

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ASSOCIATED FACTORS OF EFAVIRENZ PLASMA LEVELS
IN HIV-POSITIVE INDIVIDUALS WITH VIRAL SUPPRESSION**

JULIA POETA WEYH

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

Dissertação de Mestrado

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ASSOCIATED FACTORS OF EFAVIRENZ PLASMA LEVELS
IN HIV-POSITIVE INDIVIDUALS WITH VIRAL SUPPRESSION**

JULIA POETA WEYH

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Sprinz

A apresentação desta dissertação é requisito do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Dissertação de Mestrado

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Poeta, Julia

Factors Influencing Efavirenz Plasma Levels and its Relation to Dyslipidemia/
Julia Poeta Weyh; orient. Jorge Pinto Ribeiro – Porto Alegre, 2010.

f.: il.

Dissertação (Mestrado), apresentada à faculdade de Medicina de
Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Orientador: Ribeiro, Jorge Pinto.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família, pelo amor e carinho de sempre e por mostraram-me os verdadeiros valores da vida.

A minha irmã Débora por seu carinho e apoio nos momentos de maior dificuldade.

Ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, orientador que possibilitou a realização desse trabalho mesmo não sendo da sua especialização. Obrigada pela confiança depositada em mim e no meu projeto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Sprinz, orientador e estimulador do meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Rafael Linden, co-orientador que me estimulou e me orientou desde a origem do projeto, na especialização.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas por fazerem parte desta jornada tão importante em minha vida.

À equipe da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas pelas atividades de apoio e orientação à realização das disciplinas.

Aos residentes da infectologia que me auxiliaram na seleção dos pacientes e na discussão de dúvidas.

Aos amigos queridos dos Laboratórios Lafont e Unilab que entenderam e apoiaram a minha decisão de afastamento para dedicar-me mais ao mestrado.

A maravilhosa equipe de trabalho do Serviço de Infectologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

E, finalmente às minhas amigas do coração Giovanna Vietta e Liliane Todeschini de Souza, por toda parceria, compreensão e apoio nas horas mais difíceis tanto na execução deste trabalho quanto na minha vida pessoal.

Às demais pessoas que contribuíram e incentivaram de alguma forma a realização deste trabalho; a todos o meu mais sincero obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 O TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV.....	14
2.2 FARMACOCINÉTICA DOS ANTIRRETROVIRAIS.....	17
2.3 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE ANTIRRETROVIRAIS.....	20
2.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A APLICAÇÃO DO MTF	22
2.5 APLICAÇÃO DO MONITORAMENTO DE FÁRMACOS NA TARV	24
2.6 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 GERAL.....	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4. ARTIGO I	37
5. ARTIGO II	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
7. ANEXOS	75
7.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	75
7.2 QUESTIONÁRIO.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ART</i>	Antiretroviral therapy
<i>ARVs</i>	Antirretrovirais
<i>ATV</i>	Atazanavir
<i>BMI</i>	Body mass index
<i>CLAE</i>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>CNS</i>	Central nervous system
<i>CYP</i>	Citocromo P450
<i>EFV</i>	Efavirenz
<i>HAART</i>	Highly active therapy
<i>HCPA</i>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<i>HIV</i>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>HPLC</i>	High-performance liquid chromatography
<i>IDV</i>	Indinavir
<i>IFs</i>	Inibidores de fusão
<i>IPs</i>	Inibidores da protease
<i>ITRNNs</i>	Inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos
<i>ITRNs</i>	Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos
<i>LPV</i>	Lopinavir
<i>MTF</i>	Monitoramento terapêutico de fármacos
<i>NFV</i>	Nelfinavir
<i>NNRTI</i>	Non-nucleoside reverse transcriptase
<i>NVP</i>	Nevirapina/ nevirapine
<i>OMS</i>	Organização Mundial da Saúde

<i>PIs</i>	Protease inhibitors
<i>RTV</i>	Ritonavir
<i>SIDA</i>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<i>SNC</i>	Sistema nervoso central
<i>SQV</i>	Saquinavir
<i>TARV</i>	Terapia antirretroviral
<i>TDM</i>	Therapeutic drug monitoring
<i>UPLC</i>	Ultra-performance liquid chromatography

RESUMO

A mortalidade de pacientes portadores do HIV tem diminuído drasticamente desde a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) são 33,4 milhões de pessoas infectadas e, no Brasil, estima-se que cerca de 630 mil pessoas vivem com HIV ou SIDA.

A terapia antirretroviral atual utiliza a combinação de três antirretrovirais (ARVs) que podem pertencer a duas ou três das seguintes classes: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos / nucleotídeos (ITRNs), inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNNs) e inibidores da protease do HIV (IPs). Embora a atual terapia antirretroviral tenha modificado significativamente a história natural do HIV, uma alta evidência de falhas terapêuticas ainda é observada em esquemas atualmente utilizados.

Recentemente, a atenção tem se focado na importância da concentração plasmática de ARVs e, também, no fato de que as concentrações inadequadas do fármaco podem colaborar significativamente para a ineficácia do tratamento. Concentrações abaixo do intervalo terapêutico estão sendo associadas com a diminuição da resposta virológica e com o aumento de resistências isoladas e, concentrações acima desse intervalo estão sendo associadas ao surgimento de efeitos adversos. Com o objetivo de impedir a falha na utilização da terapia, tem sido indicado o monitoramento terapêutico de fármacos (MTF), na medida em que determina as concentrações

plasmáticas fora da faixa terapêutica, detecta a dosagem incorreta e/ou a falta de adesão e, também, pode ser uma ferramenta útil na administração da toxicidade do fármaco.

O Efavirenz (EFV), um ITRNN, está entre os ARVs mais amplamente utilizados. Em geral, é bem tolerado e possui uma meia-vida plasmática prolongada, uma baixa barreira genética e uma alta variabilidade interpaciente nos níveis plasmáticos. Entre os principais efeitos adversos relacionados à utilização do EFV estão as alterações neurológicas, a dislipidemia e o desenvolvimento de resistência após a descontinuação do tratamento. No entanto, a baixa barreira genética e a alta variabilidade plasmática entre indivíduos favorecem uma alta ocorrência de resistências fenotípicas, o que justifica a análise das concentrações plasmáticas deste fármaco através da utilização do monitoramento terapêutico.

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico sensível de detecção e quantificação, por cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC), capaz de medir as concentrações plasmáticas do EFV e, assim, associá-las com características demográficas e com o desenvolvimento de dislipidemia numa coorte de pacientes em terapia antirretroviral.

Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as principais características demográficas e as concentrações plasmáticas de EFV. No entanto, houve uma relação inversa e significativa entre as concentrações de EFV e o peso e o índice de massa corporal (IMC). Encontramos uma alta variabilidade nas concentrações plasmáticas de EFV, embora a maioria das concentrações plasmáticas de EFV estar dentro do intervalo terapêutico.

Contudo, ensaios clínicos maiores ainda são necessários para investigar melhor a concentração plasmática de EFV e os desfechos clínicos.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é uma pandemia mundial e, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) são 33,4 milhões de pessoas infectadas.¹ O acesso global a terapia antirretroviral (TARV) tem aumentado rapidamente nos últimos anos em países em desenvolvimento, onde 3 milhões de 9,7 milhões de pacientes infectados estão atualmente recebendo TARV.^{2,3} No Brasil, estima-se que cerca de 630 mil pessoas vivem com HIV ou SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), com prevalência da infecção de 0,61% entre a população de 15 a 49 anos.⁴

A TARV melhora a sobrevida e reduz as taxas de complicações da SIDA entre indivíduos infectados com HIV.^{5,6} Embora essa atual terapia tenha modificado significativamente a história natural da infecção pelo HIV, uma incidência elevada de falhas terapêuticas ainda é observada nos esquemas atualmente utilizados. Isso pode ser explicado pelos diferentes níveis plasmáticos dos antirretrovirais (ARVs) nos indivíduos submetidos a essa terapia, nos quais existe uma relação clara entre os níveis plasmáticos do fármaco e sua efetividade clínica. Então, quanto mais distante a concentração plasmática desses fármacos estiver dos níveis terapêuticos, maiores serão as taxas de falha virológica, e, quanto mais próximo da concentração ideal se chegar, menores serão as chances dessa falha ocorrer.^{7,-11} Além disso, o surgimento de algumas variantes a essa terapia também pode provocar a falha virológica como: adesão inadequada da TARV, interação com outros fármacos coadministrados (principalmente, neuro e nefrotóxicos) e interação com

alimentos que podem alterar a biodisponibilidade dos ARVs (através de mudanças no pH gástrico e nas taxas de metabolismo – absorção e eliminação).⁶ Consequentemente, poderá ocorrer modificação da concentração plasmática dos ARVs, reduzindo sua ação e limitando a eficácia e a durabilidade do tratamento.^{2,6,12,13}

Com o objetivo de impedir a falha na utilização da terapia, tem sido indicado o monitoramento terapêutico de fármacos (MTF), na medida em que determina as concentrações plasmáticas fora da faixa terapêutica, detecta a dosagem incorreta e/ou a falta de adesão e, também, pode ser uma ferramenta útil na administração da toxicidade do fármaco.⁹

Esta revisão bibliográfica tem como objetivo fornecer uma análise crítica e abrangente da literatura, apresentando os dados obtidos com a utilização do MTF e as perspectivas futuras da sua utilização para que os indivíduos em TARV possam usufruir, de forma mais eficaz, dos benefícios dessa terapia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O tratamento da infecção pelo HIV

O principal objetivo da TARV é alcançar e manter a carga viral indetectável (< 50 cópias/mL),¹⁴ e minimizar os riscos de danos clínicos e imunológicos e a probabilidade de desenvolvimento de resistências do HIV à TARV.^{6,15}

A TARV atual utiliza a combinação de três antirretrovirais (ARVs) que podem pertencer a duas ou três das seguintes classes: 1) Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/ nucleotídeos (ITRNs). 2) Inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNNs). 3) Inibidores da protease do HIV (IPs).¹⁶ A dose única e a boa tolerância geral permitiram que a nevirapina (NVP) e o efavirenz (EFV) se tornassem componentes importantes dos regimes TARV, tendo muitas vezes prioridade em relação aos regimes contendo IPs.^{14,17}

Ao longo dos últimos anos, novas classes de fármacos foram desenvolvidas para pacientes que falharam ou não toleraram seus esquemas antirretrovirais. Entre elas e o seu principal componente, podemos destacar o Enfuvirtida (inibidor de fusão), o Raltegravir (inibidor da integrase) e o Maraviroc (antagonista do CCR5).⁶ Desde a introdução de novos fármacos e de novas classes de fármacos, a eficácia da TARV tem aumentado significativamente.^{2,18} Entretanto, a toxicidade dos fármacos ARVs representa,

atualmente, o maior obstáculo para o sucesso do tratamento em uma proporção relevante de pacientes.^{6,18}

Entre os principais fatores envolvidos na toxicidade da TARV estão: nefrotoxicidade, resistência à insulina, fatores de riscos cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, dislipidemia, obesidade central e a síndrome metabólica que é complexa e envolve uma série de fatores (os efeitos diretos da TARV no metabolismo lipídico, na função das células endoteliais e na dos adipócitos, e na disfunção mitocondrial).^{1,19-21} Além desses fatores medicamentos ARVs, em particular os ITRNs e o EFV, estão associados a neurotoxicidade periférica e sintomas e alterações psicológicas.^{9,20}

As principais diretrizes estabelecem que o tratamento inicial do HIV deve incluir 2 ITRNs e 1 ITRNNs ou 2 ITRNs e 1 IP (com a adição de ritonavir (RTV)).^{14,22,23} A decisão entre ITRNN ou IP para iniciar o tratamento dependerá da clínica e das características individuais, assim como das vantagens ou desvantagens que estes fármacos podem ter para o paciente (eficácia, perfil de segurança, barreira genética, complexidade da administração).¹⁵

A associação IP com RTV (IP/r) proporciona níveis sanguíneos dos IPs mais elevados e estáveis, e por tempo mais prolongado; além de um menor risco de mutações que confirmam resistência viral. Por outro lado, a ocorrência de dislipidemias é mais frequente envolvendo esquemas com IP/r, quando comparados a associações que envolvem ITRNNs, particularmente ao EFV.²⁴ As associações atazanavir + RTV (ATV/r) e lopinavir + RTV (LPV/r) estão relacionadas, respectivamente, à icterícia e a dificuldade de adesão em longo prazo e eventos adversos, principalmente, metabólicos.^{23,24}

Esquemas que utilizam 2 ITRNs + ITRNN facilitam a adesão ao tratamento, pois são de posologia mais simples, apresentam tempo de supressão viral mais prolongado e, de modo geral, possuem um menor perfil toxicidade. Portanto, os esquemas com ITRNNs são preferenciais na terapia inicial. Porém, em alguns casos, há risco de falha terapêutica devido à sua baixa barreira genética, e quando isso ocorre, o esquema terapêutico deve ser trocado o mais rápido possível. Entre os principais efeitos adversos relacionados aos ITRNNs estão as alterações no SNC, associadas ao EFV e a presença de hepatotoxicidade relacionada à NVP.^{16,23}

As diversas alterações que ocorrem no tratamento com ARVs podem ser explicadas pela farmacocinética de fármacos coadministrados e pela grande variabilidade farmacocinética intra e interindividual.^{11,13,19}. Essa variabilidade relativamente alta poderia ser contornada através da possibilidade de monitorar as concentrações plasmáticas de cada indivíduo, de uma melhor adesão a TARV, e de um controle nutricional. Esse último se justifica pelo fato da possibilidade de interação de alguns alimentos com o fármaco administrado, de modo a aumentar ou diminuir sua absorção.²⁵

