, aumentando a amostra, esta sugestão se tornasse mais evidente.

Os achados do estudo podem contribuir para melhor entendimento no uso do MMF e MMS, bem como para esclarecer o papel dos IBP sobre os níveis plasmáticos de MPA.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Nosso grupo de pesquisas almeja a continuidade na realização de estudos envolvendo monitoramento terapêutico de fármacos imunossupressores. Os objetivos seguirão voltados para realização de projetos envolvendo monitoramento terapêutico intracelular desses fármacos, assim como o desenvolvimento de protocolos de estudos farmacocinéticos, visando alterações de concentrações sanguíneas em diferentes esquemas de co-administrações de medicações, tais como o papel de fármacos rotineiramente incluídos na profilaxia de infecções, sobre o nível plasmático de MPA.

Avaliação da fração livre de MPA também é do nosso interesse de estudo, assim como realização de mais estudos de área sobre a curva, especialmente no uso de omeprazol e as pró-drogas de MPA.

REFERÊNCIAS

- [1] Barry JM. Renal Transplantation. I: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (eds). Campbell's Urology, 8th ed., Philadelphia, Saunders, 2002, pp.345-76.
- [2] Morris PJ. Kidney Transplantation. Principles and Practice. 5th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 2001. 787p.
- [3] Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimo AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med*. 2002; 364(8):580-90.
- [4] Manfro RC, Carvalhal GF. Transplante Renal. Simpósios sobre transplantes. *Revista AMRIGS*. 2003, 47(1):14-19.
- [5] Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(6):365-76.
- [6] United Kingdom Guidelines for living Donor Kidney Transplantation. January 2000. Capturado pela internet em 29 de Julho de 2009.
- [7] Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV, et al. Transplante Renal: Aspectos clínicos, rotinas e complicações. In: Barros EJ, Manfro RC, Thomés FS, Gonçalves LF. *Nefrologia: Rotinas, Diagnósticos e Tratamento*. Artes Médicas, Porto Alegre. 1999; p475-97.
- [8] Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000;342(9):605-12.
- [9] Caves PK, Stinson EB, Griep RB, et al. Results of 54 cardiac transplants. *Surgery*. 1973;74(2):307-14.
- [10] Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, et al. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc*. 1956;160(4):277-82.
- [11] Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report—2007. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(12):769-81.
- [12] Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, *et al*. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation*. 1999;68(1):55-62.
- [13] Mentzer RM Jr, Jahania MS, Lasley RD. Tacrolimus as a rescue immunosuppressant after heart and lung transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Study Group. *Transplantation*. 1998;65(1):109-13.
- [14] Patel JK, Kobashigawa JA. Tacrolimus in heart transplant recipients: an overview. *BioDrugs*. 2007;21(3):139-43

- [15] Kobashigawa J, Miller L, Renlund D, et al. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. *Mycophenolate Mofetil Investigators. Transplantation*. 1998;66(4):507-15
- [16] Ohsugi Y, Suzuki S, Takagaki Y. Antitumor and immunosuppressive effects of mycophenolic acid derivatives. *Cancer Res*. 1976;36(8):2923-7.
- [17] Del Tacca M. Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tools – a review. *Transplant Proc*. 2004;36(3):687-9.
- [18] Behrend M. Mycophenolate mofetil (Cellcept). *Expert Opin Invest Drugs*. 1998;7(9):1509-19.
- [19] Meier-Kriesch HU, Li S, Gruessner RW, et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant*. 2006;6(5):1111-31.
- [20] Elbarbry FA, Shoker A. Simple high performance liquid chromatographic assay for mycophenolic acid in renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;43(2):788-92.
- [21] Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, et al. Acyl glucuronide drug metabolites: toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit*. 2003;25(1):1-16.
- [22] Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clin Biochem*. 2007;40(11):752-64.
- [23] Mourad M, Wallemacq P, Konig J, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in organ transplant recipients: is it necessary? *Clin Pharmacokinetics*. 2002;41(5):319-27.
- [24] Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):85-118.
- [25] Shaw LM, Figurski M, Milone MC, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(5):1062-72.
- [26] Smith KG, Isbel BM, Caton MG, et al. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(1):160-4.
- [27] Oremus M, Zeidler J, Ensom MHH, et al. Utility of monitoring mycophenolic acid in solid organ transplant patients. *Evid Rep Technol Assess*. 2008;164:1-131.
- [28] de Winter BC, Van Gelder T, Glander P, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid: a comparison between enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(12):827-38.
- [29] Tett SE, Saint-Marcoux F, Staats CE, et al. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev*. 2011;25(2):47-57.

