



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



BIANCA NAYRA MALFARÁ

**TRANSFERÊNCIA DO NIFEDIPINO PARA O LEITE MATERNO EM LACTANTES
HIPERTENSAS**

Processo CAPES nº 1480500 03/2015

Araraquara-SP

2017

BIANCA NAYRA MALFARÁ

**TRANSFERÊNCIA DO NIFEDIPINO PARA O LEITE MATERNO EM LACTANTES
HIPERTENSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Processo CAPES nº 1480500 03/2015

Araraquara-SP

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M248t Malfará, Bianca Nayra
Transferência do nifedipino para o leite materno em lactantes hipertensas / Bianca Nayra
Malfará. -- Araraquara, 2017.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Natália Valadares de Moraes.

1. Nifedipino. 2. Leite materno. 3. Lactantes. 4. CLAE-UV. 5. Lactantes hipertensas. I. Moraes,
Natália Valadares de, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

*Dedico este trabalho a Deus,
por ter me concedido a dádiva da vida e
por ter me cercado por pessoas tão maravilhosas...*

*À minha filha Ana Clara,
por ser responsável direta pela minha maior felicidade...*

*À minha mãe Teresinha e aos meus irmãos Nathália e Juninho,
pela compreensão, carinho e amor...*

*À minha avó Odila, meu tio Wilson, minha tia Márcia e ao Pipe
por me permitirem viver ao lado deles momentos tão felizes e inesquecíveis...*

*À minha grande amiga Lígia e toda sua família
pelo apoio constante e amizade sincera...*

*ao meu grande amor Higor Skalkowicz
por todo amor, confiança e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes por confiar, acreditar e apoiar sempre o meu trabalho, por me transmitir tantos ensinamentos... pela sua sabedoria, competência e humildade.

Aos responsáveis clínicos Profs. Dr. Geraldo Duarte e Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli pela preciosa colaboração e por possibilitarem a viabilidade da etapa clínica deste trabalho.

Aos professores Dr. André Gonzaga dos Santos e Leonardo Régis Leira Pereira pelas contribuições no trabalho e no exame de qualificação.

A Profa. Dra. Amanda Martins Baviera por ter me orientado durante meu aperfeiçoamento técnico em coletas de sangue no Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC), assim como agradeço também a todos os funcionários e enfermeiros do NAC que me ajudaram durante este processo.

Aos Profs. Dra. Natália Valadares de Moraes, Dr. José Salvador Lepera e Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini por toda ajuda e ensinamentos transmitidos durante a realização do meu estágio docência.

Aos funcionários e amigos dos laboratórios de toxicologia e bioequivalência farmacêutica, Maria, Valéria, Vinícius, Marcão e Kelly por toda a ajuda, dedicação e amizade.

Aos amigos Bruno, Carol Conchon, Mariana, Jessica, Jhohann e Priscila por toda a ajuda, dedicação e companheirismo.

Aos amigos Bruna, Carol Candido, Elias, Evelin, Jonata, Manuel, Michel e Taísa por toda amizade, auxílio e por todos os momentos agradáveis que passamos juntos...

Aos funcionários da seção de pós-graduação e da biblioteca pela paciência e por tanta dedicação.

A todos os Professores e Funcionários da FCF-UNESP pelo carinho, amizade, respeito e por terem me acolhido tão bem...

A todos os funcionários do Ambulatório de Gestação de Alto risco, e também do Ambulatório da Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP, em especial   Leila, por tanta paciência, ajuda e compreensão.

A todos os funcionários do banco de leite do HCFMRP, pelo auxílio com as coletas do leite materno.

  minha tia e farmacêutica clínica Dra. Márcia Regina Malfará por todo o carinho e auxílio durante minhas atividades no HCFMRP

  querida e doce amiga Gabriela Figueira Campos por tanta dedica o, carinho e pelo auxílio durante o início do meu trabalho no HCFMRP.

A todas as pacientes que participaram deste trabalho, inclusive àquelas que por motivos maiores foram impossibilitadas de concluir a pesquisa... agradeço a boa vontade, o carinho e também as parab nizos por tanta garra e tanto amor aos seus beb s.

A todos que não foram citados que de uma maneira direta ou indireta contribuiram para a realiza o deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro durante a execu o deste trabalho.

Trabalhar

Se você acredita no valor da preguiça, olhe a água parada.
Seja qual seja o seu problema, o trabalho será sempre a sua base de solução.
Não existe processo de angústia que não se desfaça ao toque do trabalho.
Diante de qualquer sofrimento, o trabalho é o nosso melhor caminho de libertação.
O segredo da paz íntima é agir um tanto mais além de nossas supostas
possibilidades na construção do bem.
Não se aborreça se alguns companheiros lhe abandonaram a estrada; continue em
seu próprio dever e o trabalho lhe trará outros.
O que você faz é aquilo que você tem.
A força está com a razão, mas a razão está do lado de quem trabalha.
Todos os medicamentos são valiosos na farmácia da vida, mas o trabalho é o
remédio que oferece complemento a todos eles.
Quem trabalha encontra meios de esclarecer, mas não tem tempo de discutir.
O sucesso quase sempre se forma com uma parte de ideal e noventa e nove partes
de suor na ação que o realiza.

André Luiz / Chico Xavier

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a transferência do nifedipino para o leite materno no estado de equilíbrio em lactantes hipertensas tratadas com comprimidos de liberação controlada na dose de 20 mg a cada 12 horas. Nossa hipótese de trabalho foi a de que o polimorfismo genético ABCG2 c.421C>A pudesse alterar a razão de concentração de nifedipino no leite/plasma (L/P) das lactantes portadoras de pelo menos um alelo raro. Foram investigadas 15 pacientes com hipertensão arterial sistêmica durante atendimento pré-natal no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. No período de quinze a trinta dias pós-natal e após pelo menos 15 dias de tratamento com o nifedipino (estado de equilíbrio), foram coletadas simultaneamente amostras de sangue e leite materno. As concentrações de nifedipino plasmáticas e no leite materno foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV). O método de determinação do nifedipino no plasma foi linear no intervalo de 10 a 150 ng/mL e no leite de 5 a 100 ng/mL. Os métodos mostraram detectabilidade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade compatíveis com a determinação do nifedipino em pacientes em uso crônico do fármaco. A concentração de nifedipino no plasma das lactantes variou de 11,8 a 178,1 ng/mL (mediana: 46,0 ng/mL). A concentração no leite materno humano foi similar à encontrada no plasma, variando de 5,2 a 93,8 ng/mL (mediana: 13,9 ng/mL). Não houve correlação positiva entre a concentração de nifedipino no plasma e no leite materno ($p=0,3936$). A razão de concentrações leite/plasma variou de 0,06 a 2,52 e não apresentou correlação com o índice de massa corpóreo ($p=0,6290$), idade ($p=0,1071$) ou *clearance* de creatinina ($p=0,4427$). Não houve influência de ABCG2 421C>A nas 15 pacientes investigadas na razão L/P, mas a investigação de um número maior de pacientes é necessária para concluir essa análise.

Palavras-chave: Nifedipino. Leite materno. Lactantes. CLAE-UV.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the transfer rate of nifedipine to breast milk in steady state in hypertensive lactant women, treated with 20 mg controlled release nifedipine every 12 hours. Our working hypothesis was that the genetic polymorphism ABCG2 c.421C>A could alter the breast milk/plasma concentration ratio (M/P) of nifedipine in carriers of at least one mutant allele. Fifteen (15) lactant patients from the Gynecologic and Obstetrics Service of Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de Sao Paulo, were investigated. In the period of 15 to 30 days after labor and at least 15 days on nifedipine treatment (steady state), blood and breast milk samples were simultaneously collected. The concentrations of nifedipine in plasma and in breast milk were analyzed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). The method of nifedipine determination in plasma was linear, in the range of 10 to 150 ng/mL and in breast milk in the range of 5 to 100 ng/mL. These methods showed detectability, linearity, precision, accuracy and stability compatible with the determination of nifedipine in chronic users of the drug. The plasma concentration of nifedipine in lactant patients varied from 11.8 to 17 ng/mL (median: 46.0 ng/mL). The breast milk nifedipine concentration was similar to plasma levels, varying from 5.2 to 93.8 ng/mL (median: 13 ng/mL). There was no positive correlation between breast milk and plasma concentrations ($p=0.3936$). The ratio breast milk/plasma nifedipine concentrations showed no correlations with the body mass index ($p=0.6290$), age ($p=0.1071$) or creatinine clearance ($p=0.4427$). There was no influence of ABCG2 421C> A on the 15 patients investigated in the M/P ratio, but the investigation of a larger number of patients is necessary to complete this analysis

Key-words: Nifedipine. Breast milk. Lactant. HPLC-UV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do nifedipino: uma diidropiridina com um substituinte aromático na posição 4	17
Figura 2 – Aumento do número de ABCG2/BCRP na célula epitelial dos alvéolos da glândula mamária quando em fase de lactação.....	19
Figura 3 – Estudo do tamanho amostral (grupo experimental) em relação ao poder do teste.....	22
Figura 4 – Diagrama de Fluxo CONSORT (<i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>)	23
Figura 5 – Procedimento de extração líquido-líquido do nifedipino em plasma humano.....	27
Figura 6 – Procedimento de extração em fase sólida do nifedipino em leite materno humano.....	29
Figura 7 – Cromatogramas referentes à extração em plasma humano.....	34
Figura 8 – (A) Curva analítica em triplicata do método de análise do nifedipino em plasma humano por CLAE-UV no intervalo de concentrações de 10 a 150 ng/mL de plasma. (B) Plote da porcentagem de erro versus concentração.....	35
Figura 9 – Cromatogramas referentes à extração do nifedipino em leite materno Humano.....	38
Figura 10 – (A) Curva analítica do método de análise do nifedipino em leite humano no intervalo de concentrações de 5 a 100 ng/mL de leite. (B) Plote da porcentagem de erro versus concentração do método de análise do nifedipino em leite materno por CLAE-UV.....	39
Figura 11 – Influência de ABCG2 c.421C>A na razão da concentração do nifedipino no leite/plasma maternos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABC – ATP-binding cassette transporters
ALT – Alanina aminotransferase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA – Antagonistas de receptor de angiotensina
AST – Aspartato aminotransferase
BCRP – *breast cancer resistance protein*
CIUR – crescimento intra-uterino retardado
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CONSORT – *consolidated standards of reporting trials*
CQA – controle de qualidade de alta concentração
CQB – controle de qualidade de baixa concentração
CV – coeficiente de variação
DGO – departamento de ginecologia e obstetrícia
EPR – Erro Padrão Relativo
FCF – faculdade de ciências farmacêuticas
FDA – *food and drug administration*
HCFMRP – Hospital Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IECA – inibidores da enzima conversora de angiotensina
IG – idade gestacional
LIQ – limite inferior de quantificação
L/P – leite/plasma
LSQ – limite superior de quantificação
MAPA – monitoramento ambulatorial da pressão arterial
PA – pressão arterial
PI – padrão interno
SBH – Sociedade Brasileira de Hipertensão
SC – superfície corporal
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido
 t_R – Tempo de Retenção
UNESP – Universidade Estadual Paulista
UPC – unidade de pesquisa clínica
U.S. – *United States*

USP – Universidade de São Paulo

UV – ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Hipertensão durante a gestação	12
1.2. Transferência de fármacos para o leite materno	15
1.3. Nifedipino	16
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
3.1.1. Critérios de inclusão	25
3.1.2. Critérios de exclusão	27
3.2. Protocolo Clínico	27
3.3. Análise do nifedipino em plasma e leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta	28
3.3.1. Condições cromatográficas	28
3.3.2. Preparo das soluções padrão	28
3.3.2.1. Plasma	28
3.3.2.2. Leite Materno	29
3.3.3. Processamento da amostra	29
3.3.3.1. Plasma	29
3.3.3.2. Leite materno	31
3.3.4. Validação	33
3.3.4.1. Seletividade	33
3.3.4.2. Efeito Residual	33
3.3.4.3. Linearidade	34
3.3.4.4. Precisão e exatidão	34
3.3.4.5. Recuperação	35
3.3.4.6. Estabilidade	35
3.3.4.6.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	35
3.3.4.6.2. Estabilidade de curta duração	36
3.3.4.6.3. Estabilidade de pós-processamento	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Validação dos métodos bioanalíticos para plasma e leite materno	37
4.1.1 Plasma	37
4.1.2 Leite materno	41
4.2 Etapa Clínica	46
5. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (parecer nº1.317.466).....	60
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP-HCFMRP (parecer nº 1.332596).....	67
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão durante a gestação

Uma das principais causas de mortes maternas em países desenvolvidos e em desenvolvimento são as síndromes hipertensivas. De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), a primeira causa de morte materna direta no Brasil é a hipertensão durante o período gestacional, correspondendo a 37% dos casos (MAGEE & von DADELSZEN, 2004; LAURENTI et al., 2004; SBH, 2010).

