

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA DA CICLOSPORINA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS EM AMOSTRA DE PLASMA POR HPLC-PDA

Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

lvqlabre@gmail.com

Palavras-chave: validação, ciclosporina, imunossupressor.

LABRE, Luciana Vieira Queiroz; **CUNHA**, Luiz Carlos; **ARANTES**, Adriano de Moraes; **EFFTING**, Cristiane; **OLIVEIRA**, Fernando Gomes Ferreira; **NETO**, Jeronimo Raimundo de Oliveira; **HONORIO**, Tereza Cristina de Deus; **CARNEIRO**, Wilsione Jose.

1. Introdução :

Existem alguns imunossupressores, dentre eles a ciclosporina, descritos na literatura e amplamente difundidos para aplicação no tratamento de pós-transplantes e/ou doenças auto-imunes (como a psoríase). Devido à sua complexa farmacocinética e à sua faixa terapêutica estreita (e, portanto, com alto potencial de toxicidade), devem ter administração e acompanhamento criteriosos para avaliação de eficácia/ineficácia, tolerância e toxicidade em decorrência de sua utilização farmacoterapêutica (vollenbroeker, 2005; hallworth; capps, 1993).

A justificativa para determinação dos níveis séricos da ciclosporina é a necessidade de acompanhamento regular de sua concentração no sangue, para evitar efeitos adversos e para assegurar a eficácia de imunossupressão (cattaneo, 2004). Os níveis de fármacos ou metabólitos são necessários para o acompanhamento regular da terapêutica, além da observação de reações adversas, interações medicamentosas, estudos de toxicidade, farmacocinética, farmacodinâmica. Assim, a especificidade das técnicas analíticas a aplicar é de primordial importância na monitoração terapêutica de fármacos (hallworth; capps, 1993).

Pestana (2002) cita que o uso crescente de fármacos com faixa terapêutica estreita, baixo índice terapêutico e elevada variabilidade farmacocinética inter e intraindividual requer continua monitoração terapêutica para a redução da morbidade e otimização da eficácia após o transplante.

Quando se usa uma droga imunossupressora potente como a ciclosporina, podem ocorrer variações de seus níveis sanguíneos devido à sua farmacocinética complexa, o monitoramento deve ser constante mesmo quando o paciente não apresenta sinais e sintomas aparentes de problemas relacionados ao fármaco. Alguns fármacos podem aumentar seu potencial tóxico, como as cefalosporinas, e outros podem aumentar seus níveis como a anfotericina ou o verapamil. Outros podem interagir reduzindo seus níveis séricos como o fenobarbital ou rifampicina (vollenbroeker, 2005).

2. Objetivo :

Desenvolver e validar técnica analítica em HPLC-PDA capaz de quantificar os níveis plasmáticos de ciclosporina A em pacientes transplantados, visando a correlação dos níveis de ciclosporina A obtidos, com valores de referência na literatura (terapêuticos, sub-terapêuticos e tóxicos), além de buscar associação com sinais, sintomas e valores laboratoriais dos pacientes, registrados em prontuários, e estipular condições mais eficientes para o ajuste de dose da ciclosporina em pacientes transplantados.

3. Material e Métodos :

Os pacientes do ambulatório de transplantes, do Hospital Araújo Jorge, em tratamento farmacoterapêutico com a ciclosporina A (cerca de 2 pacientes/mês) serão convidados a participar do estudo. Os pacientes serão esclarecidos sobre o estudo, quando será feita a Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) . Após o esclarecimento, o paciente (ou responsáveis) que consentir em participar do estudo, assinará o TCLE em duas vias na presença de duas testemunhas. Não haverá restrição de faixa etária ou gênero. Pacientes com tempo de tratamento inferior a 2 semanas serão excluídos do estudo.

As amostras serão coletadas de pacientes em uso de ciclosporina A de ambos os sexos em tratamento no Hospital Araújo Jorge a partir da data de aprovação pelo Comitê de Ética da UFG e do Hospital Araújo Jorge.

Para a análise comparativa, 06 pacientes transplantados, serão incluídos. As amostras de sangue serão coletadas, por punção venosa (5 ml) no ambulatório do Hospital Araújo Jorge e transferidas para um tubo com EDTA. O plasma será separado por centrífuga e armazenado imediatamente a -20°C para posterior

análise na Central Analítica do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG (NEPET), vinculado à Unidade de Pesquisa Clínica da UFG (UPC-UFG).