- [30] Arns W, Breuer S, Choudhury S, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant*. 2005;19(2):199-206.
- [31] Budde K, Bauer S, Hambach P, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamics comparison of the enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in maintenance renal transplant patients. *Am J Transplant*. 2007;7(4):888-98.
- [32] Cattaneo D, Cortinovis M, Baldelli S, et al. Pharmacokinetics of mycophenolate sodium and comparison with the mofetil formulation in stable kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(6):1147-55.
- [33] Budde K, Curtis J, Knoll G, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium can be safely administered in maintenance renal transplant patients: result of a 1-year study. *Am J Transplant*. 2004;4(2):237-43.
- [34] Salvadori M, Holzer H, de Mattos A, et al. Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am J Transplant*. 2004;4(2):231-6.
- [35] Budde K, Glander P, Krämer BK, et al. Conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in maintenance renal transplant recipients receiving tacrolimus: clinical, pharmacokinetics and pharmacodynamics outcomes. *Transplantation*. 2007;83(4):417-24.
- [36] Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and Pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(1):13-58.
- [37] Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, et al. Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit*. 2001;23(4):305-15.
- [38] Nawrocki A, Korecka M, Solari S, Kang J, Shaw LM: Mycophenolic acid: In: Applied pharmacokinetics and pharmacodynamics: Principles of therapeutic drug monitoring. 4th Ed., edited by Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ, Evans WE. Philadelphia, Lippincott Williams E Willians. 2006,pp 563-594.
- [39] van Hest RM, Mathot RA, Pescovitz MD, et al. Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: a population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(3):871-80.
- [40] Kofler S, Wolf C, Shvets N, et al. The proton pump inhibitor pantoprazole and its interaction with enteric-coated mycophenolate sodium in transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(5):565-71.
- [41] Rupprecht K, Schmidt C, Raspé A, et al. Bioavailability of mycophenolate mofetil and enteric-coated mycophenolate sodium is differentially affected by pantoprazole in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2009;49(10):1196-201.

- [42] Schmidt LE, Rasmussen A, Norrelykke MR, et al. The effect of selective bowel decontamination on the pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients. *Liver Transplant*. 2001;7(8):739-42.
- [43] Naderer OJ, Dupuis RE, Heinzen EL, et al. The influence of norfloxacin and metronidazole on the disposition of mycophenolate mofetil. *J Clin Pharmacol*. 2005;45(2):219-26.
- [44] Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34(6):429-55.
- [45] Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, et al. The magnitude and time course of changes in mycophenolic acid 12-hour predose levels during antibiotic therapy in mycophenolate mofetil-based renal transplantation. *Ther Drug Monit*. 2007;29(1):122-6.
- [46] Potter JM. Pharmacoeconomics of therapeutic drug monitoring in transplantation. *Ther Drug Monit*. 2000;22(1):36-9.
- [47] Karaalp A, Demir D, Goren MZ, et al. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in Marmara University Hospital. *Ther Drug Monit*. 2004;26(3):263-6.
- [48] Lima RD. Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia. Guanabara Kogan, 1992.
- [49] Kahan BD. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation*. 1985;40(5):457-76.
- [50] Cattaneo D, Gaspari F, Ferrari S, et al. Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients. *Clin Transplant*. 2001;15(6):402-9.
- [51] Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, et al. Current target ranges of mycophenolic acid exposure and drug-related adverse events: a 5-year, open label, prospective, clinical follow-up study in renal allograft recipients. *Clin Ther*. 2008;30(4):673-83.
- [52] van Gelder T, Le Meur Y, Shaw LM, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplant. *Ther Drug Monit*. 2006;28(2):145-54.
- [53] Kuypers DR, LeMeur YK, Cantarovich M, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(2):341-58.
- [54] Baldelli S, Merlini S, Perico N, et al. C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene Affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics*. 2007;8(9):1127-41.
- [55] Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide

polymorphism T-275A and C2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(4):351-61.

[56] Prausa SE, Fukuda T, Maseck D, et al. UGT genotype may contribute to adverse events following medication with mycophenolate mofetil in pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(5):495-500.

[57] Van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, et al. UGT1A9-275T>A/-2152C>T polymorphism correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treatment kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(3):319-27.

[58] Miura M, Satoh S, Inoue K, et al. Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63(2):1161-9.

[59] Levesque E, Delage R, Benoit-Biancamano MO, et al. The impact of UGT1A 8, UGT1A9 and UGT2B7 genetic polymorphisms on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after oral dose in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81:392-400.

[60] Levesque E, Benoit-Biancamano MO, Delage R, Couture F, Guillemette C. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and its glucuronide metabolites in healthy volunteers. *Pharmacogenomics.* 2008;9(7):869-79.

[61] van Gelder T, Tedesco Silva H, de Fijter JW, et al. Renal transplant patients at high risk of acute rejection benefit from adequate exposure to mycophenolic acid. *Transplantation.* 2010;89(5):595-9.