A possibilidade de monitorar essas concentrações permite o ajuste das doses dos ARVs de modo a evitar níveis fora dos limites terapêuticos. Enquanto as concentrações subterapêuticas dos ARVs podem contribuir para a falência virológica em pacientes infectados com o HIV; as tóxicas podem levar ao desenvolvimento de resistência e efeitos adversos indesejáveis. Portanto, para melhorar a adesão e a qualidade de vida do indivíduo HIV- infectado, o monitoramento das concentrações plasmáticas dos ARVs está se tornando

cada vez mais utilizável na prática clínica, a fim de determinar a melhor dosagem adaptada a cada indivíduo.^{18,26,27}

2.2 Farmacocinética dos antirretrovirais

A farmacocinética visa conhecer e avaliar os processos de absorção, distribuição e eliminação de um medicamento dentro do organismo, além de verificar como esses parâmetros variam com o tempo.¹⁶ O perfil farmacocinético dos ARVs se caracteriza por uma grande variabilidade inter e intrapaciente, o que vai depender da biodisponibilidade do fármaco no organismo, assim como do potencial de interações medicamentosas, já que a TARV se caracteriza pela ingestão de vários fármacos concomitantemente.^{11,16}

Porém, indivíduos infectados pelo HIV estão susceptíveis a disfunções metabólicas (hepáticas, renais), cardíacas e a uma série de infecções oportunistas. Com isso, além da utilização da TARV, esses pacientes serão tratados com várias medicações de diferentes perfis farmacocinéticos.^{11,16}

Portanto, no tratamento do vírus do HIV, a avaliação da interação farmacológica é de grande importância. Isso ocorre quando dois ou mais fármacos são administrados simultaneamente e metabolizados pela mesma enzima. Como a maioria dessas interações farmacológicas é devida às enzimas do CYP (citocromo P450), torna-se importante determinar a especificidade da enzima que metaboliza determinado fármaco, a fim de evitar a administração simultânea de outros fármacos que sejam metabolizados pela mesma enzima.^{16,28,29}

A indução das enzimas do CYP em humanos pode ser avaliada pelo aumento do RNAm, pelas proteínas ou pela atividade enzimática de uma CYP específica. Os níveis de equilíbrio dessas enzimas podem ser alterados por fatores ambientais.⁹ No entanto, essas alterações fenotípicas no metabolismo dos fármacos também são observadas em grupos de pacientes geneticamente predispostos a reações adversas aos fármacos, tendo em vista as diferenças farmacogenéticas na expressão das enzimas metabolizadoras dos fármacos.^{6,29} A maioria dessas enzimas apresenta diferenças polimórficas em sua expressão, que resultam em alterações hereditárias na estrutura dos genes. Assim, é essa interação de fatores genéticos e epigenéticos que determina a resposta do indivíduo ao indutor.^{16,28}

Uma importante interação dos ITRNs é com a metadona, cujas concentrações plasmáticas seriam aumentadas na presença de ritonavir. Outros fármacos como o ácido valpróico, o fluconazol, a rifampicina e o trimetoprim, também alteram o metabolismo dos ITRNs.^{11,28}

Na interação dos ITRNNs, existem diferentes efeitos na modulação do CYP.³⁰ Enquanto a NVP é um indutor, o EFV é um misto de indutor e inibidor da CYP3A4. Porém, o EFV é metabolizado, principalmente, pela CYP2B6 e em menor grau pela CYP3A4.^{6,14,30} Apesar de a maioria dos estudos de interações farmacológicas com o EFV demonstrar seus efeitos nos substratos das CYP3A4 e CYP2B6, existem outros que indicam que o ITRNN também pode inibir a CYP2C9 e a CYP2C19.³⁰⁻³² Roberson *et al.* analisaram a coadministração de fenitoína e de EFV, resultando na elevação dos níveis plasmáticos daquela, o que foi atribuído a inibição da CYP2C9 e da CYP2C19 que são mediadoras do metabolismo da fenitoína.³² Por outro lado, o EFV

reduziu a área acima da curva de concentração do voriconazol para 80% e o pico de concentração para próximo de 66%. Essa diminuição substancial foi, indiscutivelmente, atribuída pelos autores a indução da CYP2C9 e da CYP2C19 pelo EFV.³¹ As interações medicamentosas na farmacocinética constituem, portanto, um importante aspecto nessa classe de compostos, principalmente por possuírem, como os IPs, uma estreita janela terapêutica, podendo representar uma toxicidade potencial.^{14,28,29}

Os IPs são compostos por proteínas que podem induzir ou inibir várias enzimas e são metabolizados na sua maior extensão pela CYP3A4, que é a forma predominante do citocromo P450.⁶ A rifampicina é um potente indutor da CYP3A4 e pode reduzir as concentrações dos IPs. Em situações em que a combinação de rifampicina e IPs é inevitável, faz-se necessário o ajuste da dose de ambos, além do monitoramento das concentrações de IPs para reduzir o potencial de falha virológica. O mesmo ocorre com outros indutores da enzima do CYP, como fenitoína, fenobarbital e carbamazepina, as quais podem reduzir as concentrações de IPs, ou mesmo ter sua própria farmacocinética alterada.^{11,16}

Assim, o MTF é proposto quando existir uma suspeita de interação farmacológica prejudicial ao paciente, quando uma esperada resposta virológica não ocorrer, ou quando efeitos adversos surgirem, resultantes de toxicidade plasmática de determinada interação. Portanto, a utilização do MTF é uma ferramenta útil em casos de falência terapêutica ou toxicológica da TARV.^{14,19,33}

2.3 Monitoramento terapêutico de antirretrovirais

O objetivo do monitoramento terapêutico de fármacos é dosar a concentração do fármaco para controlar os níveis dos medicamentos no plasma do paciente e otimizar seus efeitos.³³ Porém, ocorre uma grande variação entre indivíduos na relação dose e resposta e, com isso, fica difícil de encontrar uma dose única para uma mesma resposta. Por exemplo, fármacos com intervalos terapêuticos limitados e indivíduos com uma grande variação na farmacocinética podem fazer com que uma dose seja terapêutica para um indivíduo e, ao mesmo tempo, tóxica para outro. É nessas situações que o monitoramento terapêutico torna-se uma parte essencial do tratamento clínico.³⁴

Tendo em vista que as terapias com multifármacos se tornaram padrão para o tratamento da infecção pelo HIV e que novos agentes antirretrovirais têm surgido a todo o momento, os processos analíticos para isolar e dosar cada fármaco são cada vez mais necessários.^{6,34}

A medida da concentração dos ARVs pode fornecer informações importantes, contribuindo significativamente para o sucesso do tratamento devido à concentração-resposta e à concentração-toxicidade dadas pelos IPs e ITRNs do HIV.^{19,35,36} Especialmente para os IPs, uma importante variação interpaciente foi encontrada na concentração plasmática dos fármacos, cujo regime de dosagem era fixo.³⁷

Para os ITRNs não há recomendação para MTF, pois eles requerem uma etapa de fosforilação intracelular para se tornarem ativos, e concentrações

intracelulares de fármacos fosforilados não fazem correlação com concentrações plasmáticas.^{17,33,37} Porém, monitorar as concentrações plasmáticas de ITRNs poderia ser útil para avaliação e controle de interações medicamentosas que afetassem a concentração plasmática dos ITRNs.³³

Já para os ITRNNs, estudos farmacocinéticos indicam que o EFV e a NVP possuem meia-vida prolongada, concentrações plasmáticas estáveis durante o intervalo de dosagem, e farmacocinéticas com menor variação do que os IPs.^{20,24,38} Assim, podemos observar a importância do monitoramento dos ITRNNs em algumas circunstâncias, como, na presença de efeitos adversos, na suspeita de interação entre fármacos ou na adição de novos fármacos num esquema em que há falha virológica. Nesse caso, deve-se considerar de grande importância o potencial de interação desta combinação.^{33,35,38} Com isso, o MTF tem apresentado um aumento na eficácia e uma redução na toxicidade dos ARVs.^{18,19,33}

O MTF pode ser de grande relevância em algumas situações específicas: em pacientes com significantes interações fármaco-fármaco ou fármaco-nutriente, com alterações fisiopatológicas que possam prejudicar o sistema gastrointestinal, hepático ou a função renal, com concentrações tóxico-dependentes, em tratamento-experiência com redução da susceptibilidade da TARV, na utilização de mudanças de dosagem cuja eficácia e segurança não estão bem estabelecidos na clínica, em resposta virológica inesperada em pacientes com tratamento inicial, em monitoração da aderência e, finalmente, para o controle do tratamento de gestantes e crianças.^{14,23,33}

Para a eficácia do MTF algumas condições devem ser seguidas: a coleta da amostra deve ser realizada quando a concentração do fármaco estiver

estável ou o mais próximo possível do vale; no entanto, se houver suspeita de toxicidade, a dosagem deve ser feita assim que possível.^{11,33} Existem alguns critérios que também devem ser levados em consideração, como: o horário da coleta, a via e a dose ingerida na última administração, o tempo de tratamento e os medicamentos ingeridos concomitantemente.^{11,16,33,34} Além disso, a adesão ao tratamento e a variabilidade na farmacocinética individual – organismos que podem produzir respostas diferentes a um mesmo tratamento – podem ser fatores limitantes para que a dosagem seja eficaz.^{11,34,38}

2.4 Métodos cromatográficos utilizados para a aplicação do MTF

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes semelhantes de misturas complexas. Desta forma, essa técnica pode ser considerada um método físico-químico de separação onde os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma estacionária e outra móvel.³⁹

Para monitorar o tratamento de pacientes em TARV, vários estudos descrevem a utilização e/ou o desenvolvimento e a validação de métodos para a determinação quantitativa e simultânea de ITRNNs e de IPs.^{7,9,10,13,15,19-21,25,32,35,36,40} Um dos mais utilizadas é a CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), que além das vantagens de eficiência na separação, rapidez e simplicidade, permite a separação e quantificação de diferentes fármacos em uma única análise.^{39,41}

Muitos métodos utilizando a CLAE têm sido publicados. A maioria desses métodos utiliza UV^{9,19-21,25,26,40,42,43} ou espectrometria de massa.^{13,32,44,45} Protocolos com detectores espectrofotométricos estão livres dos

efeitos da ionização matriz observados na espectrometria de massa e podem, também, fornecer informações específicas do espectro através de detectores de arranjo de diodos. Além dessas vantagens, a necessidade de separação cromatográfica completa de todos os compostos geralmente utilizada determina longas corridas analíticas, levando a uma baixa produção e ao alto consumo de solventes e, por consequência, a uma produção considerável de resíduos químicos.^{39,41}

Espectrometria de massas (CLAE-EM, do inglês – HPLC-MS): no detector CLAE-EM os componentes da amostra são ionizados por meio de um bombardeamento de feixe de elétrons. Esse impacto quebra a molécula formando um conjunto de fragmentos carregados positivamente que são separados de acordo com a sua massa ao atravessar um campo magnético. Pode ser utilizado para confirmar conclusivamente a identidade de uma substância. A principal vantagem desse método é que a amostra não precisa estar pura e vários compostos podem ser identificados numa mesma análise. Por outro lado, uma das desvantagens é que certos isômeros apresentam o mesmo espectro de massas, dificultando a sua diferenciação.^{39,41}

Detecção Ultravioleta (CLAE-UV, do inglês – HPLC-UV): possui maior poder e velocidade de separação cromatográfica, além de boa linearidade, precisão e sensibilidade. Na CLAE-UV não há degradação térmica nem a amostra precisa ser volátil, entretanto, há uma forte dependência da polaridade do soluto.⁴¹

Uma alternativa aos métodos convencionais da CLAE é a cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE, do inglês ultra-performance liquid chromatography – UPLC) que pode tornar as separações mais rápidas e

sensíveis, mantendo as vantagens e a confiabilidade dos métodos de detecção UV para dosar fármacos ARVs.^{39,41}

2.5 Aplicação do monitoramento de fármacos na TARV

O fato de concentrações plasmáticas dos fármacos estarem correlacionadas com efeitos dos ARVs está comprovado em vários estudos, entre os quais podemos destacar os seguintes: Colombo *et al.*,²⁵ Rendón *et al.*,²⁶ Titier *et al.*⁴⁶ e Gieschke *et al.*⁴⁷, avaliaram a variabilidade interindividual através de concentrações de ITRNNs e de IPs; além do Marzolini *et al.*⁷ que incluíram 1145 amostras de 97 pacientes e destas um quarto apresentavam-se em concentrações subterapêuticas. Esses estudos foram de grande similaridade nos resultados, já que encontraram concentrações variáveis e fora da janela terapêutica numa significativa proporção de ARVs.

Outro forte candidato ao MTF é o ATV (atazanavir), já que sua utilização tem aumentado muito, além de ele possuir uma variabilidade farmacocinética considerável e uma meia-vida prolongada. Esses dois experimentos do ATV – com outros IPs mais o EFV⁴⁹ e em monoterapia²⁶ – encontraram uma rápida emergência de resistência antirretroviral através do uso de concentrações abaixo do recomendado. Outro estudo²⁵ demonstra que pacientes com níveis de ATV maiores que 0,85 µg/mL (intervalo terapêutico do ATV é de 0,15 a 0,85 µg/mL – tabela 1) apresentaram três vezes mais o risco de hiperbilirrubinemia do que os pacientes que estavam dentro das concentrações recomendadas, e aqueles cujos níveis estavam abaixo deste intervalo (<0,15 µg/mL) em praticamente metade dos pacientes e que não constava RTV no esquema

conduziram para níveis subterapêuticos. No entanto, nenhum paciente que continha RTV no tratamento estava abaixo desse intervalo²⁵.