A hipertensão arterial na gestação é definida como a pressão sanguínea maior ou igual a 140/90 mmHg (BETHESDA, 2000; SBH, 2013), em duas aferições separadas por 4 ou 6 horas ao menos (SOLOMON & SELLY, 2011; SBH, 2013). Outra maneira de diagnosticar hipertensão na gestação é através do exame de Monitoramento Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA) realizado durante 24 horas (SBH, 2013). A hipertensão arterial durante a gravidez pode levar a complicações perinatais, como restrição do crescimento fetal, deslocamento prematuro da placenta e morte fetal (JAIN, 1997).

Os quadros hipertensivos podem ser classificados como hipertensão crônica ou pré-existente; hipertensão gestacional; pré-eclâmpsia; eclampsia e hipertensão pré-natal não classificável (NHLBI, 2000; NHLBI, 2004; SBH, 2013).

A **hipertensão pré-existente ou crônica** é a hipertensão que precede a gestação, ou que inicia antes da vigésima semana de gestação (BETHESDA, 2000; KATTAH & GAROVIC, 2013; SBH, 2013) e que não termina antes de doze semanas após o parto (NHLBI, 2004). Pode estar associada a proteinúria e também é considerada hipertensão crônica aquela diagnosticada pela primeira vez durante a gestação mas que não termina após o parto (SBH, 2013). O risco para exacerbação da hipertensão arterial crônica durante a gestação depende da gravidade da hipertensão associada ou não a outros fatores, como, obesidade, diabetes tipo 2, doença renal e a utilização ou não de medicamentos anti-hipertensivos durante a gestação (SIBAI, 2001).

A **hipertensão gestacional** se refere ao quadro hipertensivo induzido pela gestação sem proteinúria. Neste caso, a hipertensão inicia-se após a vigésima semana de gestação e normaliza até 42 dias pós-parto. Se associada a proteinúria significativa (300 mg/L, 500 mg/24h ou 2+) é classificada em pré-eclâmpsia.

O diagnóstico clínico de **pré-eclâmpsia** pode ser dado de acordo com os sintomas presentes na mãe (hipertensão, proteinúria e/ou sintomas variados), e também através de síndromes fetais como o crescimento intra-uterino retardado (CIUR), ou ainda ambos (SIBAI, 2008). Ela ocorre em 5% a 8% das gestações e é a principal causa de morte materna e perinatal nos países em desenvolvimento, sendo que os resultados gestacionais dependem da idade gestacional (IG) em que a doença é diagnosticada, da gravidade da doença, da qualidade do atendimento e da presença de outras doenças pré-existentes (SIBAI, 2005).

A **eclampsia** é o surgimento de convulsões em pacientes com pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional. Este quadro está associado ao aumento da mortalidade materna e é frequentemente acompanhado de hemorragia cerebral (SIBAI, 2005).

Por fim, a **hipertensão pré-natal não classificável** é aquela diagnosticada após a vigésima semana de gestação sem confirmação de valores prévios. Após a gestação é reclassificada como hipertensão gestacional com ou sem proteinúria ou reclassificada como hipertensão pré-existente ou crônica (SBH, 2013).

O fármaco de primeira escolha para o tratamento da hipertensão crônica durante o período gestacional é o α -metildopa por apresentar larga margem de segurança. O seu uso a longo prazo não foi associado a alterações fetais ou neonatais, porém, não é indicado para gestantes com histórico de depressão devido ao seu efeito sedativo. Quando a paciente tem intolerância ao α -metildopa, ou quando o tratamento é insuficiente para o controle da hipertensão, são utilizados os fármacos de segunda escolha, como nifedipino e hidralazina (SIBAI, 1996; JAMES & PIERCY, 2004; MUGO et al., 2005; PODIMOW & AUGUST, 2011). O nifedipino é segura e amplamente utilizada durante a gestação. Entretanto, apresentações sublinguais podem causar hipoperfusão placentária (MAGEE et al., 1999; BROWN et al., 2000). Em estudo realizado em gestantes com pré-eclâmpsia que receberam nifedipino versus placebo, houve significativa redução na pressão arterial das pacientes, bem como nos valores de creatinina plasmática, ureia e proteinúria de 24 horas, sem a redução do fluxo sanguíneo da artéria umbilical (KATTAH & GAROVIC, 2013).

A agência americana U.S. FDA (*United States Food and Drug Administration*) propôs classificação de risco para os fármacos anti-hipertensivos utilizados durante a gestação e a lactação (Tabela 1). O risco do uso de anti-hipertensivos na gestação

leva em consideração que na gestação esses medicamentos não devem comprometer o fluxo sanguíneo uteroplacentário (MUGO et al., 2005). Segundo o estudo de Bayliss e colaboradores, os neonatos das gestantes tratadas com atenolol até o terceiro mês de gestação tiveram pesos significativamente menores do que os neonatos das gestantes que foram tratadas com bloqueadores de canais de cálcio (BAYLISS et al., 2002). Na classificação proposta pelo U.S. FDA, o atenolol recebe a notação X.

Tabela 1 - Classificação de risco dos medicamentos anti-hipertensivos utilizados na gestação e na lactação segundo o FDA.

Classe	Medicamentos	Significado
A	Não há registros na literatura.	Estudos controlados em mulheres não demonstram risco para o feto no primeiro trimestre, não havendo evidência de risco nos demais.
B	Pindolol, sotalol, clortalidona, amilorida.	Estudos em animais não demonstraram risco fetal e não existem estudos controlados em mulheres no primeiro trimestre, não havendo evidência de risco nos demais.
C	Nifedipino, hidralazina, nitroprussiato de sódio, diazóxido, metildopa, clonidina, propranolol, metoprolol, esmolol, verapamil, furosemida, bumetanida, hidroclorotiazida, espironolactona.	Estudos em animais não revelaram risco fetal, mas não há estudos controlados em mulheres nem em animais, e a droga deve ser administrada quando o risco potencial justificar o benefício.
D	Atenolol	Há evidência de risco fetal em humanos, mas os benefícios são aceitáveis, apesar dos riscos.
X	*IECA, ARA**	Estudos em animais e humanos demonstraram anormalidades fetais, sendo a droga contraindicada em mulheres que estão ou querem se tornar gestantes.

*IECA: Inibidores da enzima conversora de angiotensina.

**ARA: Antagonistas de receptor de angiotensina II.

1.2. Transferência de fármacos para o leite materno

O leite materno é o melhor alimento que pode ser oferecido para o lactente devido à disponibilidade de nutrientes e substâncias imunoativas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, (*WHO* da sigla em inglês “*World Health Organization*”), a alimentação do recém-nascido deve ser iniciada dentro da primeira hora do seu nascimento, uma vez que nesta fase a mãe produz o colostro, que é considerado um alimento perfeito para o bebê.

A prática da amamentação deve ser estendida até os dois anos de idade, sendo que a partir dos seis meses a lactante pode complementar a alimentação da criança com outros alimentos (DEL CIAMPO et al., 2007; WHO, 2016). Apesar da excelência do leite materno é muito comum a recomendação médica de suspensão da amamentação na vigência de tratamento medicamentoso da nutriz em função da ausência de informações sobre o risco de exposição da criança durante o período de lactação (CHAVES, 2007; BRASIL, 2010; SACHS, 2013).

Fundamentalmente todos os fármacos podem ser excretados para o leite humano, sendo que, para a maioria deles o transporte ocorre por difusão passiva. A exposição de lactentes a fármacos presentes no leite materno dependerá essencialmente dos seguintes fatores: peso molecular, biodisponibilidade oral do fármaco no trato gastrointestinal do lactente, concentração no plasma materno, lipossolubilidade, grau de ionização e afinidade às proteínas plasmáticas (COSTA & DOMICIANO, 2008; ROWE et al., 2013).

A exposição do lactente pelo leite materno é estimada quantitativamente a partir de algumas medidas como a razão leite/plasma e a dose relativa no lactente. A razão leite/plasma consiste na razão entre a concentração do fármaco no plasma e no leite materno em estado de equilíbrio. A dose relativa no lactente é uma estimativa da percentagem da concentração do fármaco transferida para o lactente através do leite materno (BRASIL, 2010).

Para o atenolol e metoprolol, a razão de concentração leite/plasma é acima de 3. Entretanto as quantidades de atenolol e metoprolol acumuladas no leite materno não foram associadas a efeitos adversos nos lactentes (WHITE, 1985; HO et al., 1999; EYAL et al., 2011). De acordo com Michael (1979), para uma paciente tratada com 400 mg de labetalol diariamente durante cinco semanas a concentração do labetalol no leite materno após três dias do parto é 29 ng/ml. Para o propranolol,

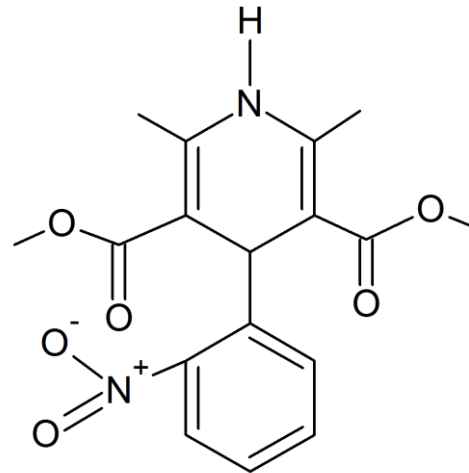
a razão de concentração leite/plasma é de 0,43 (BAUER et al., 1981). O labetalol e o propranolol possuem baixas concentrações no leite materno, embora o propranolol possua relativa solubilidade em lipídios (ATKINSON & BEGG, 1990). Os níveis de diuréticos tiazídicos são considerados baixos e seguros, porém estes agentes parecem estar relacionados à redução na produção do leite materno (HEALY, 1961; WHITE, 1985). Os bloqueadores de canais de cálcio como o nifedipino são transportados para o leite materno, porém, não causam efeitos adversos aos lactentes (PODYMOW & AUGUST, 2011).