[62] Daurel-Receveur M, Titier K, Picard SP, et al. Fully automated analytical method for mycophenolic acid quantification in human plasma using online solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection. *Ther Drug Monit.* 2006;28(4):505-511.

[63] Brandhorst G, Streit F, Goetze S, et al. Quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry of mycophenolic acid and its phenol and acyl glucuronide metabolites. *Clin Chem.* 2006;52(10):1962-1964.

[64] Prémaud A, Rousseau A, Picard N, et al. Determination of mycophenolic acid plasma levels in renal transplant recipients co-administered sirolimus: Comparison of an enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2006;28(2):274-7.

[65] Troppmann C, Papalois BE, Chiou A, et al. Incidence, complications, treatment and outcome of ulcers of the upper gastrointestinal tract after renal transplantation during the cyclosporine era. *J Am Coll Surg.* 2005;180(4):433-43.

- [66] Kofler S, Deutsch MA, Bigdeli AK, et al. Proton pump inhibitor co-medication reduce mycophenolate acid drug exposure in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28(6):605-11.
- [67] Diaz B, Gonzalez Vilchez F, Almenar L, et al. Gastrointestinal complications in herat transplant patients: MITOS study. *Transplant Proc*. 2007;39(7):2397-400.
- [68] Kees MG, Steinke T, Moritz S, et al. Omeprazole impairs the absorption of mycophenolate mofetil but not of enteric-coated mycophenolate sodium in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(8):1265-72.
- [69] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE nº 899 de 29 de Maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Ministério da Saúde.
- [70] Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2-3):216-24
- [71] Westley IS, Sallustio BC, Morris RG. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the measurement of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in plasma. *Clin Biochem*. 2005;38(9):824-9
- [72] Yau WP, Vathsala A, Lou HX, et al. Simple reversed-phase liquid chromatographic assay for simultaneous quantification of free mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;846(1-2):313-8.
- [73] Khoshsorur G, Erwa W. Liquid chromatographic method for simultaneous determination of mycophenolic acid and its phenol- and acylglucuronide metabolites in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;799(2):355-60.
- [74] Srivatsan V, Dasgupta AK, Kale P, et al. Determination of mycophenolic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004;1031(1-2):259-64.
- [75] Patel CG, Mendonza AE, Akhlaghi F, et al. Determination of total mycophenolic acid and its glucuronide metabolite using liquid chromatography with ultraviolet detection and unbound mycophenolic acid using tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;813(1-2):287-94.
- [76] Bolon M, Jeanpierre L, El Barkil M, et al. HPLC determination of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma with hybrid material. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36(3):649-51

- [77] Pastore A, Lo Russo A, Piemonte F, et al. Rapid determination of mycophenolic acid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;776(2):251-4.
- [78] Bahrami G, Mohammadi B. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid-liquid extraction: application to human pharmacokinetic studies. *Clin Chim Acta.* 2006;370(1-2):185-90.
- [79] Shah VP, Midha KK, Dighe S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1991;16(4):249-55.
- [80] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharm Res.* 2000;17(12):1551-7.
- [81] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, et al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17(2):193-218.
- [82] Lindner W, Wainer IW. Requirements for initial assay validation and publication in *J. Chromatography B. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1998;707(1-2):1-2.
- [83] ABNT. NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
- [84] INMETRO. Norma nº NIT-DICLA-035. Rio de Janeiro: INMETRO, 2011.
- [85] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: definitions and terminology, IOCH Q2 A, 1994.
- [86] Premaud A, Rousseau A, Picard N, et al. Determination of mycophenolic acid plasma levels in renal transplant recipients co-administered sirolimus: comparison of an enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2006;28(2):274–7.
- [87] Shipkova M, Schütz E, Armstrong VW, et al. Determination of the acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in human plasma by HPLC and Emit. *Clin Chem.* 2000;43(3):365-72.
- [88] Patel CG, Akhlaghi F. High-performance liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human plasma. *Ther Drug Monit.* 2006;28(1):116-22.
- [89] Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2005;38(4):328-34.
- [90] Shaw LM, Nicholls A, Hale M, et al. Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report. *Clin Biochem.* 1998;31(5):317-22.