Como o EFV é um dos ITRNNs mais utilizados na TARV, muitos estudos, relacionando o MTF e a farmacocinética desse antirretroviral, têm sido realizados.^{7,23,27,51} A recomendação é que o intervalo terapêutico de concentração esteja entre 1,0 e 4,0 µg/mL (tabela 1).

Os estudos de López-Cortés *et al.*²⁰ e Leth *et al.*⁴⁰ encontraram relação entre concentração plasmática de EFV e o índice terapêutico. Enquanto Leth *et al.*⁴⁰ observaram falha quando as concentrações estavam abaixo do recomendado (no caso, < 1,1 µg/mL), e uma probabilidade considerável de sucesso na terapia daqueles com concentrações > 1,1 µg/mL. No primeiro estudo houve uma baixa correlação entre os níveis plasmáticos de EFV e a eficácia do tratamento, embora outros fatores adicionais possivelmente influenciaram nos resultados deste estudo, como a heterogeneidade da população estudada e a utilização concomitante de outros fármacos.

Nettles *et al.*¹⁹ não encontraram correlação significativa entre as concentrações de EFV e IPs. Essa falta de correlação poderia ser associada às diferentes rotas de metabolismo desses fármacos (principalmente pela CYP2B6 para EFV e pela CYP3A4 para IPs). Também, o EFV tem uma significativa meia-vida de eliminação em média de 49 horas, enquanto que os IPs estudados têm meia-vida de 3 a 10 horas. Contudo, a biodisponibilidade do EFV não foi significativamente alterada pela alimentação, diferente de todos os IP utilizados neste estudo.¹⁹

Alguns estudos modificam a dose dos fármacos de acordo com os resultados do MTF. O de van Luin *et al.*¹⁰ utilizaram amostras de pacientes em

terapia com EFV (600 mg/dia) cujas concentrações plasmáticas eram $\geq 4,0$ $\mu\text{g/mL}$ e reduziu as concentrações de EFV de 600 para 400 mg/dia de um grupo, o que resultou em uma diminuição de 41% da média da concentração plasmática de EFV. Este concluiu que a incidência de efeitos adversos induzida pelo EFV interrompeu o tratamento em 11,5% dos pacientes que continuaram com a dose padrão, contra 2,3% dos que tiveram a dose reduzida. A redução da dose preveniu, significativamente, a interrupção do tratamento em pacientes cuja toxicidade foi induzida por altos níveis de EFV, considerando que a eficácia virológica não foi comprometida. Outros dois estudos com pacientes em TARV inicial (com os IPs IDV (indinavir) e o NFV) relatam que concentrações plasmáticas monitoradas e ajustadas, quando necessário, apresentaram uma resposta virológica melhor e com menos toxicidade do que as concentrações que não foram monitoradas.^{52,53}

Rendón *et al.*²⁶ confirmam que o MTF pode ser de grande importância no controle da TARV quando analisaram amostras de IPs e ITRNNs de pacientes portadores de HIV. As razões para a monitoração foram: toxicidade (59%), falência virológica (39%) e possíveis interações de fármacos (2%). Assim como o esperado, níveis acima da concentração terapêutica foram encontrados em 36% dos pacientes com suspeita de toxicidade, enquanto níveis subterapêuticos foram encontrados em 37% pacientes com suspeita de falência virológica. Considerando a NVP separadamente, mais de 60% dos indivíduos com suspeita de hepatotoxicidade apresentaram níveis plasmáticos elevados para este fármaco; já os níveis plasmáticos de EFV estavam elevados em 30% dos pacientes que apresentavam alterações no sistema nervoso central; e, a respeito dos IPs, 17% dos pacientes com hiperlipidemia, estavam

sendo tratados com LPV (lopinavir) e apresentavam altos níveis plasmáticos deste fármaco. Baseado nos resultados do MTF ocorreu modificação da dose ingerida em 37% dos pacientes, e correção das normalidades apresentadas em 80% dos casos. Neste estudo, o MTF ajudou a detectar níveis subterapêuticos de fármacos em mais de um terço dos pacientes em falência da terapia.

A toxicidade é um dos maiores efeitos adversos enfrentados por um grande número de pessoas que acaba interrompendo a TARV nas primeiras 45 semanas de tratamento.²⁶ Esta falta de adesão é um dos maiores problemas enfrentados, pois pode acarretar falha terapêutica.^{10,14,26}

Apesar de o perfil farmacocinético ser caracterizado por uma grande variabilidade inter e intraindividual, a mesma dose de ARV é atualmente administrada em todos os pacientes sem considerar essa variação. A individualização da dose, de um ou vários ARVs, baseado no MTF e na análise do perfil farmacocinético de uma determinada população de pacientes em TARV seria uma estratégia apropriada para otimizar o tratamento anti-HIV.²⁵

Como a maioria dos estudos citados ao longo do texto, o MTF antirretrovirais fornece informações relevantes entre as concentrações plasmáticas, a resposta virológica e a toxicidade, o que justifica a sua aplicabilidade para um melhor desempenho clínico dos pacientes.

2.6 Discussão e perspectivas

Podemos aplicar o MTF intervindo na educação do paciente como um todo, por exemplo, mudando o esquema, a dose, verificando a aderência ao tratamento e tentando evitar os efeitos adversos já relacionados. Pequenas

reduções nas concentrações plasmáticas dos ARV podem ser suficientes para a manutenção da supressão viral não ocorrer e promover falência no tratamento e, em consequência, o aparecimento de cepas virais resistentes. Por outro lado, altas concentrações desses ARV podem gerar efeitos adversos e/ou toxicidade. Logo, esta revisão tem apresentado, conforme retratado ao longo deste estudo, resultados considerados relevantes na prática clínica.

Somada à grande evolução individual da infecção e à complexidade do HIV, o desenvolvimento de novos fármacos, o acréscimo de novas informações sobre os agentes colocados no mercado, os dados gerados por ensaios clínicos, as decisões regulamentares em vigência e as recomendações atualizadas para o tratamento das doenças, coloca-nos em um estado de evolução contínua e rápida. Essa evolução nos remete a uma necessidade de adaptação e aplicação dessas mudanças para um melhor controle da doença.

TABELA 1: Valores Terapêuticos de Antirretrovirais para a aplicação do MTF

	Concentração Mínima	Concentração Máxima
Atazanavir	0,15	0,85
Indinavir	0,10	10,0
Lopinavir	4,0	7,0
Saquinavir	0,10	
Efavirenz	1,0	4,0
Nevirapina	3,0	

Valores em µg/mL.

Tabela baseada nos mais referenciados estudos envolvendo concentrações plasmáticas de antirretrovirais.^{26,33,51}

Abreviações: MTF: monitoramento terapêutico de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/pubfacts/en>; Acesso em Julho, 2010.
2. Wallis C, Sanne I, Venter F *et al.* Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **53**: 480–4.
3. UNAIDS. 2007 AIDS Epidemic Update. Available at: http://data.unaids.org/pub/EPIslides/2007/2007/_epiupdate_en.pdf. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2007. Accessed 30 July 2010.
4. <http://www.aids.gov.br/publicacao/recomendacoes-para-terapia-antirretroviral-em-adultos-infectados-pelo-hiv-2008>; Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – 2008; Acesso Julho, 2010.
5. Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M *et al.* Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *JAMA* 2008; **300**: 51–59.
6. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Research* 2010; **85**: 190–200.
7. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA *et al.* Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1- infected patients. *AIDS* 2001; **15**: 71-5.
8. Gallego L, Barreiro P, del Rio L *et al.* Analyzing sleep abnormalities in HIV-infected patients treated with efavirenz. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 430-2.
9. Wintergerst U, Hoffmann F, Jansson A *et al.* Antiviral efficacy, tolerability and pharmacokinetics of efavirenz in an unselected cohort of HIV-infected children. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; **61**: 1336-9.

10. van Luin M, Gras L, Clemens R *et al.* Efavirenz Dose Reduction Is Safe in Patients With High Plasma Concentrations and May Prevent Efavirenz Discontinuations. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; **52**: 240-5.
11. Rayner CR, Dooley MJ, Nation RL. Antivirals for HIV. In: Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ & Evans WE. *Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics. Principles of Therapeutic Drug Monitoring.* 4th ed. Baltimore, 2006; 354-409.
12. Phillips AN, Leen C, Wilson A *et al.* Risk of extensive virological failure to the three original antiretroviral drug classes over long-term follow-up from the start of therapy in patients with HIV infection: an observational cohort study. *Lancet* 2007; **370**: 1923–28.
13. la Porte CJL, Sabo JP, Béïque L *et al.* Lack of effect of efavirenz on the pharmacokinetics of tipranavir-ritonavir in healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; **53**: 4840-4.
14. Thompson MA, Alberg JA, Cahn P *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the international AIDS. *JAMA* 2010; **304**: 321-33.
15. Pérez-Elías MJ, Moreno A, Casado JL *et al.* Observational study to evaluate clinical outcomes after first-line efavirenz-or lopinavir-ritonavir-based HAART in treatment-naïve patients. *Journal of the International Associations of Physicians in AIDS Care* 2009; **8**: 308-13.
16. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro : *McGraw Hill*, 2007. Xxiv 1821 p. : il.
17. Bazzoli C, Jullien V, Le Tiec C *et al.* Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action. *Clin Pharmacokinet* 2010; **49**: 17-45.
18. Brown KC, Paul S, Kashuba ADM. Drug Interactions with New and Investigational Antiretrovirals. *Clin Pharmacokinet* 2009; **48**: 211-41.
19. Nettles RE, Kieffer TL, Parsons T *et al.* Marked intraindividual variability in antiretroviral concentrations may limit the utility therapeutic drug monitoring. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 1189–96.

20. López-Cortés LF, Ruiz-Valderas R, Marin-Niebla A *et al.* Therapeutic drug monitoring of efavirenz. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; **39**: 551-6.
21. Hugen PWH, Langebeek N, Burger DM *et al.* Assessment of adherence to HIV protease inhibitors: comparison and combination of various methods, including MEMS (electronic monitoring), patient and nurse report, and therapeutic drug monitoring. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **30**: 324-34.
22. Gazzard B, Bernard AJ, Boffito N, *et al.*, for the writing committee, British HIV Association. British HIV Association (BHIVA) guidelines for the treatment of HIV-Infected adults with antiretroviral therapy (2006). *HIV Med* 2006; **7**: 487-503.
23. <<http://www.aids.gov.br/search/apachesolrsearch/consenso%20hiv>> Acesso em jul. 2010.
24. Domingos H, Cunha RV, Paniago AMM *et al.* Metabolic effects associated to the highly active antiretroviral therapy (HAART) in AIDS patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2009; **13**: 130-6.
25. Colombo S, Buclin T, Cavassini M *et al.* Population pharmacokinetics of atazanavir in patients with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**: 3801-8.
26. Rendón A, Núñez M, Jiménez-Nácher I *et al.* Clinical benefit of interventions driven by therapeutic drug monitoring. *HIV Med* 2005; **6**:360–65.
27. Ray JE, Marriott D, Bloch MT & McLachlan AJ. Therapeutic drug monitoring of atazanavir: surveillance of pharmacotherapy in the clinic. *Br J Clin Pharmacol* 2005; **60**: 291–9.
28. Tang C, Lin JH, Lu AYH. Metabolism-based drug-drug interactions: what determines individual variability in cytochrome P450 induction? *Drug Metabolism and Disposition* 2005; **33**: 603-13.
29. Jones AE, Brown KC, Werner RE *et al.* Variability in drug metabolizing enzyme activity in HIV-infected patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; **66**: 475-85.

30. Soyinka JO, Onyeji CO. Alteration of pharmacokinetics of proguanil in healthy volunteers following concurrent administration of efavirenz. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; **39**: 213-8.
31. Liu P, Foster G, LaBadie RR *et al.* Pharmacokinetic interaction between voriconazole and efavirenz at steady state in healthy male subjects. *J. Clin. Pharmacol* 2008; **48**: 73-84.
32. Robertson SM, Maldarelli F, Natarajan V, *et al.* Efavirenz induces CYP2B6-mediated hydroxylation of bupropion in healthy subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2008; **49**: 513-9.
33. la Porte CJL, Back DJ, Blaschke T *et al.* Updated guideline to perform therapeutic drug monitoring for antiretroviral agents. *Reviews in Antiviral Therapy* 2006; **3**: 4-14.
34. Back DJ, Khoo SH, Gibbons SE *et al.* The role of therapeutic drug monitoring in treatment of HIV infection. *Br J Clin Pharmacol* 2001; **51**: 301-08.
35. Djabarouti S, Breilh D, Pellegrin I *et al.* Intracellular and plasma efavirenz concentrations in HIV-infected patients switching from successful protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy (HAART) to efavirenz-based HAART (SUSTIPHAR Study). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **58**: 1090-3.
36. Josephson F, Andersson MCH, Flamholc L *et al.* The relation between treatment outcome and efavirenz, atazanavir or lopinavir exposure in the NORTHIV trial of treatment-naïve HIV-1 infected patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; **66**: 349-57.
37. Keil K, Hochreitter J, DiFrancesco R *et al.* Integration of Atazanavir into an Existing Liquid Chromatography UV Method for Protease Inhibitors: Validation and Application. *The Drug Monit* 2007; **29**: 103-9.
38. Telenti A. New developments in laboratory monitoring of HIV-1 Infection. *Clin Microbiol Infect* 2002; **8**: 137-43.
39. Elens L, Veriter S, Di Fazio V *et al.* Quantification of 8 HIV-protease inhibitors and 2 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors by ultra-performance liquid chromatography with diode array detection. *Clin. Chem* 2009, **55**, 170.