A concentração de captopril mensurada no leite materno foi 1% da concentração calculada no plasma. A dose relativa do captopril para um lactente de 5 kg é de aproximadamente 4,7 µg ou 0,9 µg/kg por dia (DEVLIN & FLEISS, 1981). O metabólito ativo do enalapril (enalaprilato) é encontrado em concentrações clinicamente insignificantes no leite materno. Para um lactente que consuma de 500 mL a 850 mL de leite materno por dia, a dose total de enalaprilato transmitida a ele através do leite será 2 µg ao dia (SHANNON et al., 2000).

1.3. Nifedipino

O nifedipino (2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo, protótipo do grupo das diidropiridinas, é um bloqueador dos canais de cálcio usado no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca e arritmia cardíaca (Figura 1). Seu mecanismo de ação se dá por inibição do influxo de íons de cálcio pela membrana das células da musculatura lisa de vasos e do coração, sem alterar as concentrações de cálcio no soro. Possui ação vasodilatadora das artérias coronarianas e é um dos principais medicamentos utilizados para o tratamento de gestantes hipertensas crônicas em função da sua atividade inibidora da liberação do hormônio antidiurético e redução da resistência vascular sistêmica (SOUSA et al., 2006; GARBACZ, et al., 2009; PODYMOW & AUGUST, 2011; GIANNUBILO et al., 2012; BRUNTON, 2012).

Figura 1 – Fórmula estrutural do nifedipino: uma diidropiridina com um substituinte aromático na posição 4.



A farmacocinética do nifedipino é caracterizada por grande variabilidade individual, principalmente com relação às concentrações plasmáticas (EHRENKRANZ, et al., 1989; MANNINEN & JUHAKOSKI, 1991; SOONS et al., 1992; ITO et al., 2015). O início da ação do nifedipino após administração oral de comprimidos de liberação normal é de vinte minutos e após administração sublingual é de um a cinco minutos (PAPATSONIS et. al, 2001; KATZUNG, 2012). Sua meia-vida varia de 1,3 h para cápsulas administradas por via oral a 15,2 h após a administração oral de comprimidos de liberação controlada. O nifedipino é absorvida principalmente a partir do jejuno e sua biodisponibilidade oral varia de 45 a 70% (KATZUNG, 2012) em função do metabolismo pré-sistêmico não linear (SCHELLENS et al., 1991; ABOU-AUDA, et. al., 2000).

O nifedipino é biotransformado principalmente pela isoforma 3A4 do citocromo P450 (CYP3A4) com formação dos metabólitos polares e inativos deidronifedipino (M-0), ácido 2,6-dimetil-4-(-nitrofenil)-5-metoxicarbonil-3-piridinocarboxílico (M-I) e o correspondente ácido 2-hidroximetil-piridinocarboxílico (M-II). Cerca de 70 a 80% desses metabólitos são excretados pelos rins e o restante é excretado nas fezes (ABOU-AUDA et. al, 2000; PAPATSONIS et. al, 2001).

Um estudo realizado em onze gestantes hipertensas relatou concentrações de nifedipino de liberação normal no estado de equilíbrio no soro materno, no soro umbilical e no líquido amniótico de $12,4 \pm 4,0$, $8,6 \pm 2,3$ e $2,5 \pm 1,2$ ng/ml, respectivamente. Em seis mulheres que tomaram 10 mg de nifedipino de liberação normal, três vezes ao dia, os níveis de concentração do fármaco no leite materno

variaram de menos que 1 a 10,3 µg/L em momentos variados entre 1 e 8 horas após a dose, com uma média de 3,5 µg/L (MANNINEN & JUHAKOSKI, 1991). O clearance do nifedipino em gestantes hipertensas ($2,0 \pm 0,8$ L/h/kg) é maior se comparado a voluntários sadios ($0,49 \pm 0,09$ L/h/kg) (PREVOST et al., 1992).

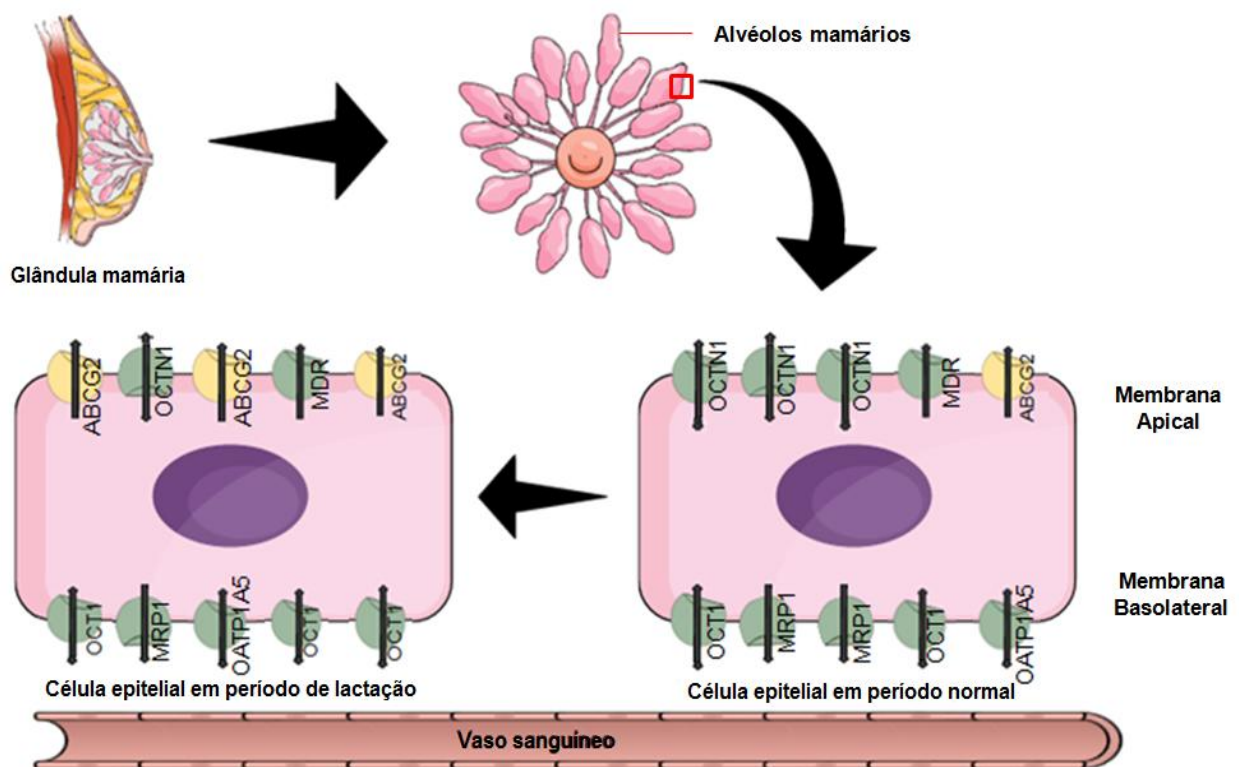
De acordo com a *American Academy of Pediatrics* (2001) o nifedipino é compatível com a amamentação. Em seu livro, Dr. Hale classificou os medicamentos em categorias de risco para uso a lactação. Os de nível 1 (L1) são os mais seguros, enquanto que os de nível 5 (L5) são os contra-indicados. O nifedipino foi classificada como nível 2 (L2), sendo considerada segura. Os de nível 3 (L3) são considerados moderadamente seguros e os de nível 4 (L4) são considerados possivelmente perigosos (HALE, 2008).

Após um parto pré-termo em vinte e seis semanas de gestação, uma lactante hipertensa foi tratada por via oral com nifedipino de liberação normal na dose de 30 mg a cada 8 horas por 48 horas. Em seguida, 20 mg a cada 8 horas por 48 horas e, em sequência, 10 mg a cada 8 horas por 36 horas. As concentrações do nifedipino no leite materno foram relacionadas com a dosagem administrada do fármaco e o intervalo de tempo entre a dose e a coleta do leite materno. Foram observadas concentrações de 53,35 ng/mL 30 minutos após dose de 30 mg, 16,35 ng/mL 1 hora após 20 mg e 12,89 ng/ml 30 minutos após 10 mg. A meia-vida do nifedipino no leite após as três doses foram 2,4 horas (30 mg), 3,1 horas (20 mg), e 1,4 horas (10 mg). A quantidade de nifedipino não teve nenhum efeito na composição do leite materno (EHRENKRANZ et al., 1989; BRIGGS et al., 2002).

O envolvimento de transportadores na transferência de fármacos do sangue para o leite materno foi inicialmente descrito por Jonker e colaboradores (JONKER et al., 2005). O transportador ABCG2/BCRP, membro da família dos transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette transporters), foi inicialmente descrito como fator de resistência de células de câncer de mama para o tratamento com adriamicina e, portanto, recebeu o nome de proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP, da sigla em inglês para *Breast Cancer Resistance Protein*). Tratam-se de transportadores presentes nas células do epitélio alveolar da glândula mamária cuja expressão aumenta significativamente durante a lactação (Figura 2) (JONKER et al., 2005; FROMM e KIM, 2004). Ensaios realizados em células de alta expressão de ABCG2/BCRP identificaram as 1,4-dihidropiridinas, nicardipina e nifedipino, como

substratos de ABCG2/BCRP. Os autores ressaltam que por ser substrato do transportador, o nifedipino apresenta potencial risco de exposição dos lactentes ao nifedipino decorrente da excreção e acúmulo do fármaco no leite materno (SHUKLA et al., 2006). Recentemente, ensaios de transporte *in vitro* em monocamadas celulares mostraram um avanço na previsibilidade da transferência de fármacos para o leite, principalmente com relação aos substratos de ABCG2/BCRP (ITO et al., 2015).

Figura 2 – Aumento do número de ABCG2/BCRP na célula epitelial dos alvéolos da glândula mamária quando em fase de lactação.



Fonte: Elaborado pelo autor através do site: <https://mindthegraph.com>, acesso em jan.2017.

Ensaios realizados em células de alta expressão de ABCG2/BCRP identificaram as 1,4 dihidropiridinas, nicardipina e nifedipino, como substratos de ABCG2/BCRP. Os autores ressaltam que por ser substrato do transportador, o nifedipino apresenta potencial risco de exposição aos lactentes decorrente da excreção e acúmulo do nifedipino no leite materno (SHUKLA et al., 2006).

Os substratos de ABCG2/BCRP incluem ainda substâncias endógenas (ácido fólico, vitamina K3, riboflavina, ácido úrico, estradiol 17 β glicuronídeo e sulfato de

dehidroepiandrosterona) e fármacos como os antiretrovirais (abacavir, aciclovir, lamivudina e zidovudina), estatinas (atorvastatina, cerivastatina, pravastatina, pitavastatina e rosuvastatina), antimicrobianos (ciprofloxacino, nitrofurantoína e norfloxacino), bloqueadores de canais de cálcio (diidropiridina, nitrendipina e azidopina), fármacos usados no tratamento do câncer (topotecan, irinotecan, etoposídeo) entre outros (sulfóxido de albendazol, cimetidina, gliburida, diclofenaco e sulfasalazina) (MERINO et al., 2005; WANG & MORRIS, 2007; zu SCHWABEDISSEN & KROEMER, 2011).