- [91] Shipkova M, Armstrong VW, Kiehl MG, et al. Quantification of mycophenolic acid in plasma samples collected during and immediately after intravenous administration of mycophenolate mofetil. *Clin Chem*. 2001;47(8):1485-8.
- [92] Tsina I, Kaloostian M, et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of mycophenolate mofetil in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;681(2):347-53.
- [93] de Loor H, Naesens M, Verbeke K, et al. Stability of mycophenolic acid and glucuronide metabolites in human plasma and the impact of deproteinization methodology. *Clin Chim Acta*. 2008;389(1-2):87-92.
- [94] Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem*. 1995;41(7):1011-7.
- [95] van Hest RM, van Gelder T, Vulto AG, et al. Pharmacokinetic modelling of the plasma protein binding of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(7):463-76.
- [96] Atcheson BA, Taylor PJ, Kirkpatrick CM, et al. Free mycophenolic acid should be monitored in renal transplant recipients with hypoalbuminemia. *Ther Drug Monit*. 2004;26(3):284-6.
- [97] Mudge DW, Atcheson BA, Taylor PJ, et al. Severe toxicity associated with a markedly elevated mycophenolic acid free fraction in a renal transplant recipient. *Ther Drug Monit*. 2004;26(4):453-5.
- [98] Hao C, Anwei M, Bing C, et al. Monitoring mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in liver transplant recipients: prediction of occurrence of leucopenia. *Liver Transp*. 2008;14(8):1165-73.
- [99] Kaplan B, Gruber SA, Nallamathou R, et al. Decreased protein binding of mycophenolic acid associated with leukopenia in a pancreas transplant recipient with renal failure. *Transplantation*. 1998;65(8):1127-9.
- [100] de Winter BC, van Gelder T, Sombogaard F, et al. Pharmacokinetic role of protein binding of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in renal transplant recipients. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2009;36(6):541-64.
- [101] Le Meur Y, Büchler M, Thierry A. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7(11):2496-503.
- [102] David-Neto E, Takaki KM, Agena F, et al. Diminished mycophenolic acid exposure caused by omeprazole may be clinically relevant in the first week posttransplantation. *Ther Drug Monit*. 2012;34(3):331-6.

- [103] Kiberd BA, Wrobel M, Dandavino R, et al. The role of proton pump inhibitors on early mycophenolic acid exposure in kidney transplantation: evidence from the CLEAR study. *Ther Drug Monit.* 2011;33(1):120-3.
- [104] Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya, et al. Influence of lansoprazole and rabeprazole on mycophenolic acid pharmacokinetics one year after renal transplantation. *Ther Drug Monit.* 2008;30(1):46-51.
- [105] Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int Clin Pharmacol Ther.* 2006;44(7):297-302.
- [106] Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, et al. Influence of CYP2C19 pharmacogenetic polymorphism on proton pump inhibitor-based therapies. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20(3):153-67.
- [107] Sanford M, Keating GM. Enteric-coated mycophenolate sodium: a review of its use in the prevention of renal transplant rejection. *Drug.* 2008;68(17):2505-33.
- [108] Arns W. Noninfectious gastrointestinal (GI) complications of mycophenolic acid therapy: a consequence of local GI toxicity? *Transplant Proc.* 2007;39(1):88-93.
- [109] Blume H, Donath F, Warnke A, et al. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors. *Drug Saf.* 2006;29(9):769-84.
- [110] Pereira L, Castro M, Ventura C. The modify study in renal transplantation (modification of doses to improve function through the years). *Am J Transplant.* 2005;11(5):466.
- [111] Gedda K, Scott D, Besancon M, et al. Turnover of the gastric H⁺,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase alpha subunit and its effect on inhibition of rat gastric acid secretion. *Gastroenterology.* 1995;109(4):1134-41.
- [112] Sachs G, Shin JM, Hunt R. Novel approaches to inhibition of gastric acid secretion. *Curre Gastroenterol Rep.* 2010;12(6):437-47.
- [113] Lidgate D, Brandl M, Hoilper M, et al. Influence of ferrous sulfate on the solubility, partition coefficient, and stability of mycophenolic acid and the ester mycophenolate mofetil. *Drug Dv In Pharm.* 2002;25(10):1275-83.

Anexo A – Confirmação de Submissão do Artigo 1 pelo Editor

TDM Submission Confirmation for HIGH-PERFORMANCE LIQUID UV-CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF MYCOPHENOLIC ACID AND ITS GLUCURONIDE METABOLITE. [Exibição completa](#)

The TDM Editorial Office [Adicionar a contatos](#)
Para Carmen Silvana Araujo Oliveira 08/11/2012
Responder

Therapeutic Drug Monitoring
08 Nov 2012

Dear Mrs Carmen Silvana Araujo Oliveira,

Your submission entitled "HIGH-PERFORMANCE LIQUID UV-CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF MYCOPHENOLIC ACID AND ITS GLUCURONIDE METABOLITE." has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://sdm.edmgr.com/>

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,
Therapeutic Drug Monitoring

Anexo B – Certificado de Apresentação de Pôster em Congresso



Anexo C – Certificado de Premiação em Congresso



Anexo D – Certificado de Apresentação Oral em Congresso