40. Leth FV, Kappelhoff BS, Johnson D *et al.* Pharmacokinetic parameters of nevirapine and efavirenz in relation to antiretroviral efficacy. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2006; **22**: 232-9.
41. Antunes MV, Poeta J, Ribeiro JP *et al.* Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Quantification of HIV Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Protease Inhibitors in Human Plasma. *J. Braz. Chem. Soc.* 2010; online.
42. Turner ML, Reed-Walker K, King JR *et al.* Simultaneous determination of nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 2003; **784**: 331–41.
43. Tribut O, Arvieux C, Michelet C *et al.* Simultaneous quantitative assay of six HIV Protease Inhibitors, one metabolite, and two Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in human plasma by Isocratic Reverse-phase Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 554–62.
44. Gehrig AK, Mikus G, Haefeli WE *et al.* Electrospray tandem mass spectroscopic characterisation of 18 antiretroviral drugs and simultaneous quantification of 12 antiretrovirals in plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; **21**: 2704-16.
45. D'Avolio A, Siccardi M, Sciandra M *et al.* HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; **859**: 234-40.
46. Titier K, Lagrange F, Péhourcq F, *et al.* High-Performance Liquid Chromatography method for the simultaneous determination of the six HIV Protease Inhibitors and two Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in human plasma. *The Drug Monit* 2002; **24**: 417–24.
47. Gieshke R, Fotteler B, Buss N *et al.* Relationship between indinavir exposure to saquinavir monotherapy and antiviral response in HIV positive patients. *Clin Pharmacokinet* 1999; **37**: 75–86.
48. Remmel RP, Kawle SP, Weller D *et al.* Simultaneous HPLC assay for quantification of indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma. *Clin Chem* 2000; **46**: 73-81.
49. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 1998; **46**: 95-99.

50. Ray JE, Marriott D, Bloch MT *et al.* Therapeutic drug monitoring of atazanavir: surveillance of pharmacotherapy in the clinic. *Br J Clin Pharmacol* 2005; **60**: 291–9.
51. < <http://www.delphicdiagnostics.com> > Acesso em Maio 2010.
52. Fletcher CV, Anderson PL, Kakuda TN *et al.* Concentration-controlled compared with conventional antiretroviral therapy for HIV infection. *AIDS* 2002; **16**: 551-60.
53. Burger D, Hugen P, Reiss P *et al.* Therapeutic drug monitoring of nelfinavir and indinavir in treatment-naive HIV-1-infected individuals. *AIDS* 2003; **17**:1157-65.
54. Maat MMR, Huitema ADR, Mulder JW *et al.* Subtherapeutic antiretroviral concentrations in routine clinical outpatient HIV care. *Ther Drug Monit* 2003; **25**:367-73.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as concentrações plasmáticas do efavirenz e associar com características demográficas e com o desenvolvimento de dislipidemia numa coorte de pacientes em terapia antirretroviral no sul do Brasil.

3.2 Específicos

3.2.1 Desenvolver e validar um método analítico de detecção e quantificação por cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC), dos seguintes fármacos antirretrovirais: efavirenz, nevirapina, indinavir, amprenavir, saquinavir, atazanavir, ritonavir and lopinavir.

3.2.2 Relatar a importância de controlar as concentrações plasmáticas de cada paciente em terapia antirretroviral, através da análise em UPLC, buscando comprovar que a variabilidade farmacocinética, a toxicidade dos ARVs e a interação concomitante de medicamentos justificam a necessidade desse controle individual através do monitoramento terapêutico.

3.2.3 Avaliar as concentrações plasmáticas do efavirenz e sua associação com o desenvolvimento de toxicidade (principalmente no SNC e dislipidemia) e outras características demográficas.

4. ARTIGO I

Este artigo foi submetido ao **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.

Associated Factors of Efavirenz Plasma Levels in HIV-positive Individuals with Viral Suppression

Julia Poeta¹, Rafael Linden², Marina Venzon Antunes², Lucia Real¹, Andréia Magalhães de Menezes¹, Jorge P. Ribeiro^{1,3} and Eduardo Sprinz^{1,4*}.

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

² Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brazil.

³ Cardiology and ⁴ Infectology Divisions, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

***Address correspondence:**

Eduardo Sprinz

Serviço de Infectologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: 55 51 3359 8000

Email: eduardo.sprinz@gmail.com.br

Abstract

Background: Efavirenz (EFV) is among the most widely used antiretroviral drugs. Increased EFV exposure has been associated with central nervous system side effects and also with the development of resistance after treatment discontinuation. The objective of this study was to evaluate associated factors related to EFV plasma levels, in a cohort of HIV-infected individuals.

Methods: From July, 2009 to March, 2010, HIV-infected patients with EFV as part of antiretroviral therapy (600mg at night), undetectable viral load for at least 1 year, and CD4 > 200 cells/ μ L were consecutively enrolled at the HIV/AIDS ambulatory care unit in Southern Brazil. Plasma samples were taken between 18–23h after EFV last dose and were analyzed by a validated ultraperformance liquid chromatography.

Results: Forty one subjects were included (21 females). Mean age, weight and body mass index (BMI) were 45.4 years, 70.9 kg and 25.6 kg/m², respectively. Mean EFV plasma level was 1.94 \pm 1.2 μ g/mL. Most plasma concentrations (73%) were within the therapeutic range (TR), 17% had concentrations below the TR, and 10% had higher than TR. There were no significant associations between EFV concentrations and age, CD4 cell count, time on treatment, and lipid profile. There were significant and inverse correlations between EFV levels and body weight ($p=0.013$) as well as BMI ($p<0.001$).

Conclusion: In this cohort of ambulatory HIV-infected patients, body weight was significantly and inversely associated with EFV plasma concentrations. Therapeutic drug monitoring and dose adjustments based on body mass should be considered in these individuals.

Keywords: AIDS, antiretroviral, therapeutic drug monitoring.

Introduction

The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) as a standard of care in the treatment of HIV-infection has dramatically changed the life expectancy of HIV-infected individuals.¹⁻⁴ However, HAART is still associated with the development of important adverse effects such as dyslipidemia, body changes, and hepatic, renal and central nervous system (CNS) toxicity. These effects may limit drug efficacy and further compromise treatment success.⁵⁻⁹

These alterations can be partially related to drug plasma levels that can vary due to interpatient variability and drug interactions.^{6,10-12} Sometimes there are major discrepancies on drug concentration among individuals, and this could lead to problems with treatment adherence. In that context, therapeutic drug monitoring (TDM) could be a tool to better control drug levels, in order to guarantee plasma concentrations within therapeutic range to minimize toxicity and the chance of therapeutic failure.¹³⁻¹⁵ So far, TDM has been proven to have some value in HAART regimens containing protease inhibitors (PIs) and/or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs).^{11,14,16}

Efavirenz (EFV), a NNRTIs, is one of the most commonly used worldwide. This drug is easy to take (one pill, once daily), has a long plasma half-life and it is relatively well tolerated.^{9,14} Nevertheless its use may be associated to the development of adverse effects like dyslipidemia, CNS toxicity, emergence of HIV resistance, and the consequent therapeutic failure. Some studies on TDM have associate EFV plasma levels with toxicity as well as drug resistance.^{7,8,14,17,18} Notably, CNS toxicity is well correlated with EFV

levels.^{7,9,14} Therefore we decided to further investigate EFV plasma levels and its association to several characteristics in a cohort of HIV-infected individuals on HAART in southern Brazil.

Population and methods

Study Population

From July, 2009 to March, 2010, HIV-infected patients were consecutively enrolled at routine visit in the HIV/AIDS ambulatory care unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a national reference center for HIV management in southern Brazil.. Inclusion criteria were the following: (1) EFV was part of HAART (at the usual dose – 600mg at night); (2) there was no acute disease present; (3) with undetectable viral load (<50 copies/mL), for at least 12 months; (4) CD4 count >200 cells/mL; (5) age older than 18 years; and (6) on the same HAART for \geq 12 months. Subjects were excluded from the study if they met any of the following criteria: pregnancy, presence of any neurological disorder, current diagnosis of hepatitis B or C, and patient reported non-adherence to HAART. Informed consent was obtained from all study participants and the protocol was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethical Committee.

Data Collection and Sample Preparation

A questionnaire was applied to obtain additional information such as comorbidities, concomitant medication and the date and time of last EFV dose. Body weight and height were measured to calculate body mass index (BMI)

Plasma samples were taken between 18 – 23 h after EFV last dose. This interval has been chosen because drug levels variation is minimal during this time on HAART stable regimen, containing EFV.^{7,14,18} Blood samples were collected by venipuncture to EDTA containing tubes as anticoagulant. Tubes were centrifuged at 2.500 rpm and 4°C for 10 min and the resulting plasma was aliquotted into numbered eppendorf and immediately frozen at -70°C until analysis to determinate EFV concentrations. Investigators that measured plasma drug concentrations remained blinded from patient self-report, medication timing and adherence data.

Determination of EFV concentrations

EFV plasma levels were analyzed with a validated ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method,¹⁹ with a lower limit of quantification of 0.1 µg/mL. After liquid–liquid extraction of 0.5 mL plasma with methyl-*tert*-butyl ether, the analytes were separated on a ACQUITY UPLC BEH[®] C18 column (2.1 x 150 mm, p.d. 1.7 µm) column eluted with a gradient of acetonitrile and triethylammonium phosphate buffer 5 mM pH 3.0. The total run time was 9.5 minutes. Calibration curves were linear in the range 0.1 to to 10.0 µg/mL. Accuracy ranged from 94.9 to 103.5%. Both interday and intraday coefficients of variation were less than 7.7% for all analytes. The extraction yields were greater than 88.2%.¹⁹ EFV plasma level classification was based on current recommendations: subtherapeutic (< 1 µg/mL), therapeutic (1.0 – 4.0 µg/mL) and toxic levels (> 4.0 µg/mL).^{13,15,20}

Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using SPSS version 18.0. Spearman's rank correlation was used to investigate relationship between EFV plasma levels and age, CD4 cells count, lipid profile, weight, BMI, and time on ART. The association between gender and EFV plasma levels was carried out by the Kruskal-Wallis test. Multiple linear regression were also used to assess the independent association of body weight and with EFV plasma levels controlling for all other variables (age, CD4 cells count, lipid profile and time on ART). $P < 0.05$ was considered statistically significant for all tests.

Results

A total of 105 patients were screened and selected from the inclusion and exclusion criteria. Table 1 show the demographic data on the 41 individual (21 females; 11 African-descendents) included in the analysis.

Most of EFV plasma concentrations were within the therapeutic range (73%). Mean EFV plasma level was $1.94 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$; one patient had plasma level of $13.37 \mu\text{g/mL}$ and was excluded from the analysis (classified as an outlier). We detected that 17% ($n=7$) of individuals had plasma concentrations below the lower therapeutic limit ($<1 \mu\text{g/mL}$) and that 10% ($n=4$) presented EFV concentration above the limit ($>4 \mu\text{g/mL}$). Nervous system symptoms were reported by 49% subjects, with headache and dizziness the most frequent. All patients with EFV concentrations above the limit ($>4 \mu\text{g/mL}$) had CNS adverse effects.

Table 2 shows the correlations between EFV plasma concentration and patient characteristics. There was a significant and inverse relationship between body weight and BMI measurements and EFV levels. In the multivariate analysis BMI and

body weight were still significantly and inversely associated with EFV plasma levels. We did not find any statistically significant difference to age, CD4 cell count and time on ART and EFV plasma levels.

Discussion

Our study evaluated the association between EFV plasma concentration and clinical and demographic variables of forty one individuals. According to UPLC analysis most of the plasma concentrations (73%) were within the therapeutic range (1.0 and 4.0 µg/mL), however we detected 17% of individuals who had plasma concentrations below the lowest therapeutic limit and 10% of individuals who had an EFV concentration above the limit. One patient (euro-descendent woman) was excluded from the analysis as her plasma levels were extremely high and was considered an outlier. This could reflect a genetic trait related to CYP2B6, which would further increase EFV plasma half-life.^{21,22} We did not find any association with EFV plasma concentration to sex and age. This is in accordance to the other studies which found no association.^{14,23,24}

On the other hand, body weight was significantly and inversely correlated with EFV plasma levels. To our knowledge, this is the first study that found this significant association. According to our study, individuals with lower body weight were at greater risk of having higher EFV plasma levels, and this would be associated to higher chance of CNS adverse effects.^{7,8,17,25}

Although most of plasma concentrations were within the therapeutic range (73%), we found a high inter-patient variability in EFV plasma levels, as in previous studies.^{7,8,10,11,25} Nevertheless, 10% of the individuals presented EFV subtherapeutic concentrations. This finding would further support the use of TDM, as EFV long plasma half-life and its lower genetic barrier to HIV mutations

would eventually lead to development of drug resistance.^{13,26} We found that 17% of patients had EFV plasma concentration above the therapeutic limit. And all patients presented CNS toxicity. This could be an opportunity to reduce EFV dosage to an acceptable plasma range. Accordingly, a study showed that EFV dose reduction can be safe in patients with high plasma concentrations and may prevent EFV discontinuations without compromising virological efficacy.²⁵ This would minimize EFV toxicity while improving drug adherence and minimizing treatment costs.