O gene que codifica o transportador ABCG2/BCRP está localizado no cromossomo 4q22, entre os marcadores D4S2462 e D4S1557 (ALLIKMETS et al., 1998). O transportador ABCG2/BCRP é expresso não apenas nas glândulas mamárias, mas também na membrana apical dos enterócitos, na membrana sinusoidal dos hepatócitos, nos rins, testículos, placenta e barreira hematoencefálica (DOYLE et al., 1998; MALIEPAARD et al., 2001; SCHWABEDISSEN & KROEMER, 2011). A atividade do transportador nesses tecidos tem sido estudada por diversos autores que investigam o papel de ABCG2/BCRP na absorção, distribuição e eliminação de fármacos (DOYLE, et al. 1998; TANAKA, et al. 2004; MERINO et al., 2005). De fato, esses transportadores parecem estar envolvidos com o acúmulo de fármacos no leite materno. Os camundongos *knockout* para ABCG2/BCRP apresentaram transferência reduzida dos substratos aciclovir, cimetidina e nitrofurantoina para o leite materno (JONKER et al., 2005). O transportador ABCG2/BCRP parece estar envolvido ainda na transferência de riboflavina (vitamina B2) para o leite materno sendo que a razão plasma:leite reduziu 22 vezes em animais *knockout* para o transportador (van HERWARDEEN et al., 2007). Um estudo recente revela que durante a lactação, os níveis de RNAm de ABCG2/BCRP encontram-se aumentados nas glândulas mamárias de camundongos e a razão de concentração leite/plasma da cimetidina e aciclovir diminuiu significativamente em camundongos *knockout* para ABCG2/BCRP (ITO et al., 2014). Recentemente, ensaios de transporte *in vitro* em monocamadas celulares mostraram um avanço na previsibilidade da transferência de fármacos para o leite, principalmente com relação aos substratos de ABCG2/BCRP (ITO et al., 2015).

Estudos clínicos demonstram que polimorfismos do gene ABCG2/BCRP podem interferir na atividade do transportador. O polimorfismo de base única

c.421C>A, cuja frequência do alelo raro (A) é de 8% a 12% na população caucasiana, está associado a menor expressão de ABCG2/BCRP na placenta humana, bem como aumento dos níveis plasmáticos de bicalutamida (KOBAYASHI et al., 2005, HO et al., 2007; KIM et al., 2015). Embora não exista nenhum efeito significativo associado entre o genótipo c.421C>A do transportador ABCG2/BCRP e a farmacocinética dos fármacos imatinibe (GARDNER et al., 2006), pravastatina (HO et al., 2007) e nitrofurantoína (ADKISON et al., 2008), estudos clínicos em farmacogenética demonstram aumento significativo na AUC dos substratos de ABCG2/BCRP atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina (ZHANG et al., 2006), sinvastatina, sulfasalazina, sunitinib em indivíduos homozigotos para o alelo mutante no polimorfismo c.421C>A (421AA) se comparados com os indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (421CC) (YAMASAKI et al., 2008; TANAKA et al., 2015); sendo que para a rosuvastatina, houve uma redução maior nos níveis de colesterol LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) em pacientes homozigotos para o alelo mutante (6,9%) quando comparados com pacientes que não possuíam polimorfismos (TOMLINSON et al., 2010). Li e colaboradores (2005) demonstraram em um estudo farmacocinético que há um aumento na concentração plasmática do gefitinibe em pacientes que carregam ao menos um alelo mutante na posição 421 e que este aumento parece estar associado a reações adversas de diarreia em pacientes tratados com 250mg do fármaco por via oral (LI et al., 2005; CUSATIS et al., 2006). Após administração intravenosa de diflomotocan, os pacientes heterozigotos para o polimorfismo c.421C>A tiveram um aumento significativo na concentração plasmática e na AUC do fármaco quando comparados com pacientes homozigotos para o alelo selvagem. Em contrapartida, houve uma significativa diminuição na biodisponibilidade oral para o grupo mutado heterozigoto (SPARREBOOM, et al., 2004).

Este mesmo polimorfismo c.421C>A está relacionado com o aumento da biodisponibilidade oral do substrato de ABCG2/BCRP topotecan, bem como com a diminuição na AUC após administração intravenosa do fármaco (SPARREBOOM et al., 2005). A mutação 482R>G de arginina para glicina no transportador ABCG2/BCRP pode aumentar o efluxo de etoposídeo, ocasionando em maior resistência ao tratamento com este fármaco (EDDABRA et al., 2012). Indivíduos portadores do polimorfismo 1465T>C apresentam maior risco de desenvolver

reações adversas ao substrato de ABCG2/BCRP telmisartan (DEPPE et al., 2014). Existem vários estudos *in vivo* que demonstram o impacto farmacocinético das variações genéticas do transportador ABCG2/BCRP (Tabela 2). Porém, nenhum desses estudos demonstram o impacto de polimorfismos do transportador na disposição cinética do nifedipino *in vivo* (FROMM & KIM, 2004).

Tabela 2 – Impacto das variações genéticas de ABCG2/BCRP na disposição cinética de fármacos.

Polimorfismos	Substrato	Efeito	Referência
421C>A 34G>A	Irinotecan	Sem alterações na disposição cinética do SN 38 (metabólito do Irinotecan); fator preditivo para diarreia grau III.	HAN et al., 2007
15994C>T (rs7699188)	Imatinibe	↑ expressão de ABCG2/BCRP em vários tecidos ↑ clearance do imatinibe	POONKUZHALI et al., 2008
421C>A	Sulfasalazina (revestimento entérico)	Sem alterações na cinética dos metabólitos da sulfasalazina Sem influência dos inibidores pantoprazol e famotidina	ADKISON et al., 2010
421C>A	Sulfasalazina (liberação imediata)	↑AUC, ↑C _{max} , ↓clearance em homozigotos para o alelo raro	YAMASAKI et al., 2008
421C>A	Rosuvastatina	↑AUC, ↑C _{max} , ↓eliminação oral	ZHANG et al., 2006.
421C>A	Rosuvastatina	↑144%AUC ^{0-∞} e ↑131% C _{max} em homozigotos para o alelo raro	KESKITALO et al., 2009
421C>A	Pravastatina	Sem alterações na disposição cinética	KESKITALO et al., 2009

Considerando que o nifedipino é indicado para o tratamento da hipertensão na gestação e lactação, que sua farmacocinética é caracterizada por grande variabilidade, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a transferência do nifedipino para o leite materno em lactantes hipertensas e investigar potenciais covariáveis deste processo.

2. OBJETIVOS

Avaliar a razão de concentração de nifedipino no leite/plasma materno em lactantes hipertensas atendidas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente projeto incluem:

- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação das concentrações de nifedipino em plasma e no leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliação das variáveis demográficas e clínicas (peso, altura, índice de massa corpóreo, exames bioquímicos e hematológicos, comorbidades, uso de medicamentos) das pacientes lactantes hipertensas incluídas no estudo.
- Avaliação do polimorfismo genético c.421C>A de ABCG2/BCRP e sua influência na razão de concentração do nifedipino no leite/plasma materno.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

O presente projeto de pesquisa teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (parecer nº 1.317.466 – Anexo A) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP-HCFMRP (parecer nº 1.332596 – Anexo B). A inclusão das participantes no estudo se deu após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). Foi garantida a liberdade dos participantes da pesquisa em recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa, sem penalização ao seu tratamento ou atendimento hospitalar.

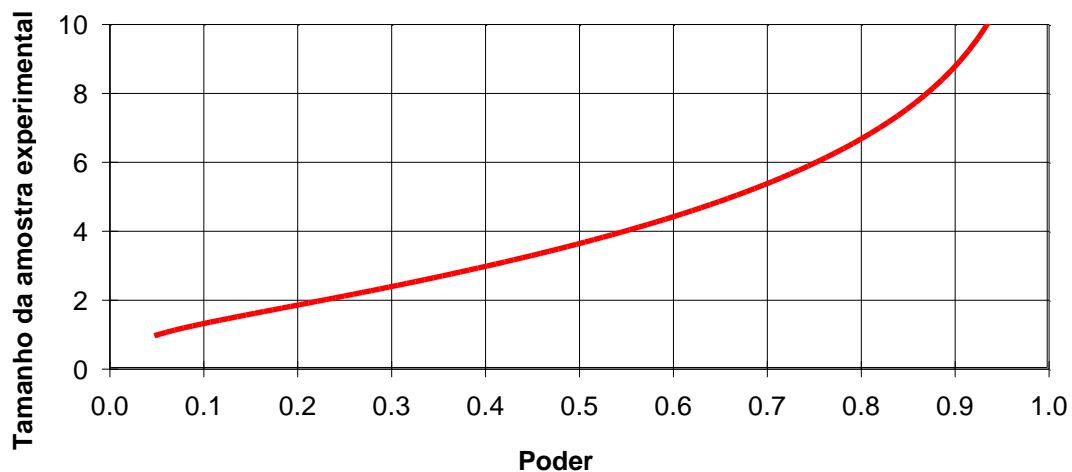
A etapa clínica do presente projeto foi desenvolvida sob a coordenação dos Professores Dr. Geraldo Duarte, Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (DGO-FMRPUSP) e Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli, Professor Associado do DGO-FMRPUSP.

3.1.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation* versão 2.1.30 (DUPONT & PLUMMER, 1997) com base na variabilidade da concentração de nifedipino no leite materno previamente estudada em gestantes hipertensas (MANNINEN & JUHAKOSKI, 1991). Neste estudo a média \pm desvio padrão da concentração do nifedipino no leite materno em estado de equilíbrio foi $4,1 \pm 0,8$ ng/mL após a administração de nifedipino 10 mg, três vezes ao dia. Nossa hipótese de trabalho foi a de que o polimorfismo genético ABCG2 c.421C>A iria alterar em pelo menos 25% a concentração de nifedipino no leite das lactantes portadoras de pelo menos um alelo raro. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em 5%, poder de 0,80. Estabeleceu-se uma alocação 3,35:1 (Controle *versus* mutado) considerando a frequência do polimorfismo ABCG2 c.421C>A de aproximadamente 12% (REFARGEN, 2016; KOBAYASHI et al., 2005). Como pode ser observada, a inclusão de 7 lactantes no grupo experimental, constituído por pacientes portadores de pelo menos um alelo

raro (homozigotos mutantes + heterozigotos), iria acarretar em poder do teste acima de 80%. A Figura 3 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral do grupo experimental. Foi calculado o tamanho amostral de 30 lactantes hipertensas em uso de nifedipino no total (Grupo Controle + Experimental). Considerando o total de 30 pacientes incluídos no estudo e com base na frequência alélica do polimorfismo ABCG2 c.421C>A, espera-se encontrar dentro do total 30 pacientes, 7 pacientes no grupo experimental e 23 pacientes no grupo controle.