Empregar-se-á a cromatografia líquida de alta eficiência com detector fotodiodo (HPLC-PDA), com sistema de gradiente de concentração, como método de análise e quantificação das concentrações plasmáticas da ciclosporina.

As análises quantitativas de ciclosporinaa em plasma humano serão realizadas por meio de cromatógrafo líquido Shimadzu[®] LC-20AT, equipado com detector por arraste de diodos (SPD-M20A) e detector de fluorescência (RF-10AXL), acoplado a um amostrador automático SIL-20A (Prominence[®] Auto Sampler) e forno de coluna CTO-20A (Prominence[®]), controlados por módulo de comunicação CBM-20A.

A técnica analítica envolverá procedimentos de extração do princípio ativo presentes em plasma, limpeza das impurezas com solventes orgânicos, concentração do princípio ativo e análise em HPLC-PDA.

As condições cromatográficas serão validadas, baseando-se nas que seguem: coluna: C18 (10 cm x 4,6 mm), Fase Móvel: Água/Acetonitrila (65:35%, v/v); sob fluxo de 0,7 ml/min, padrão Interno: cetoconazol, com detecção em detector UV $\lambda = 210$ nm, forno de coluna a 50C o que aumentará a sensibilidade e a seletividade da técnica analítica, conforme preconizado por OUYANGET et al,2003 e HERMANNET et al, 2002.

Dados sobre a performance analítica (linearidade, resolução, recuperação, limite de quantificação e detecção, reprodutibilidade, sensibilidade e seletividade) serão estabelecidos através de processo de validação a ser realizado no Laboratório de Análises Toxicológicas–NEPET-UFG, obedecendo às normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) à partir da Resolução 899/2003.

4. Resultados :

Inicialmente foram testadas diferentes concentrações de fase móvel para obtenção de um tempo de retenção para uma análise que nos permita realizar um ensaio para resultados num mesmo dia. Com a proporção de Água:Acetonitrila (65:35) temos um tempo de retenção de aproximadamente 4,32 minutos para a ciclosporina A (Csa) e 2,21 minutos para o padrão interno. Estão sendo testadas técnicas de extração daciclosporina, para melhorarmos a recuperação do padrão interno a validarmos a técnica.

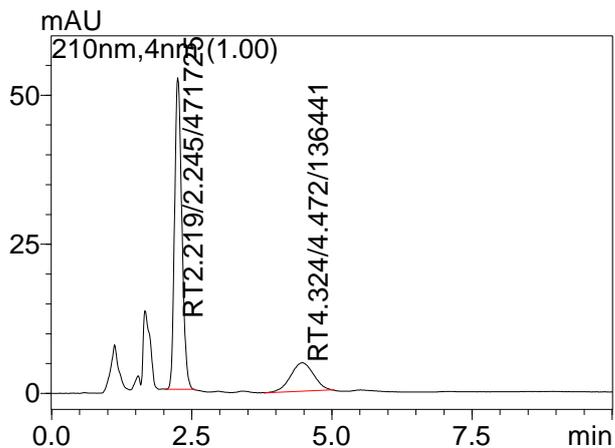


Figura 01: Csa 400ng/ml e IS 10000ng/ml
 Temperatura do forno de coluna 50°C, FM (fase móvel) Água:Acetonitrila (65:35). TR Csa: 4,324;
 Área Csa: 136441 TR IS: 2,0219 Área IS: 471725, fluxo de 0,7ml/min, coluna 10x4,6mn.