Studies vary on time of blood sample collection, between 8 to 22 hours.^{7,14,18,27,28} It is known that the ideal would be to collect samples close to the trough levels.¹³ On the other hand, it is believed that the variability in EFV level during a dose interval is minimal and that samples can be taken without regard to the time elapsed between intake and sampling because of its prolonged plasma half-life. Therefore, the variability in plasma concentration for patients whose samples would be collected near to trough would be not consistently lower than those for patients whose samples would be collected near the peak or midpoint of the dosing interval.^{7,11,14} So we decided to collect blood samples between 18 to 23h of the last dose. Accordingly, we did not find any difference between EFV plasma levels related to interval of last dose (data not shown).

Our study has several limitations that should be considered when interpreting the results. First, the sample size was not large enough to draw a firm conclusion about the potential to evaluate EFV plasma concentrations. Secondly, the time of the last dose is a critical determinant of the accuracy of these data. It is because this information was obtained only by patient self-report, which might have overestimated adherence to both ART and non-ART

medications, contributing to errors in pharmacokinetic analysis.^{10,21} Nevertheless, it is important to notice that most clinicians performing TDM also rely on patient self-report to obtain dose timing information.¹¹ Lastly, we could have genotyped CYP2B6, as it seems to be a promising approach towards the prediction of EFV toxicity and resistance.^{21,22,26}

In conclusion, we found considerable variations in EFV plasma levels among patients in the study. Larger and prospectively designed clinical trials are still needed to further investigate the EFV plasma concentration and clinical endpoints. We were able to find a significant and inversely relation of body weight and BMI with EFV plasma level. If our findings are confirmed, patients with lower body weight might be benefited with lower dose than the standard recommendation and possibly decreasing EFV adverse events and the treatment costs. Hopefully, in the future the next ARV therapy could increasingly benefit from genotype-guided drug choice, towards the ultimate goal of a personalized HAART.

References

1. Marins JR, Jamal LF, Chen SY *et al.* Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003; **17**: 1675-82.
2. Palella FJ Jr, Baker RK, Moorman AC *et al.* Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **43**: 27-34.
3. Braitstein P, Brinkhof MW, Dabis F *et al.* Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet* 2006; **367**: 817-24.
4. Egger M, May M, Chêne G *et al.* Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002; **360**: 119-29.
5. Wallis C, Sanne I, Venter F *et al.* Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **53**: 480-4.
6. Goodman & Gilman`s. Manual of Pharmacology and Therapeutics. *McGraw Hill*, 2007. Xxiv 1821 p. : il.
7. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA *et al.* Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1 infected patients. *AIDS* 2001; **15**:71-5.
8. Gallego L, Barreiro P, del Rio L *et al.* Analyzing sleep abnormalities in HIV-infected patients treated with efavirenz. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 430-2.
9. Thompson MA, Alberg JA, Cahn P *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the international AIDS. *JAMA* 2010; **304**: 321-33.

10. Bazzoli C, Jullien V, Le Tiec C *et al.* Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action. *Clin Pharmacokinet* 2010; **49**: 17-45.
11. Nettles RE, Kieffer TL, Parsons T *et al.* Marked intraindividual variability in antiretroviral concentrations may limit the utility therapeutic drug monitoring. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 1189-96.
12. <[http:// www.hiv-druginteractions.org](http://www.hiv-druginteractions.org)> (15 August 2010, date last access).
13. la Porte CJL, Back DJ, Blaschke T *et al.* Updated guideline to perform therapeutic drug monitoring for antiretroviral agents. *Reviews in Antivir Ther* 2006; **3**: 4-14.
14. López-Cortés LF, Ruiz-Valderas R, Marin-Niebla A *et al.* Therapeutic drug monitoring of efavirenz. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; **39**: 551-6.
15. Rendón A, Núñez M, Jiménez-Nácher I *et al.* Clinical benefit of interventions driven by therapeutic drug monitoring. *HIV Med* 2005; **6**:360-65.
16. Burger D, van der Heiden I, La Porte C *al.* Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br J Clin Pharmacol* 2006; **61**: 148-54.
17. **Usami O, Ashino Y, Komaki Y** *et al.* Efavirenz-induced neurological symptoms in rare homozygote CYP2B6 *2/*2 (C64T). *Int J STD AIDS* 2007; **18**: 575-6.
18. Gonzalez de Requena D, Gallego O, Corral A *et al.* Higher efavirenz concentrations determine the response to viruses carrying non-nucleoside reverse transcriptase resistance mutations. *AIDS* 2004; **18**: 2091-4.

19. Antunes MV, Poeta J, Ribeiro JP *et al.* Ultra-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors in human plasma. *J Braz Chem Soc* 2010; *in press*. Available in <http://jbcs.sbq.org.br/online/fpapers/10056AR.pdf> since august/2010.
20. < <http://www.delphicdiagnostics.com> > (10 May 2010, date last access).
21. Jones AE, Brown KC, Werner RE *et al.* Variability in drug metabolizing enzyme activity in HIV-infected patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; **66**: 475-85.
22. Cabrera SE, Santos D, Valverde MP *et al.* Influence of the Cytochrome P450 2B6 Genotype on Population Pharmacokinetics of Efavirenz in Human Immunodeficiency Virus Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2791-7.
23. Pérez-Elías MJ, Moreno A, Casado JL *et al.* Observational study to evaluate clinical outcomes after first-line efavirenz-or lopinavir-ritonavir-based HAART in treatment-naïve patients. *JIAPAC* 2009; **8**: 308-13.
24. Leth FV, Kappelhoff BS, Johnson D *et al.* Pharmacokinetic parameters of nevirapine and efavirenz in relation to antiretroviral efficacy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; **22**: 232-9.
25. van Luin M, Gras L, Clemens R *et al.* Efavirenz dose reduction is safe in patients with high plasma concentrations and may prevent efavirenz discontinuations. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; **52**: 240-5.
26. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Research* 2010; **85**: 190–200.
27. la Porte CJL, Sabo JP, Béique L *et al.* Lack of effect of efavirenz on the pharmacokinetics of tipranavir-ritonavir in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4840-4.
28. Moltó J, Blanco A, Miranda C *et al.* Variability in non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitors concentrations among HIV-infected adults in routine clinical practice. *Br J Clin Pharmacol* 2007; **63**:715–21.

TABLE 1. Baseline and Demographic Data

	n = 41 (mean ± SD or as indicated)
Sex (n, %) Female	21 (51.2%)
European-descendants (%)	30 (73.1%)
African descendants (%)	11 (26.9%)
Age (years)	45.4 ± 11.1
Body weight (kg)	79.9 ± 14.1
BMI (kg/m ²)	25.6 ± 4.8
Time on ART (years)	8.8 ± 4.7
CD4 count (cells/μL)	553 ± 248

Abbreviations: BMI, body mass index; EFV, efavirenz; ART, antiretroviral therapy; SD, standard deviation.

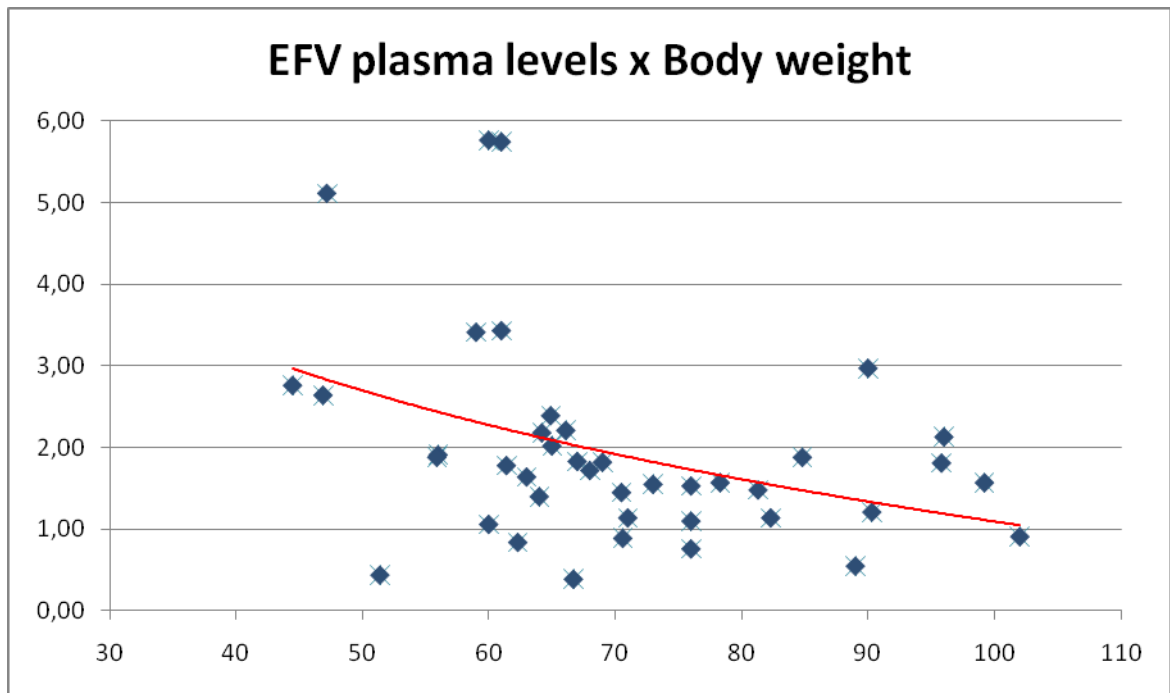
TABLE 2. Correlation between EFV plasma concentration (μg/mL) and main features of the study population (n=40).

Variable	<i>r_s</i>	<i>P</i>
Age (years)	.117	.485
Body Weight (kg)	-.523	.013*
BMI (kg/m ²)	-.490	.013*
Sex	.240	.211
Time on ART (years)	.182	.331
CD4 count (cells/μL)	-.205	.300

*Correlation is significant at the 0.05 level (*P*).

Abbreviations: EFV, efavirenz; BMI, body mass index; ART, antiretroviral therapy.

FIGURE 1



Efavirenz (EFV) plasma levels ($\mu\text{g/mL}$) and Body weight (Kg)
 $P = .013$

5. ARTIGO II

Este artigo foi publicado pela Revista *Journal of the Brazilian Chemical Society*

Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Quantification of HIV Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Protease Inhibitors in Human Plasma

Marina V. Antunes^a, Júlia Poeta^b, Jorge P. Ribeiro^b, Eduardo Sprinz^b and Rafael Linden^{a*}

a - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rodovia RS 239 No. 2755, 93352-000 Novo Hamburgo-RS, Brazil

b - Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos No. 2350, 90035-903 Porto Alegre-RS, Brazil

Abstract

A fast ultra-performance liquid chromatographic (UPLC) method has been developed and validated for the determination of six protease inhibitors (indinavir, amprenavir, saquinavir, atazanavir, lopinavir, and ritonavir) and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (efavirenz and nevirapine). After liquid-liquid extraction of 0.5 mL plasma with MTBE, the analytes were separated on a ACQUITY UPLC BEH[®] C18 column (2.1 x 150 mm, p.d. 1.7 µm) column eluted with a gradient of acetonitrile and triethylammonium phosphate buffer 5 mM pH 3.0. The total run time was 9.5 minutes. Calibration curves were linear in the range 0.1 to 10.0 µg/mL. The lower limit of quantitation was 0.1 µg/mL for all drugs. Accuracy ranged from 94.9 to 103.5%. Both interday and intraday coefficients of variation were less than 7.7% for all analytes. The extraction yields were greater than 88.2%.

Resumo

Um método rápido para a determinação de seis inibidores de protease (indinavir, amprenavir, saquinavir, atazanavir, lopinavir e ritonavir) e de dois inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa, empregando cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) foi desenvolvido e validado. Após extração liquid-líquido de 0,5 mL de plasma com MTBE, os analitos foram separados em uma coluna ACQUITY UPLC BEH[®] C18 (2,1 x 150 mm, d.p. 1,7 µm), eluída com um gradiente de tampão fosfato trielitamônio pH 3.0 e acetonitrila. O tempo total de análise cromatográfica foi de 9,5 minutos. As curvas de calibração foram lineares entre 0,1 a 10,0 µg/mL. O limite inferior de quantificação foi 0,1 µg/mL para todos os fármacos. A exatidão esteve entre 94,9 a 103,5%. Os coeficientes de variação intra e inter-dias foram inferiores a

7,7% para todos os analitos. Os rendimentos de extração foram superiores a 88,2%.

Keywords: antiretroviral drugs, ultra-performance liquid chromatography, therapeutic drug monitoring, UPLC-PDA

Introduction

Antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus (HIV) infections usually consists of combinations of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs) and, more recently, entry inhibitors and integrase inhibitors¹. The currently approach to the therapy of HIV infection is the so-called “highly active antiretroviral therapy” (HAART), which is based on the combination of several drug in the daily dosing regimen. The usual HAART scheme consists of one or more NRTIs, one or more PIs and one NNRTI². Several reports had demonstrated the relationship between plasma drug concentrations and clinical effects, either toxicity or efficacy, for compounds of the NNRTI and PI groups³⁻⁸. Therefore, these drugs are prone for therapeutic drug monitoring (TDM) programs and, considering the necessity of interlaboratory comparison of results for the use of consensual therapeutic target levels, reliable analytical methods must be employed at their measurements.