Figura 3 – Estudo do tamanho amostral (grupo experimental) em relação ao poder do teste

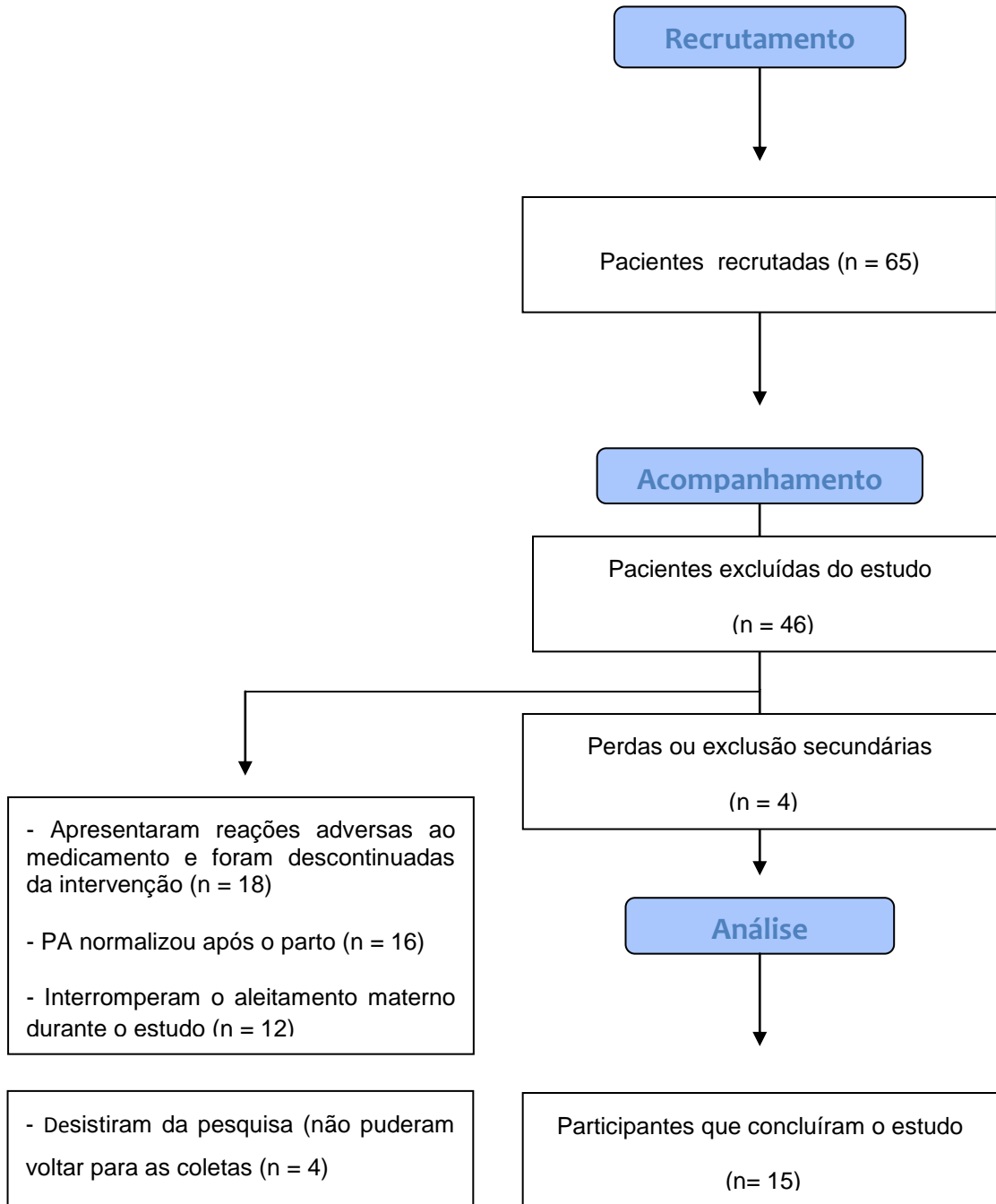


Fonte: Extraído do programa *Power and Sample Calculation* versão 2.1.30 (DUPONT & PLUMMER, 1997).

3.1.1. Critérios de inclusão

Foram investigadas lactantes com hipertensão crônica (n=65) que não faziam uso de inibidores de ABCG2/BCRP (omeprazol, pantoprazol, ritonavir, saquinavir, imatinibe, efavirenz, nicardipina, abacavir, tacrolimus, ciclosporina A, canabidiol) uma vez que esse transportador parece interferir na transferência do nifedipino para o leite materno; pacientes que não possuíam nefropatias ou hepatopatias crônicas com idade de 18 a 45 anos. As pacientes foram recrutadas durante o período da gestação no Ambulatório de Gravidez de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC-FMRPUSP enquanto faziam o acompanhamento pré-natal (Figura 4).

Figura 4 – Diagrama de Fluxo CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*).



Fonte: Elaborado pelo autor baseado no diagrama de fluxo CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*). PA: pressão arterial.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as pacientes que apresentaram reações adversas ao medicamento (n=18); as pacientes cuja pressão arterial normalizou após o parto (n=16); as pacientes que interromperam o aleitamento materno durante a realização do estudo (n=12); e houve perdas das pacientes que não concordaram com o retorno ou que não tinham condições de retornar ao hospital para a realização do protocolo clínico (n=4) (Figura 4).

3.2. Protocolo Clínico

As gestantes com hipertensão arterial crônica incluídas na investigação foram submetidas à avaliação clínica (história médica e exame físico) e só foram incluídas no estudo após receberem informações sobre o protocolo clínico assim como os seus possíveis riscos, e após concordarem em participar do estudo assinando o TCLE.

No período de quinze a trinta dias pós-natal, durante a lactação, as lactantes hipertensas em uso de nifedipino (Adalat Retard[®], lote: BXH85G1, Bayer) foram convidadas a comparecerem à Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HC-FMRPUSP em jejum de oito horas, para a coleta das seguintes amostras:

1. sangue venoso em tubo contendo heparina (6 mL) para análise da concentração plasmática de nifedipino;
2. sangue venoso em tubo sem anticoagulante (4 mL) para a determinação de parâmetros bioquímicos (AST, ALT, albumina, ureia, creatinina sérica, glicemia);
3. leite materno em volume de até 10 mL.

O clearance de creatinina foi determinado pela equação de Cockcroft e Gault (equação 1) corrigida pela superfície corporal (SC) de 1,73 m² (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

$$\text{Clearance de creatinina} = \frac{(140 - \text{idade}) \times \text{peso}}{72 \times \text{creatinina sérica}} \times \frac{1,73}{SC} \quad (1)$$

Após a coleta das amostras as pacientes receberam café da manhã na UPC do HC-FMRPUSP. As amostras de sangue para a análise da concentração plasmática de nifedipino foram centrifugadas imediatamente após a coleta. O plasma

obtido após a centrifugação, bem como as amostras de leite materno foram armazenadas a -70° C até o momento da análise.

3.3. Análise do nifedipino em plasma e leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta

3.3.1. Condições cromatográficas

O padrão nifedipino foi adquirido da Sigma Aldrich[®] (98%, St Lous, MO, EUA). Os solventes metanol e éter dietílico são grau CLAE e os reagentes hidróxido de sódio (Synth[®], Diadema, Brasil), fosfato de potássio monobásico (Synth[®], Diadema, Brasil) e hidrogenofosfato dissódico (Synth[®], Diadema, Brasil) são grau analítico. Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Mili-Q Plus (Milipore[®], Belford, MA, EUA).

A análise do nifedipino no plasma e no leite materno foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV), utilizando cromatógrafo Perkin Elmer, composto de um sistema quaternário de bombas Flexar LC Pump e detector Flexar UV/VIS, operando no comprimento de onda de 238 nm. Foi utilizada a coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 capeada (5 µm, 125x4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato 0,020 mol/L (pH 4,8):metanol na proporção 40:60 (v/v) para a análise em plasma e na proporção 35:65 (v/v) para a análise em leite materno na vazão de 1 mL/min.

As análises foram realizadas em sala com o auxílio de luz amarela e todas as amostras foram mantidas em condições de proteção da luz em função da fotossensibilidade do nifedipino (MARTENS et al., 1994).

3.3.2. Preparo das soluções padrão

3.3.2.1. Plasma

A solução padrão estoque nifedipino foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol. A partir dessa solução foram realizadas sucessivas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 200, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 ng/mL de metanol. O padrão interno diazepam foi preparado na

concentração de 1 mg/mL em metanol e posteriormente diluído na concentração de 1500 ng/mL em metanol.

3.3.2.2. Leite Materno

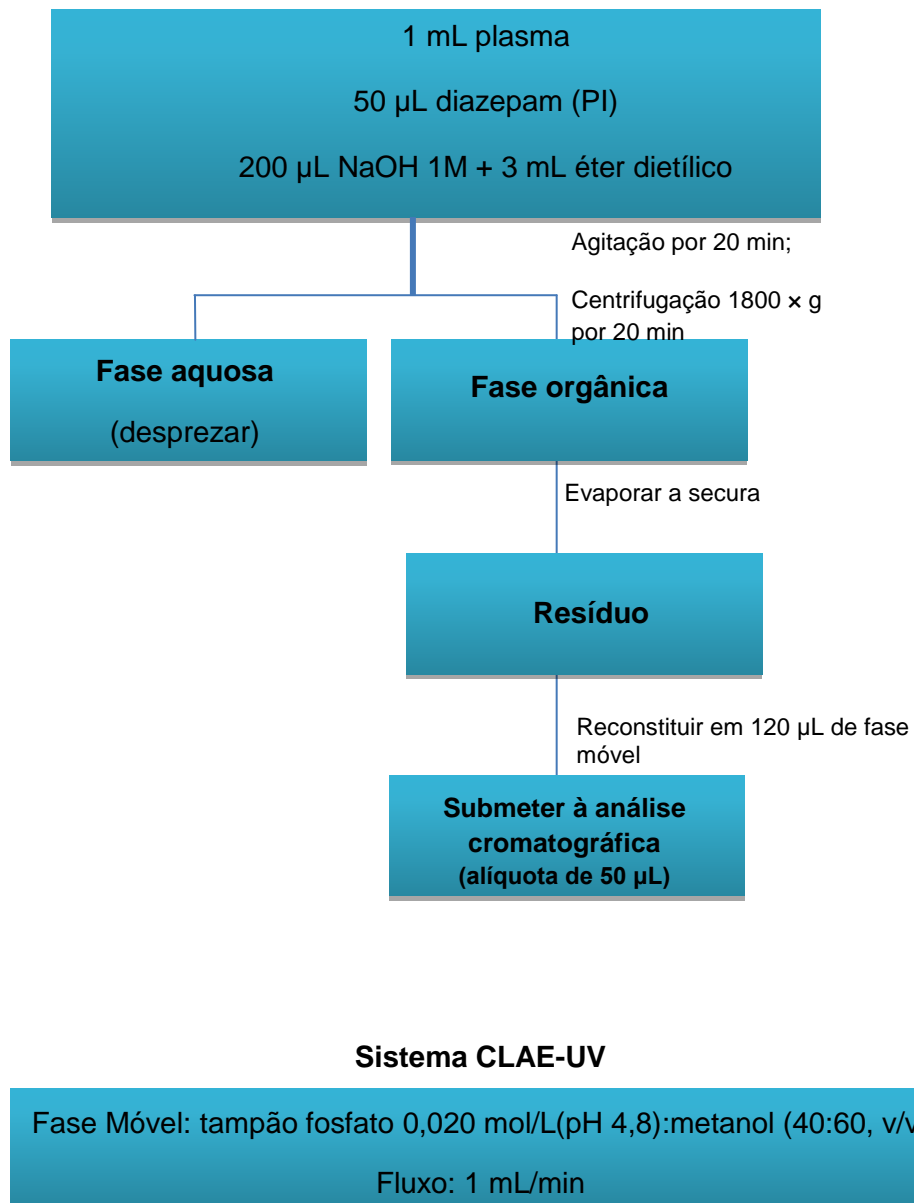
A solução estoque do padrão de nifedipino foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol. A partir dessa solução foram realizadas sucessivas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 200, 400, 1000, 2000, 3000 e 4000 ng/mL de metanol. A solução estoque de fenacetina (padrão interno) foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol e posteriormente diluída na concentração de 50 µg/mL em metanol.