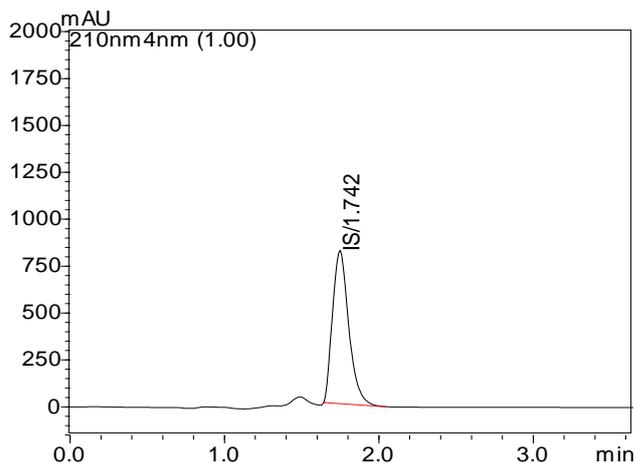


Figura 02: IS 50mcg/ml. Temperatura do forno de coluna 70°C, FM (fase móvel)
 Água:Acetonitrila:Metanol (40:40:20). TR IS(cetoconazol): 1,742min, fluxo de 1,0ml/min,coluna
 10x4,6mn.

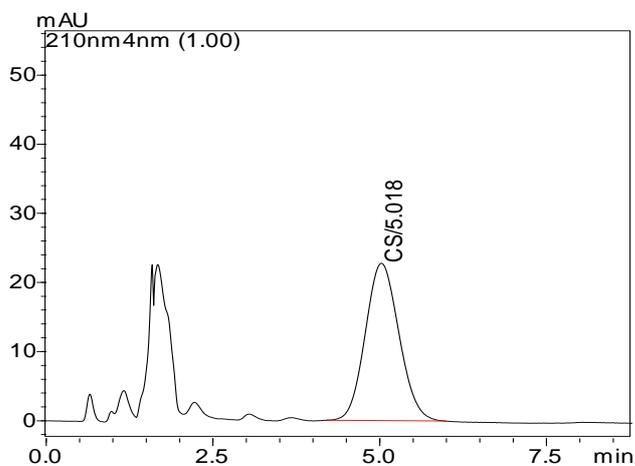


Figura 03: Csa 10000ng/ml Temperatura do forno de coluna 50°C, FM (fase móvel) Água:Acetonitrila
 (55:45). TR Csa: 5.018min; fluxo de 0,7ml/min, coluna 10x4,6mn.

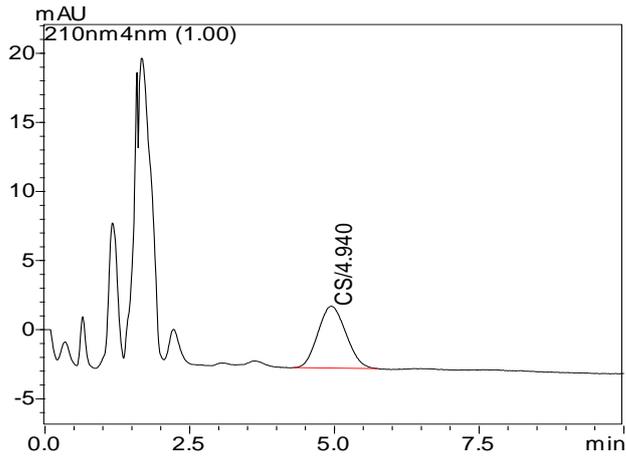


Figura 04: Csa 2000ng/ml Temperatura do forno de coluna 50°C, FM (fase móvel) Água:Acetonitrila (55:45). TR Csa: 4,940; Área Csa: 150146,fluxo de 0,7ml/min, coluna 10x4,6mn.

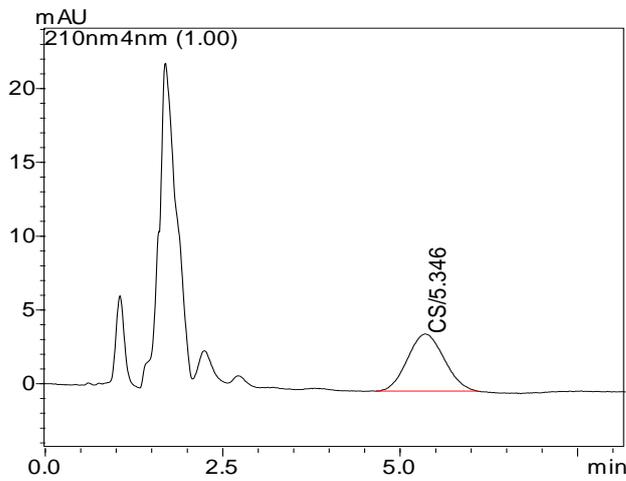


Figura 05: Csa 2000ng/ml e IS 15000ng/ml Temperatura do forno de coluna 50°C, FM (fase móvel) Água:Acetonitrila (65:35). TR Csa: 5,346; TR IS (carbamazepina): 2,0219, fluxo de 0,7ml/min, coluna 10x4,6mn.