Several HPLC methods have been published describing the simultaneous quantification of anti-HIV drugs in human biosamples. Most of these methods use UV⁹⁻¹⁵ or mass spectrometric detection¹⁶⁻¹⁹. The protocols using spectrophotometric detectors are free from the matrix ionization effects observed in mass spectrometry and can also provide specific spectral

information through diode array detectors. Besides these advantages, the need for complete chromatographic separation of all compounds to be measured usually determines long analytical runs, leading to low throughput and high consumption of solvents, and by consequence a considerable production of chemical waste. An alternative to conventional HPLC methods is ultra-performance liquid chromatography (UPLC) that could render faster and highly resolutive separations, keeping the advantages and robustness of UV detection modes, as has been described by Elens *et al.*²⁰ for the measurement of anti-HIV drugs. In the present work we describe a novel validated UPLC assay, with the use of a photodiode array detector, for the measurement of the following anti-HIV drugs in human plasma: nevirapine, indinavir, amprenavir, saquinavir, atazanavir, ritonavir, efavirenz and lopinavir.

Experimental

Chemicals

Amprenavir, atazanavir sulfate, efavirenz, indinavir sulfate, lopinavir, nevirapine, ritonavir and saquinavir were kindly donated by the National Institutes of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program (Germantown, USA). Clomipramine chloridrate was obtained from Purifarma Química e Farmacêutica (São Paulo, Brazil). Triethylammonium phosphate buffer 1M pH 3.0 was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Tris(hydroxymethyl)aminomethane was purchased from Nuclear (Diadema, Brazil). Methanol, acetonitrile and methyl-*tert*-butyl ether (MTBE) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained by an Elga Purelab Ultra apparatus from Elga Labwater (High Wycombe, UK).

Preparation of solutions and standards

Individual stock methanolic solutions of amprenavir, atazanavir sulfate, efavirenz, indinavir sulfate, lopinavir, nevirapine, ritonavir, saquinavir, and clomipramine chloridrate (internal standard) were prepared to obtain 1 mg/mL concentration of compound at base form. Working solutions were prepared combining aliquots of each stock solution and proper volumes of methanol to obtain solutions containing 1.0, 1.5, 2.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 80.0 and 100.0 µg/mL of each analyte. The working solution of internal standard was prepared by dilution of stock with methanol to obtain a 50 µg/mL concentration. Mobile phase A was prepared daily diluting 500 µL of Triethylammonium phosphate buffer 1M to 100 mL with ultrapure water to obtain a 5 mM concentration, followed by filtration with 0.2 µm cellulose acetate membranes from Sartorius (Göttingen, Germany). The pH of mobile phase A was adjusted to 3.0. Both mobile phases were sonicated for 15 minutes before use. Tris buffer pH 10.0 was prepared dissolving 2.43 g of tris(hydroxymethyl)aminomethane em 100 mL of ultrapure water, and the pH was properly adjusted.

Equipment and chromatographic conditions

The UPLC system consisted of an ACQUITY UPLC[®] coupled to an ACQUITY UPLC[®] photodiode array detector, both from Waters (Milford, USA). The separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH[®] C18 column (2.1 x 150 mm, particle diameter of 1.7 µm). The system was controlled and data was managed by Empower 2 software, also from Waters. Mobile phase A was triethylammonium phosphate 5 mM and mobile phase B was acetonitrile. At time zero, a mixture of 65% mobile phase A and 35% mobile phase B was

pumped through the column at a constant flow of 0.45 mL/min. From zero to 9.5 min, a linear gradient was set to reach 43% of A and 57% of B. The initial conditions were restored with a 0.1 min linear gradient, and then maintained for 0.9 min. The total run time was 10.5 min. The column temperature was set at 55 °C. Spectra were acquired for all peaks in the range of 205 to 380 nm. Lopinavir was monitored at 215 nm; saquinavir, efavirenz, ritonavir and IS were monitored at 240 nm; indinavir and amprenavir were monitored at 260 nm; and nevirapine and atazanavir were monitored at 280 nm.

Sample preparation

To 2 mL disposable polypropylene tubes were added 500 µL of either calibration, quality control or patient's plasma samples, 50 µL of working internal standard solution, 100 µL of Tris buffer pH 10.0 and 1,000 µL of methyl-*tert*-butyl ether. The tubes were capped and vortex mixed for 30 s and then centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4 °C. An aliquot of 900 µL of the organic layer was evaporated to dryness at 50 °C, under a gentle stream of air. The dried extract was recovered with 150 µL of the initial mobile phase, vortex mixed for 30s and centrifuged for at 10,000 g for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was transferred for a autosampler vial and 10 µL were injected into the UPLC system.

Selectivity

Blank plasma samples from 6 different sources were prepared as described above to check for peaks that might interfere with the detection of the analytes or the IS. Blank plasma samples enriched with other antiretroviral drugs

(abacavir, AZT, DDI, emtricitabine, lamivudine and nelfinavir; 1.0 µg/mL each) were also checked for interfering peaks.

Linearity

Aliquots of blank plasma (450 µL) were enriched with 50 µL of the corresponding working solutions to obtain calibration samples containing 0.1, 0.2, 1.0, 2.5, 5.0, or 10.0 µg/mL of each analyte. Replicates (n = 6) at each concentration were analyzed as described above. Calibration curves were constructed by calculating the ratios of the peak area of each compound to the peak area of the internal standard and comparing these ratios with the nominal concentrations of the calibration samples. Homocedasticity of calibration data was evaluated with *F*-test at the confidence level of 95%. Curves were fitted by least-squares linear regression using several weighting factor ($1/x$, $1/x^{0.5}$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^{0.5}$, $1/y^2$). The calibration models were evaluated by their correlation coefficients (*r*) and Cumulative Percentage Relative Error ($\sum\%RE$) according to Almeida *et al.*²¹. Daily calibration curves using the same concentrations (single measurements per concentration) were prepared with each batch of validation and authentic samples.

Stability

For estimation of stability of processed samples under the conditions of analysis, control samples at 0.15 and 8.0 µg/mL (n = 5 each) were extracted as described above. The extracts obtained at each concentration were pooled. Aliquots of these pooled extracts at each concentration were transferred to autosampler vials and injected under the conditions of a regular analytical run at time intervals of 1 h, during 12 hours. Stability of the analytes was tested by

regression analysis plotting absolute peak areas corresponding to each compound at each concentration vs injection time. Using the obtained linear regression, the concentration after 12 hours was calculated. A decrease or increase of up to 10% in the measured peak areas was considered as acceptable. For evaluation of freeze–thaw stability, quality control samples at the same levels as in the benchtop stability experiment were analyzed before (control samples, n = 3) and after 3 freeze–thaw cycles (stability samples, n = 9). For each freeze–thaw cycle, the samples were frozen at -20 °C for 48 h, thawed, and kept at ambient temperature for 3 h before extraction. The concentrations of the control and stability samples were calculated from daily calibration curves. For the ratio of the stability sample means vs the corresponding control sample means, an acceptance interval of 90%–110% was applied.

Accuracy and precision

Aliquots of blank plasma (450 µL) were enriched with 50 µL of the corresponding working solutions to obtain quality control samples containing all analytes at 0.15, 2.0 and 8.0 ng/mL (QCL, QCM and QCH, respectively). The quality control samples were analyzed as described above in triplicate on each of 5 days. The concentrations of all analytes in the quality control samples were calculated from daily calibration curves. Within-assay precision and between-day precision were calculated by one-way ANOVA with the grouping variable “day” and were expressed as CV%. Accuracy was defined as the percentage of the nominal concentration represented by the concentration estimated with the calibration curve. The acceptance criterion for accuracy was mean values

within $\pm 15\%$ of the theoretical value and for precision was a maximum CV of $15\%^{22}$.

Lower Limit of Quantification

The lowest point of the calibration curves was $0.1 \mu\text{g/mL}$ for all analytes. An independent quality control sample at this concentration was included in the accuracy and precision experiments (QCLLOQ) and was tested in triplicate in three different days. The acceptance criteria established for the limit of quantification was accuracy within $100 \pm 20\%$ of the nominal value of the QC samples and a maximum CV of $20\%^{22}$.

Extraction efficiency

The extraction efficiency was determined by comparing the peak areas of the analytes obtained at the plasma QC samples of the accuracy and precision experiments to those obtained with methanolic solutions at the same levels, measured in triplicate at three different days, in the same analytical batch. Extraction efficiency was expressed as percentage of the concentration of the reference samples.

Method application

The developed method was applied to 74 plasma samples from patients under anti-HIV therapy from the infectology service of a Brazilian tertiary hospital, after approval by institution's Ethics Research Committee. Trough blood samples were collected by venipuncture to EDTA containing tubes. After collection, the tubes were centrifuged within 30 minutes and plasma was immediately separated and maintained at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

Results and discussion

Chromatography and sample preparation

Most HPLC-UV methods for TDM of anti-HIV drugs have long run times, reducing their applicability for routine analysis, along with higher cost associated to the usage of solvents and the disposal of the chemical residues. In this study we described the faster LC-UV method published for the measurement of the most important anti-HIV drugs currently monitored in HAART. Retention times for nevirapine, indinavir, saquinavir, amprenavir, atazanavir, efavirenz, ritonavir and lopinavir were 1.313, 1.781, 3.631, 3.884, 6.261, 7.338, 7.883 and 8.230 minutes, respectively (Figure 1). The retention time of the internal standard was 2.996 minutes. The total run time was 9.5 minutes, shorter than the 14 minutes described by Elens *et al.*²⁰ in the only previously published UPLC assay for anti-HIV drugs. The longer run time of Elens *et al.* could be attributed to the measurement of the late eluting tipranavir. Tipranavir was not present in our assay because this drug is not registered in Brazil, being excluded of the recommended therapeutic schemes of the Brazilian Ministry of Health^{23, 24}. The total consumption of mobile phase in our assay was only 4.73 mL per analysis, far below from other published LC-UV methods, which could reach up to 67.5 mL¹⁵.

No significant interference endogenous plasma peaks was observed in the blank samples (Figure 2). Retention times of abacavir, AZT, DDI, emtricitabine, lamivudine and nelfinavir were 0.816, 0.932, 0.812, 0.667, 0.752 and 3.804 minutes, respectively, presenting no inference with the measured drugs. Additionally, all analyte's peaks were evaluated with respect to their

spectral purity and compared with library reference spectra, using the Empower[®] software. No spectral impurity was observed in identified peaks in any patient's tested sample.

In the present work, for means of simplicity and cost, we choose a liquid-liquid extraction procedure with MTBE to extract the drugs from plasma. The extraction procedure was simple and inexpensive, with consistent yields in the range of 88.2 to 101.3% (Table 3).

Figure 1

Figure 2

Method validation

There was no indication of instability of the analytes in any of the tested conditions (Table 1). Regression analysis of absolute peak areas of the analytes plotted vs injection time indicated no instability of processed samples during a time interval of 12 h, with concentration changes based on linear regression on the range of -3.8 to 6.8%. The time frame of 12 h was determined considering the maximum run time needed for analysis of one batch of 50 samples with the developed method, including the sample preparation. The ratios of means (stability vs control samples) of the freeze–thaw samples also fulfilled the acceptance criteria, with QC concentrations after three cycles on the range of 94.8 to 105.8% of control samples.

Table 1

The slopes (b) and y-intercepts (a), including 95% confidence intervals of both variables, as well as the coefficients of correlation (r) and cumulative percentage relative error ($\sum\%RE$) for each analyte, as obtained in the linearity experiments, are listed in Table 2. Calibration samples were prepared at 6 concentrations spread from 0.1 to 10 $\mu\text{g/L}$ for each analyte, covering

concentrations that are to be expected for most authentic samples. The inverse of the squared concentration ($1/x^2$) was selected as an appropriate weighting factor to account for unequal variances (heteroscedasticity) over the calibration range, presenting the smaller $\sum\%RE$. The coefficient of correlation was from 0.9920 to 0.999. The back-calculated concentrations of all calibration samples fulfilled the criteria established by Shah *et al.*²².

Table 2

QC samples for accuracy and precision experiments were prepared at 3 concentrations (QCL, QCM, and CQH) covering the calibration range. The results of the accuracy and precision experiments are given in Table 3. All accuracy values fulfilled the acceptance criteria for this parameter, lying within the range 94.9 to 103.5% of the nominal concentrations. With-assay assay precision was in the range of 3.9 to 7.7%, where between-assay precision was 3.4 to 7.3%, also being accepted.

Another QC sample containing the analytes at concentrations equal to those of the lowest point of the calibration curve (QCLLOQ) was prepared to determine whether the criteria for analytical recovery and precision were fulfilled even at these concentrations, which corresponded to the practical LLOQ. The QCLLOQ presented accuracy in the range of 98.4 to 103.5, within-assay precision of 6.5 to 8.2%, and between-assay of 4.4 to 7.8%, fulfilling the acceptance criteria for the lower limit of quantification.