3.3.3. Processamento da amostra

3.3.3.1. Plasma

Alíquotas de 1 mL de plasma foram enriquecidas com 50 µL da solução contendo padrão interno (diazepam, 1500 ng/mL em metanol), 200 µL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M e após agitação em vortex por dez segundos, foram adicionados 3 mL do solvente extrator (éter dietílico). As amostras foram agitadas durante vinte minutos em mesa agitadora recíprocante (TE-240 Tecnal, 130 ± 10 ciclos/min), centrifugadas por dez minutos à 2000 × g. A fase orgânica (2 mL) de cada amostra foi transferida para microtubos de 2 mL e evaporada à secura em sistema de banho seco a 40° C. O resíduo foi reconstituído em 120 µL da fase móvel e 50 µL foram submetidos à análise cromatográfica (Figura 5).

Figura 5 – Procedimento de extração líquido-líquido do nifedipino em plasma humano.

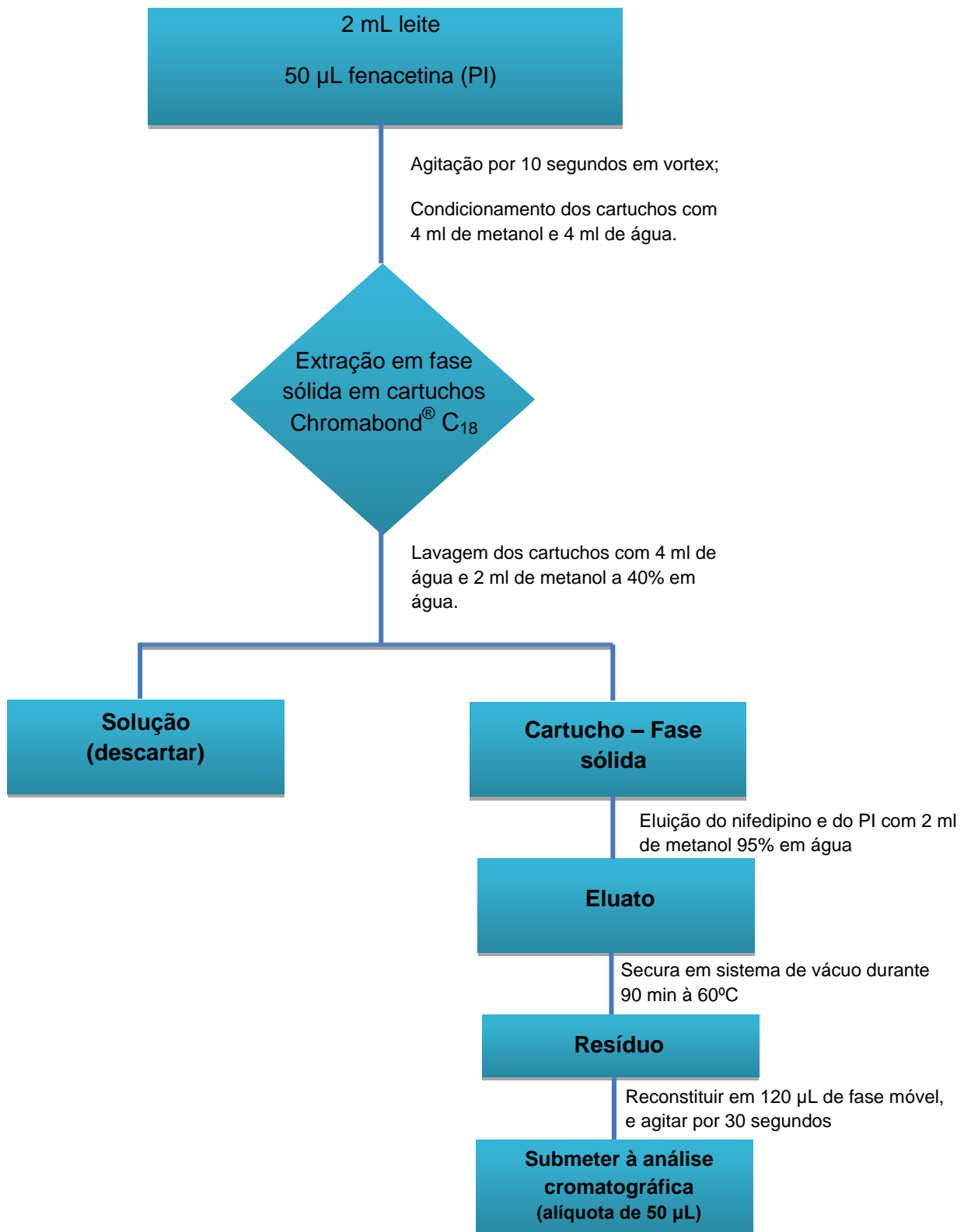


PI: padrão interno; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência por detecção em ultravioleta.

3.3.3.2. *Leite materno*

Alíquotas de 2 mL de leite materno foram enriquecidas com 50 µL da solução contendo padrão interno (fenacetina, 50 µg/mL em metanol) e agitadas em vortex por dez segundos. Após o condicionamento dos cartuchos com 4 mL de metanol e 4 mL de água, as amostras foram submetidas à extração em fase sólida em cartuchos Chromabond[®] C₁₈ (500 mg, 3 mL). A lavagem das amostras foi feita com 4 mL de água e 2 mL de metanol a 40% em água. Subsequentemente o nifedipino e o padrão interno foram eluídos utilizando 2 mL de metanol a 95% em água. Logo após o eluato foi seco em um sistema de vácuo durante 90 min à 60° C. Todo o processo de extração em fase sólida foi realizado sob vácuo a 30 psi (Figura 6).

Figura 6 – Procedimento de extração em fase sólida do nifedipino em leite materno humano.



Sistema CLAE-UV

Fase Móvel: tampão fosfato 0,020 mol/L(pH 4,8):metanol(35:65, v/v)

Fluxo: 1 mL/min

3.3.4. Validação

O processo de validação atendeu as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se os métodos bioanalíticos poderiam ser aplicados na quantificação do nifedipino em plasma e leite materno de lactantes hipertensas. Conforme recomendação da legislação vigente, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, efeito residual, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade do nifedipino em plasma e leite materno em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e longa duração.

3.3.4.1. Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de analisar o analito e o padrão interno na presença dos componentes endógenos comuns a matriz biológica de interesse. Para a avaliação da seletividade do método em plasma foram utilizadas amostras de plasma branco obtidas de oito fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Para a avaliação da seletividade do método bioanalítico em leite materno foram utilizadas amostras de 6 fontes distintas. Para que um método seja considerado seletivo, respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito e respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno (PI) inferiores a 5% da resposta do PI quando amostras branco são comparadas às amostras do limite inferior de quantificação (LIQ).

3.3.4.2. Efeito Residual

O ensaio de efeito residual objetiva avaliar se há contaminações residuais entre duas injeções cromatográficas subsequentes. Este ensaio foi avaliado através de três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de amostra processada no limite superior de quantificação (LSQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI inferiores a 5% quando comparados à amostra processada do LIQ.

3.3.4.3. Linearidade

A curva analítica para avaliação de linearidade foi construída a partir da razão das áreas do pico do analito/PI versus a concentração nominal do analito. Foram construídas e avaliadas três curvas analíticas incluindo a análise da amostra branco, da amostra zero e seis mostras de diferentes concentrações do padrão adicionadas de PI. Para a aceitação da curva foram utilizados os critérios definidos pela Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). A linearidade do método foi dada através da utilização da regressão linear ordinária.

Para o método utilizando do plasma humano, alíquotas de 1 mL de plasma branco enriquecidas com 50 µL da solução padrão foram utilizadas. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito anteriormente (itens 3.3.3.1 e 3.3.1). Foram construídas e avaliadas três curvas de calibração com concentrações finais de 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/mL de nifedipino em plasma.

Para o método em leite materno humano, alíquotas de 2 mL de leite branco enriquecidas com 50 µL da solução padrão foram utilizadas. As amostras foram extraídas e analisadas conforme descrição nos itens 3.3.3.2 e 3.3.1. Foram construídas e avaliadas três curvas de calibração concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de nifedipino em leite materno.

3.3.4.4. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas em uma mesma corrida (intra-ensaios) e em três corridas diferentes (inter-ensaios). Os controles de qualidade limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD) foram analisados em 5 replicatas. A precisão é adequada quando o coeficiente de variação (CV) não for superior a 15%, exceto para a menor concentração, para a qual é aceitável o CV de até 20%. O CV foi determinado conforme a Equação 2

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (2)$$

A exatidão intra-ensaios e inter-ensaios foi determinada através do cálculo do erro padrão relativo (EPR), o qual deve apresentar valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores inferiores a $\pm 20\%$ do valor nominal. O EPR é calculado conforme a equação 3.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (3)$$

3.3.4.5. Recuperação

Para determinar a eficiência do procedimento de extração (ou recuperação) foram comparadas áreas de padrões não extraídos aqueles extraídos da matriz biológica (plasma ou leite materno) na mesma concentração, de acordo com a equação 4.

$$R\% = \frac{\text{Padrão extraído}}{\text{Padrão não extraído}} \times 100 \quad (4)$$

3.3.4.6. Estabilidade

A estabilidade do nifedipino foi analisada usando amostras de CQB e CQA analisadas em triplicada. A concentração das amostras foi determinada por curva analítica recém-preparada. A estabilidade é demonstrada quando a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentar desvio superior a 15%. A estabilidade do analito na matriz biológica foi demonstrada por meio dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento.

3.3.4.6.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras CQB e CQA foram utilizadas para avaliar a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras foram congeladas à -20°C e mantidas por 24 horas. Na sequência, as amostras foram descongeladas até atingirem temperatura ambiente. Após atingirem a temperatura ambiente, as mesmas foram congeladas novamente sob as mesmas condições anteriores. Esse

procedimento foi repetido por três ciclos e após o último ciclo de congelamento e descongelamento as amostras foram analisadas.

3.3.4.6.2. Estabilidade de curta duração

No estudo de estabilidade de curta duração, as amostras foram processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente por tempo superior ao utilizado durante o estudo. Para este estudo as amostras permaneceram por 6 horas em temperatura ambiente e então foram processadas e analisadas.

3.3.4.6.3. Estabilidade de pós-processamento

As amostras dos controles de qualidade de baixa e alta concentração foram submetidas às mesmas condições de análises utilizadas no estudo, porém por período superior à duração da corrida analítica. Neste estudo, antes de realizar a análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do autoinjeter por um período de 24 horas à temperatura de 18° C.