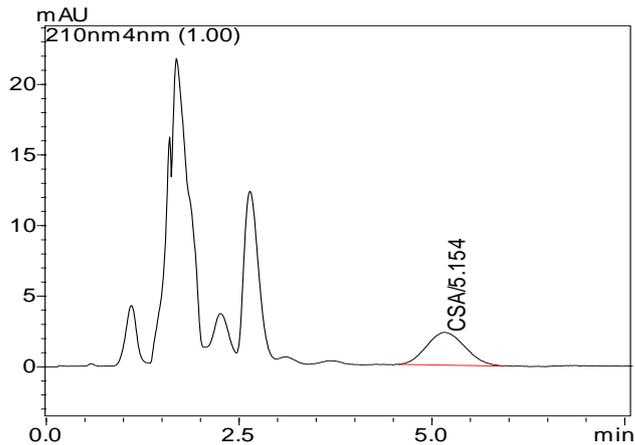


Figura 06: Csa 1000ng/ml e IS(zolpiden) 3200ng/ml Temperatura do forno de coluna 50°C, FM (fase móvel) Água:Acetonitrila (65:35). TR Csa: 5,154; TR IS: 1,989, fluxo de 0,7ml/min, coluna 10x4,6mn.

5. Discussão:

Hermann et al, 2002 relata que as tentativas recentes de ajuste de condições cromatograficas baseada nos dados farmacocinéticos da ciclosporina estão relacionados a maiores chances de sucesso de validação da tecnica analitica em detector PDA.A partir de tal conhecimento, poder-se-á traçar um paralelo entre as concentrações obtidas e a manifestação de sinais e/ou sintomas de reações adversas, bem como buscar explicações para problemas relacionados ao medicamento, e a toxicidade (e.g.: interação medicamentosa, qualidade da adesão ao tratamento (não-adesão, adesão parcial, adesão completa), dose inadequada, qualidade do medicamento, erros de prescrição).

O conhecimento teórico e pratico obtido, assim, estabelecerá parâmetros confiáveis para executar intervenções para promover a farmacoterapia racional e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

6. Referências Bibliográficas:

B. VOLLENBROEKER, J.-H. KOCH, M. FOBKER, B. SUWELACK, H. HOHAGE, AND U. MÜLLER Determination of Cyclosporine and Its Metabolites in Blood via HPLC-MS and Correlation to Clinically Important Parameters. **Transplantation Proceedings**, v. 37, 2005. p. 1741–1744.

BALDELLI, S.; ZENONI, S.; MERLINI, S.; PERICO, CATANNEO D. Simultaneous determination of everolimus and cyclosporine concentrations by HPLC with ultravioleta detection. **Clinica Chimica Acta**, v.364, 2006. p.354-358.

BRASIL. **ANVISA**. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 22 abr. 2009.

CATTANEO D., ZENONI S., MURGIA S., MERLINI S., BALDELLI S., PERICO N., GOTTI E., (...), REMUZZI G. Comparison of different cyclosporine immunoassays to monitor C0 and C2 blood levels from kidney transplant recipients: Not simply overestimation. **Clinica Chimica Acta**, v.355 (1-2), 2005. p. 153–164.

HALLWORTH, M. & CAPPS, N. - **Therapeutic drug monitoring**, Clinical Biochemistry in Medicine, ACB Venture Publications, London, 1993.

HERMANN, M. ; CHRISTENSEN, H. ; REUBSEAT, J.L.E., Evaluation of essential parameters in the chromatographic determination of cyclosporine A and metabolites using a D-optimal desing. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30,2002, p.1263-1276.

OUYANG, J.; BAEYENS, W.R.G.; DUAN, J.; DELANGHE,J. Improvement of cyclosporine A determination in whole blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography.**Biomedical Chromatography**, v.17, 2003, p. 404-410.

PESTANA, M. JOSÉ OSMAR. Análise de ensaios terapêuticos que convergem para a individualização da imunossupressão no transplante renal. **Med on line**, 2002. p. 1-195.