Table 3

Method application

In 91 single drug measurements, we found 15 values outside the target ranges for treatment-naïve patients previously published²⁵. These outlier values

were obtained for efavirenz (range 0.077 to 13.38 µg/mL, 11 from 40 measurements outside the target range) and lopinavir (range 0.168 to 11.51 µg/mL, 3 from 11 measurements outside the target range). As expected, there is a wide variation on the plasma concentration of the measured anti-HIV drugs, even when standardized posology is employed, what corroborates the use of TDM in these patients. Moreover, considering the reported relation of plasma concentration of NNRTI and PI to virological response, the significant interindividual pharmacokinetic variation, the numerous potential drug interactions and the possibility to check for compliance, TDM represents an invaluable tool to optimize anti-HIV drug therapy²⁶.

Conclusions

A fast gradient UPLC-PDA method for the simultaneous determination of nevirapine, indinavir, amprenavir, saquinavir, atazanavir, efavirenz, lopinavir and ritonavir in 500 µL of human plasma samples was described. The total run time was 9.5 minutes, with consumption of only 4.73 mL of mobile phase for each analysis. The sample preparation was based on a simple liquid-liquid extraction with MTBE. The method showed to be precise, accurate and specific and was applied to 74 patient's samples, were 15 of 91 single measurements were outside published therapeutic ranges.

Acknowledgments

The authors are grateful to the National Institutes of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program (Germantown, USA) for the kind donation of reference samples of anti-HIV drugs and to the Centro Universitário Feevale, for financial support.

References

1. <http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html>, accessed in January 2010.
2. Oxenius, A.; Price, D.A.; Easterbrook, P.A.; O'Callaghan, C.A.; Kelleher, A.D.; Whelan, J.A.; Sontag, G.; Sewell, A.K.; Phillips, R.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 3382.
3. Wateba, M.I.; Billaud, E.; Dailly, E.; Jolliet, P.; Raffi, F. *HIV Med.* **2006**, *7*, 197.
4. Gutierrez, F.; Padilla, S.; Navarro, A.; Masiá, M.; Hernández, I.; Ramos, J.; Estéban, A.; Martin-Hidalgo, A. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2003**, *33*, 594.
5. Seminari, E.; Gentilini, G.; Galli, L.; Hasson, H.; Danise, A.; Carini, E.; Dorigatti, F.; Soldarini, A.; Lazzarin, A.; Castagna, A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 790.
6. van Leth, F.V.; Kappelhoff, B.S.; Johnson, D.; Losso, M.H.; Boron-Kaczmarek, A.; Saag, M.S.; Livrozet, J-M.; Hall, D.B.; Leith, J.; Huitema, A.D.R.; Wit, F.W.; Beijnen, J.H.; Lange, J.M.A. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2006**, *22*, 232.
7. Kappelhoff, B.S.; van Leth, F.; Robinson, P.A.; MacGregor, T.R.; Baraldi, E.; Montella, F.; Uip, D.E.; Thompson, M.A.; Russel, D.B.; Lange, J.M.; Beijnen, J.H.; Huitema, A.D. *Antivir. Ther.* **2005**, *10*, 489.

8. Back, D.; Gibbons S.; Khoo, S. *Ther. Drug Monit.* **2006**, 28, 468.
9. Takahashi, M.; Yoshida, M.; Oki, T.; Okumura, N.; Suzuki, T.; Kaneda, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28, 1286.
10. Poirier, J.M.; Robidou, P.; Jaillon, P. *Ther. Drug Monit.* **2005**, 27, 186.
11. Rezk, N.L.; Crutchley, R.D.; Yeh, R.F.; Kashuba, A.D.M. *Ther. Drug Monit.* **2006**, 28, 517.
12. Colombo, S.; Béguin, A.; Marzolini, C.; Telenti, A.; Biollaz, J.; Decosterd, L.A. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, 832, 138.
13. Weller, D.R.; Brundage, R.C.; Balfour, H.H; Vezina, H.E. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 848, 369.
14. Dailly, E.; Reliquet, V.; Victorri-Vigneau, C.; Raffi, F.; Jolliet, P. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, 832, 317.
15. Titier, K.; Lagrange, F.; Péhourcq, F.; Edno-Mcheik, L.; Moore, N.; Molimard, M. *Ther. Drug Monit.* **2002**, 24, 417.
16. Dickinson, L.; Robinson, L.; Tjia, J.; Khoo, S.; Back, D. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 829, 82.

17. Rebiere, H.; Mazel, B.; Civade, C.; Bonnet, P.A. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *850*, 376.
18. D'Avolio, A.; Siccardi, M.; Sciandra, M.; Lorena, B.; Bonora, S.; Trentini, L.; Di Perri, G. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *859*, 234.
19. Gehrig, A.K.; Mikus, G.; Haefeli, W.E.; Burhenne, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2704.
20. Elens, L.; Veriter, S.; Di Fazio, V.; Vanbinst, R.; Boesmans, D.; Wallemacq, P.; Haufroid, V. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 170.
21. Almeida, A.M.; Castel-Branco, M.M.; Falcão, A.C. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *774*, 215.
22. Shah, V.P.; Midha, K.K.; Findlay, J.W.A.; Hill, H.M.; Hulse, J.D.; McGilveray, I.J.; McKay, G.; Miller, K.J.; Patnaik, R.N.; Powell, M.L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C.T.; Yacobi, A. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1551.
23. Brazil. *Recommendations on Antiretroviral Therapy in HIV - infected Children and Adolescents*. Ministry of Health: Brasília, 2009.
24. Brazil. *Recommendations on Antiretroviral Therapy in HIV - infected Adults*. Ministry of Health: Brasília, 2008.

25. la Porte, C.J.L.; Back, D.J.; Blaschke, T.; Boucher, C.A.B.; Fletcher, C.V.; Flexner, C.; Gerber, J.G.; Kashuba, A.D.M.; Shapiro, J.; Burger, D.M. *Rev. Antivir. Ther.* **2006**, 3, 4.

26. van Luin, M.; Kuks, P.F.M.; Burger, D.M. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2008**, 3,266.

Table 1. Benchtop stability and freeze and thaw stability

Analyte	Benchtop stability		Freeze and thaw stability					
	Concentration change (%) after 12 h (based on regression)		Percentage of control concentration after each cycle					
			First		Second		Third	
	0.15 µg/mL	8.0 µg/mL	0.15 µg/mL	8.0 µg/mL	0.15 µg/mL	8.0 µg/mL	0.15 µg/mL	8.0 µg/mL
Nevirapine	4.8	5.5	103.9	102.9	103.1	98.6	105.8	104.1
Indinavir	5.9	4.9	101.5	97.9	105.8	99.4	102.5	103.8
Saquinavir	6.8	2.3	99.8	95.5	99.4	101.8	98.7	102.3
Amprenavir	4.5	3.6	106.4	105.1	96.7	94.1	103.8	100.7
Atazanavir	0.9	2.5	94.7	96.8	105.4	103.7	102.8	97.3
Efavirenz	2.5	3.9	98.7	95.8	101.6	101.4	101.5	104.4
Ritonavir	-3.8	4.9	93.5	94.2	100.7	107.1	96.4	96.7
Lopinavir	-3.2	3.9	105.4	99.4	93.7	94.8	97.1	102.7

Table 2. Summary of the evaluation of the calibration models

Weighting factor	Regression parameters (\pm 95% CI)	Analyte						
		Nevirapine	Indinavir	Saquinavir	Amprenavir	Atazanavir	Efavirenz	Ritonavir
unweighted	<i>b</i>	0.2801 (\pm 0.0018)	0.0590 (\pm 0.0058)	0.5362 (\pm 0.0058)	0.3958 (\pm 0.0045)	0.1945 (\pm 0.0019)	0.3964 (\pm 0.0026)	0.1424 (\pm 0.0043)
	<i>a</i>	-0.0046 (\pm 0.0034)	-0.0032 (\pm 0.0117)	-0.0360 (\pm 0.0111)	-0.0232 (\pm 0.0086)	-0.0069 (\pm 0.0036)	-0.0171 (\pm 0.0051)	-0.0084 (\pm 0.008)
	<i>r</i>	0.9999	0.9993	0.9982	0.9994	0.9990	0.9970	0.9996
	$\Sigma\%$ RE	282.08	847.89	689.77	749.57	308.97	468.13	602.93
1/x	<i>b</i>	0.2772 (\pm 0.0022)	0.0573 (\pm 0.0077)	0.5229 (\pm 0.0077)	0.3852 (\pm 0.0061)	0.1924 (\pm 0.0024)	0.3898 (\pm 0.0036)	0.1393 (\pm 0.0055)
	<i>a</i>	+0.0043 (\pm 0.0043)	+0.0024 (\pm 0.0148)	+0.0057 (\pm 0.0148)	+0.0102 (\pm 0.0116)	-0.0001 (\pm 0.0048)	+0.0039 (\pm 0.0071)	+0.0013 (\pm 0.010)
	<i>r</i>	0.9999	0.9990	0.9993	0.9992	0.9998	0.9996	0.9995
	$\Sigma\%$ RE	-9.73 x 10 ⁻¹³	0.5812	-0.0112	-0.1373	-0.0870	-0.0777	-0.0404
1/x ^{0.5}	<i>b</i>	0.2785 (\pm 0.0019)	0.0581 (\pm 0.0065)	0.5291 (\pm 0.0065)	0.3900 (\pm 0.0051)	0.1934 (\pm 0.0021)	0.3930 (\pm 0.0029)	0.1407 (\pm 0.0047)
	<i>a</i>	+0.0022 (\pm 0.0037)	+0.0009 (\pm 0.0125)	-0.0055 (\pm 0.0124)	+0.0018 (\pm 0.0097)	-0.0021 (\pm 0.0039)	-0.0021 (\pm 0.0057)	-0.0012 (\pm 0.009)
	<i>r</i>	0.9999	0.9992	0.9995	0.9993	0.9999	0.9998	0.9995
	$\Sigma\%$ RE	60.453	198.18	169.70	172.67	80.032	123.22	140.02
1/x ²	<i>b</i>	0.2753 (\pm 0.0028)	0.0551 (\pm 0.0137)	0.5033 (\pm 0.0137)	0.3751 (\pm 0.0122)	0.1880 (\pm 0.0061)	0.3764 (\pm 0.0095)	0.1353 (\pm 0.0097)
	<i>a</i>	+0.0050 (\pm 0.0054)	+0.0031 (\pm 0.0263)	+0.0127 (\pm 0.0264)	+0.0138 (\pm 0.0235)	+0.0014 (\pm 0.0115)	+0.0087 (\pm 0.0183)	+0.0027 (\pm 0.018)
	<i>r</i>	0.9999	0.9980	0.9975	0.9991	0.9987	0.9970	0.9986
	$\Sigma\%$ RE	-7.69 x 10 ⁻¹³	-0.1124	0.0223	-0.1201	0.1056	-0.0055	-0.2544
1/y	<i>b</i>	0.2772 (\pm 0.0022)	0.0572 (\pm 0.0077)	0.5226 (\pm 0.0077)	0.3848 (\pm 0.0061)	0.1924 (\pm 0.0024)	0.3898 (\pm 0.0036)	0.1393 (\pm 0.0055)
	<i>a</i>	+0.0043 (\pm 0.0043)	+0.0022 (\pm 0.0149)	+0.0045 (\pm 0.0149)	+0.0009 (\pm 0.0117)	-0.0003 (\pm 0.0046)	+0.0029 (\pm 0.0069)	+0.0011 (\pm 0.010)
	<i>r</i>	0.9999	0.9990	0.9993	0.9991	0.9998	0.9997	0.9995
	$\Sigma\%$ RE	2.7721	37.493	24.403	22.223	8.7711	23.953	14.721
1/y ^{0.5}	<i>b</i>	0.2784 (\pm 0.0019)	0.0581 (\pm 0.0065)	0.5291 (\pm 0.0065)	0.3900 (\pm 0.0051)	0.1934 (\pm 0.0021)	0.3930 (\pm 0.0029)	0.1407 (\pm 0.0047)
	<i>a</i>	+0.0021 (\pm 0.0037)	+0.0007 (\pm 0.0124)	-0.0066 (\pm 0.0124)	+0.0006 (\pm 0.0097)	-0.0021 (\pm 0.0039)	-0.0028 (\pm 0.0056)	-0.0014 (\pm 0.009)
	<i>r</i>	0.9999	0.9992	0.9995	0.9993	0.9999	0.9998	0.9995

	$\Sigma\%RE$	65.752	244.04	190.79	206.62	84.691	139.56	153.37
$1/y^2$	<i>b</i>	0.2751 (\pm 0.0029)	0.0552 (\pm 0.0134)	0.5035 (\pm 0.0133)	0.3742 (\pm 0.0122)	0.1879 (\pm 0.0061)	0.3770 (\pm 0.0093)	0.1354 (\pm 0.0096)
	<i>a</i>	+0.0051 (\pm 0.0056)	+0.0030 (\pm 0.0256)	+0.0115 (\pm 0.0256)	+0.0138 (\pm 0.0233)	+0.0012 (\pm 0.0117)	+0.0076 (\pm 0.0178)	+0.0025 (\pm 0.018)
	<i>r</i>	0.9999	0.9984	0.9977	0.9991	0.9986	0.9972	0.9987
	$\Sigma\%RE$	1.2901	18.121	22.193	8.6132	12.693	21.683	12.273
Test of homoscedasticity	F_{exp}	1,376.49	1,405.79	1,454.06	779.97	1,821.94	1,089.13	1,199.0
F_{tab} (5, 5, 0.95) = 5.05								