3.3.4.6.4. Estabilidade de longa duração

As amostras dos controles de qualidade de baixa e alta foram armazenadas por um período superior ao intervalo de tempo entre a coleta das amostras e a análise. Para esse teste os controles de qualidade foram mantidos por três meses à temperatura de -20° C e então analisados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação dos métodos bioanalíticos para plasma e leite materno

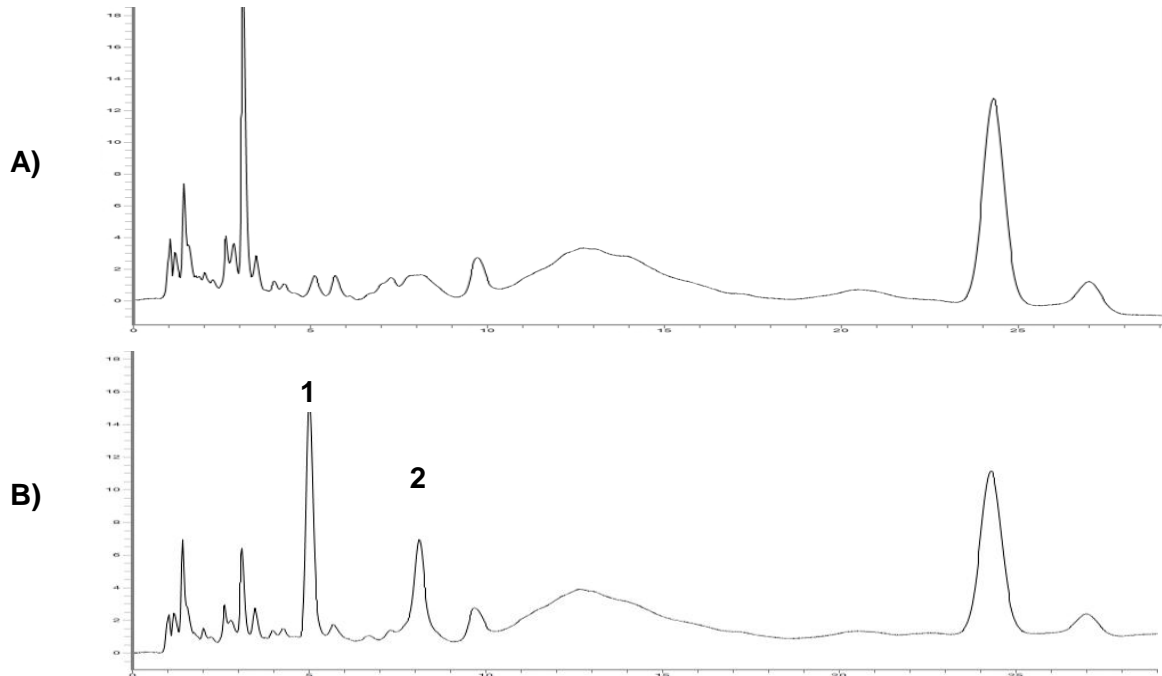
No presente estudo, foram desenvolvidos e validados métodos de análise do nifedipino em plasma e em leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. Foram realizados testes para a seleção do comprimento de onda com base em dados da literatura (236-238 nm) e os melhores cromatogramas foram observados com as análises realizadas a 238 nm (JANKOWSKI & LAMPARCZYK, 1994; NIOPAS & DAFTSIOS, 2003).

4.1.1 Plasma

O diazepam foi empregado como padrão interno por ser extraído nas mesmas condições de preparo de amostra e apresentar tempo de retenção ser próximo ao do analito de interesse (nifedipino). Os parâmetros de validação do método bioanalítico para a determinação nifedipino em plasma humano foram apresentados na Tabela 2.

Os cromatogramas de uma amostra de plasma branco (A) e de uma amostra enriquecida com o padrão certificado do nifedipino (B) foram apresentados na Figura 6. O método foi considerado seletivo, visto que picos com tempo de retenção (t_R) próximo ao do analito de interesse (nifedipino; t_R 9,6 min) apresentaram áreas inferiores a 20% da área do LIQ (Figura 7). Da mesma forma, não há picos interferentes no t_R do PI (6,3 min) com área superior a 5% da resposta do PI.

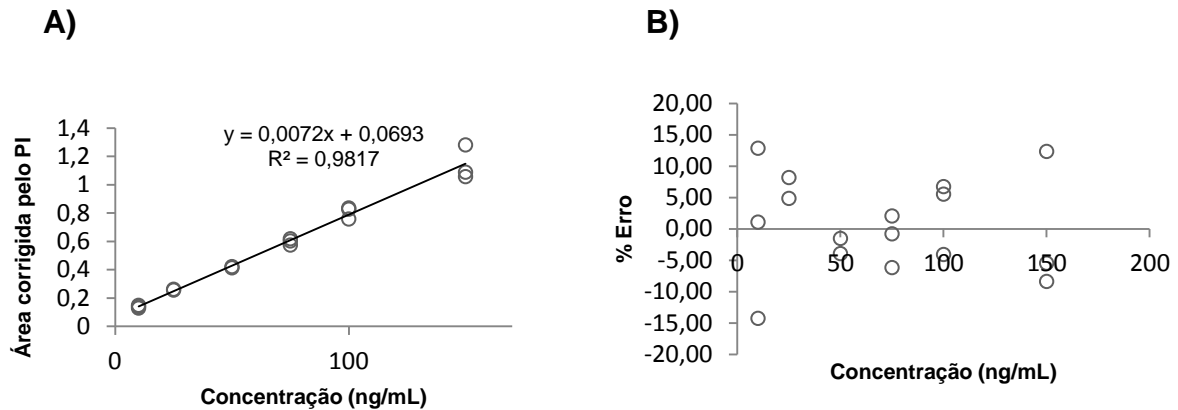
Figura 7 – Cromatogramas referentes à extração do nifedipino em plasma humano. O cromatograma (A) refere-se ao plasma branco e o cromatograma (B) ao plasma enriquecido com nifedipino na concentração de 150 ng/mL (1) e padrão interno (2).



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (125x4 mm, 5 µm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (40:60, v/v), na vazão de 1 mL/min; $\lambda = 238$ nm.

A linearidade do método de análise do nifedipino em plasma humano foi avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 1 mL de plasma branco enriquecidas com 50 µL de solução padrão de cada solução padrão de uso do nifedipino, resultando nas concentrações finais de 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/mL de plasma. Foi observada linearidade na faixa de concentrações de 10 a 150 ng/mL com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9809 e porcentagem de erro inferiores a 15 % (Figura 8). Por tanto o método foi considerado linear pois os resultados obtidos estão dentro dos limites especificados pela RDC nº 27/2012.

Figura 8 – (A) Curva analítica em triplicata do método de análise do nifedipino em plasma humano por CLAE-UV no intervalo de concentrações de 10 a 150 ng/mL de plasma. (B) Plote da porcentagem de erro versus concentração.



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (125x4 mm, 5 µm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (40:60, v/v), na vazão de 1 mL/min; $\lambda = 238$ nm.

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração analisada (10 ng/mL) a qual apresentou coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a 20%. O LIQ de 10 ng/mL apresentou precisão intra e interensaios e exatidão intra e interensaios com coeficientes de variação e erro padrão relativo inferiores a 15%, respectivamente.

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intraensaios) e em três corridas diferentes (interensaios) através da análise em quintuplicatas dos controles de qualidade LIQ (10 ng/mL), CQB (25 ng/mL), CQM (75 ng/mL), CQA (120 ng/mL) e CQD (300 ng/mL). A precisão intra e interensaios foi avaliada através do coeficiente de variação, o qual não apresentou valores superiores a 15%, incluindo o LIQ, para o qual é aceitável CV de até 20% (Tabela 2). A exatidão intraensaio e interensaio foi determinada através do erro padrão relativo (EPR) o qual apresentou valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal para todas as concentrações analisadas. Os resultados obtidos mostram que o método é preciso e exato.

A estabilidade foi demonstrada após ciclos de congelamento e descongelamento, estudo de curta duração e pós-processamento. Amostras dos controles de qualidade CQB (25 ng/mL) e CQA (120 ng/mL) foram preparadas e analisadas em triplicata e uma curva analítica recém preparada foi utilizada para determinar a concentração das amostras. A estabilidade foi demonstrada, pois a

média das concentrações obtidas nos diferentes estudos em relação ao valor nominal não apresentou desvios superiores a 15% (Tabela 3).

Tabela 3 – Limites de confiança do método de análise do nifedipino em plasma humano por LC-UV.

Nifedipino	
Linearidade (10 – 150 ng/mL)	$y=0,0072x + 0,0674$
r^2	0,9809
Precisão Interensaios (CV%, n=15)	
LIQ (10 ng/mL)	14,9
CQB (25 ng/mL)	12,1
CQM (75 ng/mL)	13,4
CQA (120 ng/mL)	8,0
CQD (300 ng/mL)	13,1
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (10 ng/mL)	13,1
CQB (25 ng/mL)	10,5
CQM (75 ng/mL)	7,8
CQA (120 ng/mL)	1,5
CQD (300 ng/mL)	7,5
Exatidão Interensaios (EPR%, n=15)	
LIQ (10 ng/mL)	-7,9
CQB (25 ng/mL)	-7,1
CQM (75 ng/mL)	0,3
CQA (120 ng/mL)	-6,3
CQD (300 ng/mL)	4,6
Exatidão Intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (10 ng/mL)	-14,4
CQB (25 ng/mL)	-3,3
CQM (75 ng/mL)	11,6
CQA (120 ng/mL)	1,7
CQD (300 ng/mL)	14,7
Estabilidade (EPR%, n=3)	
<i>Curta Duração</i> (6h à 23° C)	
CQB (10 ng/mL)	-5,6
CQA (120 ng/mL)	0,7
<i>Pós-processamento</i> (24h à 18° C)	
CQB (10 ng/mL)	-5,1
CQA (120 ng/mL)	-5,5
<i>Congelamento/descongelamento</i> (3 ciclos)	
CQB (10 ng/mL)	-7,6
CQA (120 ng/mL)	-5,8

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) × 100]; r = coeficiente de correlação linear, %
 Inexatidão = [(concentração obtida – concentração real)/concentração real] × 100; LIQ: limite de
 quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de
 média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade
 de diluição.

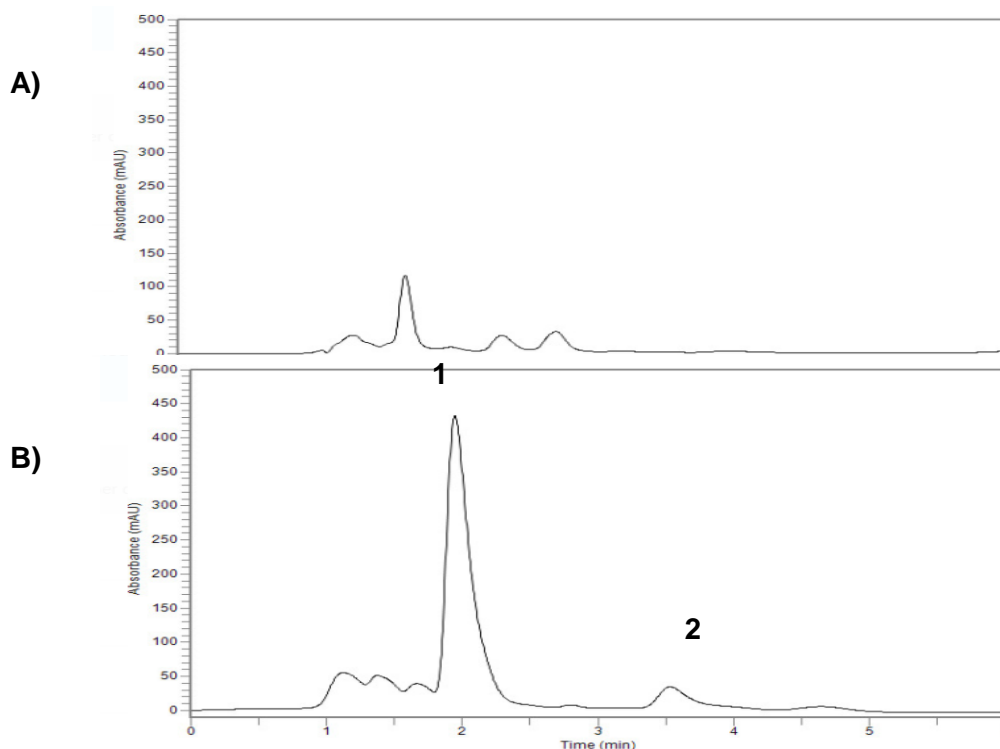
4.1.2 Leite materno

A fenacetina foi selecionada como padrão interno em função do fator de retenção próximo ao do analito de interesse; por estar bem resolvido do mesmo nas condições cromatográficas selecionadas; e por ser extraída do leite materno nas mesmas condições de preparo de amostra. O uso da coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 capeada e da fase móvel tampão fosfato 0,020mol/L pH 4,8:metanol (35:65, v/v) resultou na observação dos tempos de retenção de 3,6 minutos para nifedipino e 2,1 minutos para o padrão interno.