Table 3. Precision, accuracy and extraction yield

Analyte	QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Precision (CV%)		Accuracy (%)	Extraction yield (%)
			Within-assay	Between-assay		
Nevirapine	QCLLOQ	0.1	8.2	7.8	102.5	-
	QCL	0.15	7.2	6.9	101.2	90.2
	QCM	2.0	4.9	3.5	95.6	89.3
	QCH	8.0	4.7	2.8	99.7	88.2
Indinavir	QCLLOQ	0.1	7.5	5.1	102.5	-
	QCL	0.15	6.9	4.2	101.6	91.8
	QCM	2.0	6.3	6.1	96.2	94.7
	QCH	8.0	7.3	4.5	102.4	96.9
Saquinavir	QCLLOQ	0.1	7.5	5.5	98.4	-
	QCL	0.15	6.9	4.5	95.9	95.2
	QCM	2.0	7.7	6.6	95.8	97.5
	QCH	8.0	4.2	4.6	100.5	96.1
Amprenavir	QCLLOQ	0.1	7.8	6.2	102.1	-
	QCL	0.15	7.5	5.1	103.5	101.3
	QCM	2.0	5.2	4.6	95.8	98.6
	QCH	8.0	4.3	3.4	101.7	99.8
Atazanavir	QCLLOQ	0.1	6.5	4.4	98.7	-
	QCL	0.15	5.9	3.6	95.8	97.1
	QCM	2.0	6.5	4.5	95.4	101.1
	QCH	8.0	3.9	3.4	99.3	97.3
Efavirenz	QCLLOQ	0.1	7.8	5.8	103.5	-

	QCL	0.15	7.3	4.3	102.7	89.2
	QCM	2.0	6.7	5.7	102.4	91.5
	QCH	8.0	5.3	6.7	104.4	93.8
Ritonavir	QCLLOQ	0.1	7.4	7.7	101.2	-
	QCL	0.15	4.3	6.2	98.8	91.7
	QCM	2.0	6.5	7.3	102.7	94.5
	QCH	8.0	6.4	5.4	104.8	90.7
Lopinavir	QCLLOQ	0.1	8.1	7.8	99.8	-
	QCL	0.15	6.8	7.1	98.7	88.9
	QCM	2.0	6.4	4.8	94.9	92.1
	QCH	8.0	4.4	4.4	97.4	88.2

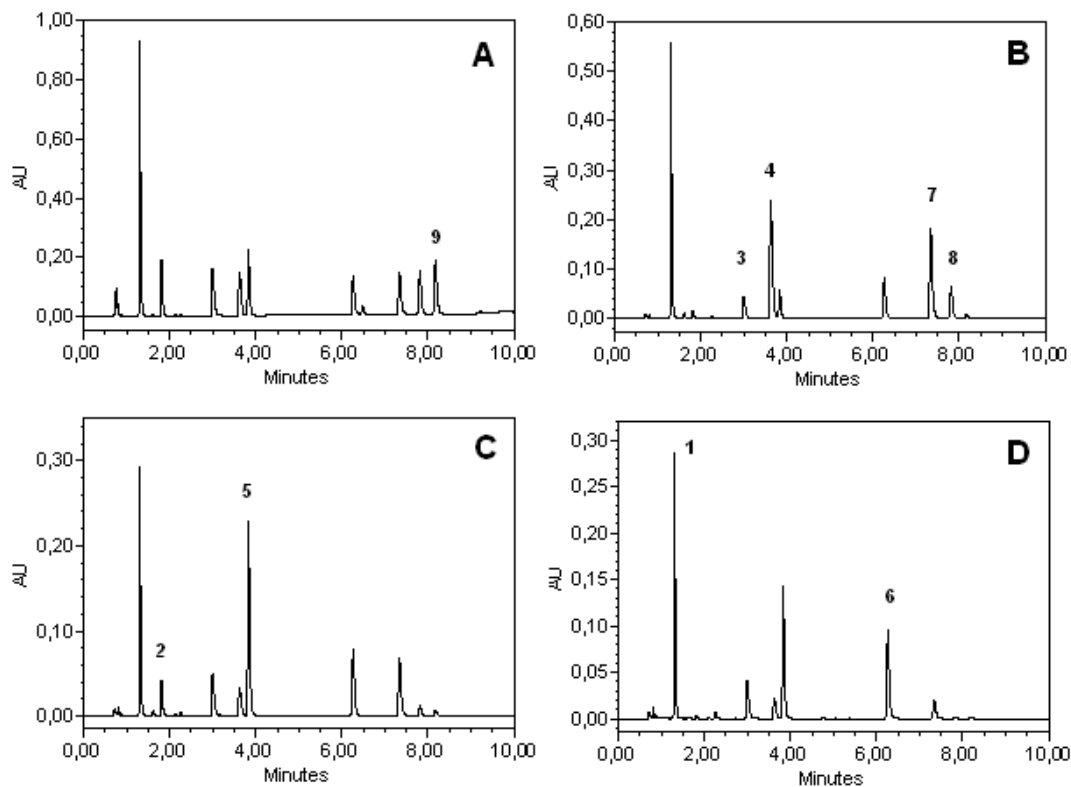


Figure 1. Chromatograms of blank plasma spiked with all drugs at 5 µg/mL and internal standard. **A:** measurement at 215 nm; **B:** measurement at 240 nm; **C:** measurement at 260 nm; **D:** measurement at 280 nm. Peak 1= nevirapine; peak 2= internal standard; peak 3= indinavir; peak 4= saquinavir; peak 5= amprenavir; peak 6= atazanavir; peak 7= efavirenz; peak 8= ritonavir; peak 9= lopinavir.

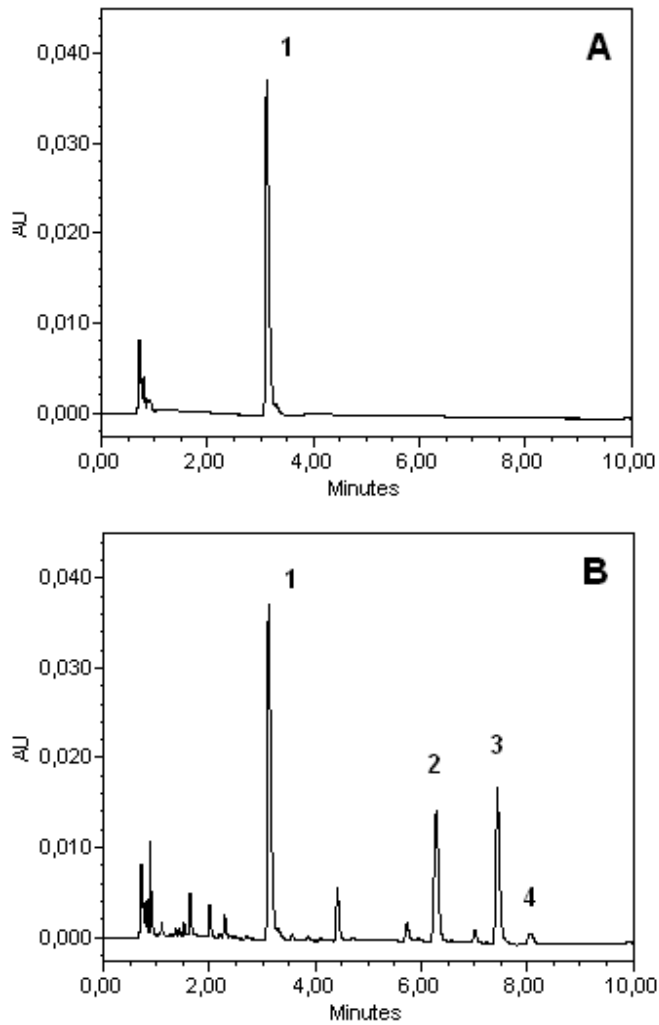


Figure 2. **A**: Blank plasma spiked with internal standard. **B**: Patient sample with internal standard (peak 1); atazanavir (peak 2, 1.61 ug/mL); efavirenz (peak 3, 1.88 ug/mL) and ritonavir (peak 4, 0.11 ug/mL). Both chromatograms are monitored at 240 nm.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o acesso global da TARV está em ascensão nos últimos anos, o que resultou numa melhora da sobrevivência e numa redução das taxas de complicações da SIDA entre indivíduos infectados com HIV. Embora essa atual terapia tenha modificado significativamente a história natural da infecção pelo HIV, uma incidência elevada de falhas terapêuticas ainda é observada nos esquemas atualmente utilizados. Ao final deste trabalho consideramos que o monitoramento terapêutico é de suma importância para controlar os níveis de resistência aos fármacos antirretrovirais, assim como, atenuar ou até mesmo, eliminar os efeitos adversos provocados por estes fármacos.

Podemos aplicar o MTF intervindo na educação do paciente como um todo, por exemplo, mudando o esquema, a dose, verificando a aderência ao tratamento e tentando evitar os efeitos adversos já relacionados.

Além desta constatação, padronizamos um método capaz de detectar antirretrovirais no plasma de pacientes HIV-infectados para este fim. Através do controle das concentrações plasmáticas dos ARVs, no futuro, poderá nos remeter a um melhor controle da TARV.

Esperemos que, em breve, a TARV poderá beneficiar cada vez mais a escolha do medicamento, com o objetivo último de uma HAART personalizada. A identificação dos fatores envolvidos na alteração plasmática dos ARVs foi o foco desse trabalho e que terá continuidade em trabalhos futuros, até que sua utilidade esteja presente como rotina, na prática clínica desses pacientes.

7. ANEXOS

7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Com o passar do tempo, estão sendo identificadas mudanças no sangue e no corpo antes não descritos em pessoas portadores do HIV, tais como aumento exagerado das gorduras e açúcares no sangue e modificações nas formas do corpo, que consistem no aumento de gordura no pescoço, na barriga e no peito, e uma diminuição da gordura na face, braços, pernas e nádegas, que surgem durante a utilização do coquetel.

Esta pesquisa tem como objetivo identificar a concentração plasmática (dose) de antiretrovirais adequada para cada paciente, a fim de proporcionar o bem estar, com o mínimo de reações adversas garantindo a eficácia e a segurança do coquetel. Os resultados deste estudo poderão ser utilizados, no futuro, para definir o melhor tratamento para cada paciente de forma individualizada, evitando-se assim o uso desnecessário de fármacos com diferentes efeitos colaterais em pacientes que não se beneficiarão dos mesmos.

Concordando em participar do estudo, você será submetido a uma coleta de amostra de sangue que lhe causará o desconforto da picada com agulha e, às vezes, poderá deixar o local um pouco roxo. Além disso, serão realizadas medidas de peso e altura.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e/ou coerção, a respeito dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido. Também fui informado dos riscos, desconfortos e benefícios da minha participação, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber respostas ou esclarecimento sobre qualquer dúvida a respeito dos procedimentos;

- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;
- de que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;
- de ser informado sobre os resultados e de suas implicações clínicas após o término do estudo;
- de que o material biológico que será coletado será armazenado pelo período de cinco anos, podendo ser utilizado para posteriores estudos dentro desta mesma proposta com a devida concordância do paciente;
- da utilização do material armazenado, que só ocorrerá mediante aprovação do novo projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa;

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto de Pesquisa são: o Prof. Dr. Eduardo Sprinz (Fone: 2101 8152) e a mestrandia Julia Poeta (Fone: 99069993), tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data ___/___/_____

Nome do paciente

Assinatura do paciente

Concordo em deixar a minha amostra armazenada por 5 anos

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável pela obtenção do presente consentimento

Observação: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do Paciente ou seu Responsável Legal e outra com o Pesquisador Responsável.

7.2 Questionário

FICHA DE REGISTRO/QUESTIONÁRIO

Dados de identificação

Data: / / Hora: : Pront.: _____ Nº _____
Nome: _____
Data nasc: / / Idade: _____ Profissão: _____
Estado civil : _____ Escolaridade: _____
Endereço: _____ Bairro: _____
Cidade: _____ Fone: _____
Grupo étnico
() euro-descendente () afro-descendente () misto

Dados antropométricos

Peso Atual: _____ **Peso Ideal:** _____ **Peso Usual:** _____
Altura: _____ CC: _____ CQ: _____ RCQ: _____ IMC: _____
↑ ou ↓ peso: _____
Desde quando HIV: _____ Tempo de Tratamento: _____

Esquema ARV atual: () ZDV () d4T () 3TC () RTV () EFZ () ATV () LPV
Última dose ingerida:

Hipolipemiantes () Sim () Não
DM () Sim () Não
Hipoglicemiantes () Sim () Não

Fatores Risco DCV:

Cardiopata () sim () não
Atividade física: () sim () não Frequência: _____
Tabagista: () sim () não Tempo: _____ N.º cigarros: _____
Uso álcool: () sim () não Uso drogas ilícitas: () Sim () Não
História familiar DCV: () sim () não Hipertigliceridemia/CT: () Sim () Não
Dislipidemia familiar: () Sim () Não Diabetes *Mellitus familiar*: () Sim () Não

Efeitos adversos

Lipodistrofia: () Sim () Não

lipoatrofia () lipohipertrofia () padrão misto ()

Ocorrência de manchas vermelhas na pele (exantemas): () sim () não

Tonturas, dores de cabeça: () sim () não

Outros efeitos adversos relatados: _____

Utilização do tratamento corretamente, respeitando doses e horários (Adesão > 90%):

() sim, sempre () às vezes, sempre que posso () não