O método para análise de nifedipino em leite materno humano foi validado conforme as recomendações da resolução RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade em matriz biológica.

A Figura 9 corresponde aos cromatogramas da extração em leite branco (A) e leite enriquecido com nifedipino na concentração de 5 ng/mL de leite e padrão interno (fenacetina). Em função da ausência de picos interferentes no t_R do nifedipino com área superior a 20% do LIQ e ausência de picos interferentes no t_R do PI com área superior a 5% da área do PI, o método foi considerado seletivo.

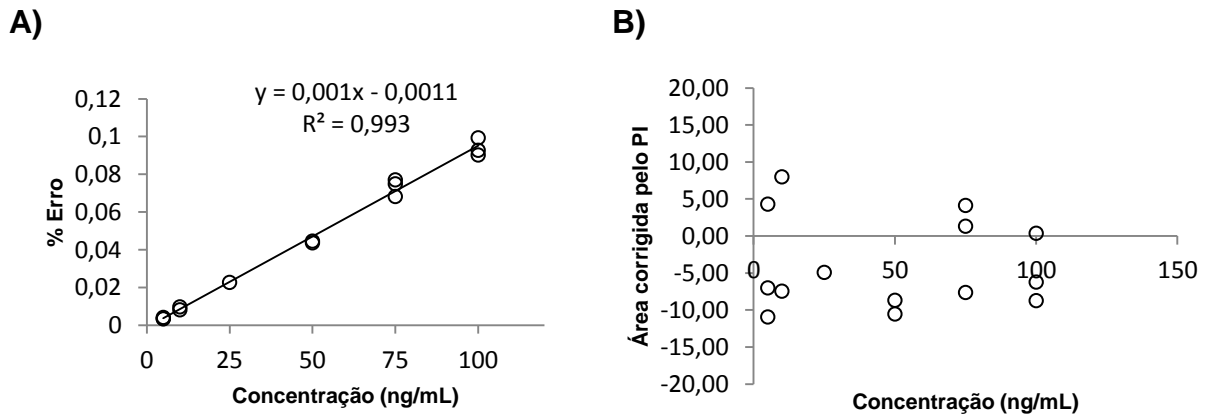
Figura 9 – Cromatogramas referentes à extração do nifedipino em leite materno humano. O cromatograma (A) refere-se ao leite branco e o cromatograma (B) ao leite enriquecido padrão interno (1) e nifedipino na concentração de 5 ng/mL (2).



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 μ m, 125x4 mm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020 mol/L (pH 4,8):metanol (35:65, v/v), na vazão de 1 mL/min; λ = 238 nm.

A linearidade do método de análise do nifedipino em leite humano foi avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 2 mL de leite branco enriquecidas com 50 μ L de solução padrão de cada solução padrão de uso do nifedipino, resultando nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de leite. As amostras foram extraídas e analisadas conforme o item 3.7.3. Foi observada linearidade na faixa de concentrações de 5 a 100 ng/mL com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9938 e % de erro inferiores a 15 % (Figura 10).

Figura 10 – (A) Curva analítica do método de análise do nifedipino em leite humano no intervalo de concentrações de 5 a 100 ng/mL de leite. (B) Plote da porcentagem de erro versus concentração do método de análise do nifedipino em leite materno por CLAE-UV.



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 µm, 125x4 mm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (35:65, v/v), na vazão de 1 mL/min; λ = 238 nm.

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração analisada (5 ng/mL) a qual apresentou coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a 20%. O LIQ de 5 ng/mL apresentou precisão intra e interensaios e exatidão intra e interensaios com coeficientes de variação e erro padrão relativo inferiores a 15%, respectivamente.

A precisão e exatidão intraensaios e interensaios foram avaliadas por determinações em quintuplicatas da concentração de nifedipino nos controles de qualidade LIQ (5 ng/mL), CQB (10 ng/mL), CQM (50 ng/mL) e CQA (75 ng/mL). Na avaliação da precisão intracorrída e intercorrída, os coeficientes de variação foram inferiores a 15% para todas as amostras, incluindo o LIQ, para o qual é aceitável CV de até 20% (Tabela 3). Portanto, o método foi considerado preciso. O método também foi considerado exato, pois os erros padrão relativos (EPR) foram inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal para todas as concentrações analisadas.

A estabilidade foi demonstrada após ciclos de congelamento e descongelamento, estudo de curta duração e pós-processamento. Amostras dos controles de qualidade CQB (10 ng/mL) e CQA (75 ng/mL) foram preparadas e analisadas em triplicata e uma curva analítica recém preparada foi utilizada para

determinar a concentração das amostras. A estabilidade do nifedipino foi demonstrada nas condições do método desenvolvido, pois a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentou desvio superior a 15% (Tabela 4).

Tabela 4 – Limites de confiança do método de análise do nifedipino em leite materno humano por LC-UV.

	Nifedipino
Linearidade (5 – 100 ng/mL)	y=0,001x-0,001
r ²	0,9938
Precisão Interensaios (CV%, n=15)	
LIQ (5 ng/mL)	10,9
CQB (10 ng/mL)	4,5
CQM (50 ng/mL)	4,3
CQA (75 ng/mL)	3,1
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (5 ng/mL)	11,1
CQB (10 ng/mL)	1,4
CQM (50 ng/mL)	4,4
CQA (75 ng/mL)	1,2
Exatidão Interensaios (EPR%, n=15)	
LIQ (5 ng/mL)	-4,7
CQB (10 ng/mL)	-2,7
CQM (50 ng/mL)	-1,4
CQA (75 ng/mL)	-2,2
Exatidão Intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (5 ng/mL)	-2
CQB (10 ng/mL)	-0,2
CQM (50 ng/mL)	1,0
CQA (75 ng/mL)	2,6
Estabilidade (EPR%, n=3)	
<i>Curta Duração</i> (6h à 23° C)	
CQB (10 ng/mL)	-1,9
CQA (75 ng/mL)	-0,1
<i>Pós-processamento</i> (24h à 18° C)	
CQB (10 ng/mL)	-0,5
CQA (75ng/mL)	0,2
<i>Congelamento/descongelamento</i> (3 ciclos)	
CQB (10 ng/mL)	1,0
CQA (75 ng/mL)	0,3

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) × 100]; r = coeficiente de correlação linear, %
 Inexatidão = [(concentração obtida – concentração real)/concentração real] × 100; LIQ: limite de
 quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de
 média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.

4.2 Etapa Clínica

Foram recrutadas para participarem do estudo um total de 65 pacientes gestantes hipertensas atendidas no Ambulatório de Gravidez de Alto Risco do DGO-FMRPUSP, durante o acompanhamento pré-natal. Houve um grande número de participantes que não concluíram o estudo pelas seguintes razões: a) apresentaram reações adversas ao medicamento, como taquicardia e dor de cabeça (n=18) ao substituir o medicamento anti-hipertensivo metildopa pelo medicamento do estudo nifedipino – estas pacientes foram excluídas do estudo, e tiveram a terapia farmacológica alterada para o tratamento de primeira escolha (metildopa); b) pressão arterial foi normalizada após o parto (n=16); c) participantes que interromperam o aleitamento materno antes da realização do estudo (n=12); e d) participantes que não concordaram com o retorno ou não tiveram condições de ir até o hospital para a realização das coletas (n=4).

Na Tabela 5 constam os dados clínicos das pacientes que concluíram o protocolo da pesquisa, bem como a idade gestacional no momento do parto, o tipo de parto e os medicamentos associados no momento da coleta das amostras de sangue e leite maternos. A idade das pacientes variou de 23 a 39 anos. O índice de massa corpóreo no momento do recrutamento das pacientes variou 23,0 a 45,9 kg/m². De acordo com a classificação de IMC conforme a semana gestacional (ATALAH et al., 1997), verifica-se que a maioria das pacientes que concluíram o estudo apresentavam obesidade (n=9, 60%) ou sobrepeso (n=4, 27%). O índice tão elevado de sobrepeso e obesidade entre as gestantes investigadas justifica-se por serem gestantes atendidas no Ambulatório de Gravidez de Alto Risco, do DGO-FMRPUSP, sendo que as principais causas de risco na gestação são o diabetes, a obesidade e a hipertensão.

Os medicamentos mais frequentemente usados pelas lactantes que concluíram o estudo foram metildopa, salbutamol, levotiroxina sódica, metformina, furosemida, sertralina, propranolol e fluoxetina. Nenhum dos medicamentos listados acima é descrito como inibidor de ABCG2/BCRP e, portanto, não há dados na literatura que mostrem que o uso desses medicamentos pode alterar a transferência do nifedipino para o leite materno. Após o parto, as pacientes hipertensas incluídas no protocolo tiveram o antihipertensivo metildopa substituído pelo antihipertensivo nifedipino sob supervisão clínica dos Professores Doutores Ricardo de Carvalho

Cavalli e Geraldo Duarte para a realização do projeto de pesquisa. Ao iniciar o tratamento com o nifedipino, 18 pacientes entre 65 investigadas apresentaram taquicardia e dor de cabeça. Para essas pacientes, o protocolo clínico foi interrompido, com retorno a terapia farmacológica anti-hipertensiva usando a metildopa. Todas as intervenções farmacológicas foram realizadas sob responsabilidade dos coordenadores clínicos do projeto (Profs. Drs. RCC e GD) e sua equipe.

Tabela 5 – Dados clínicos das lactantes que concluíram o estudo (n=15)

Pacientes	Idade (anos)	Comorbidades	IMC (kg/m ²)	Classificação de IMC por semana gestacional*	Idade Gestacional no recrutamento*	Idade gestacional no parto	Tipo de parto	Medicamentos associados
1	36	A	28,8	Sobrepeso	36 s	38 s	Normal	-
2	23	A	40,7	Obesidade	35 s 4 d	39 s	Normal	2
3	33	a, b	26,9	Sobrepeso	22 s	38 s 6 d	Normal	1, 4
4	38	a, c	31,4	Sobrepeso	33 s 2 d	39 s	Normal	1
5	37	a, d, e, f, g	36,4	Obesidade	36 s 6 d	38 s 2 d	Cesárea	3, 8
6	23	a, h	23,0	Peso adequado	25 s 2 d	38 s 4 d	Normal	-
7	29	A	28,1	Sobrepeso	17 s 6 d	29 s	Cesárea	-
8	39	a, i	34,7	Obesidade	36 s	38 s 2 d	Cesárea	5, 6
9	38	A	33,6	Obesidade	29 s 4 d	39 s 2 d	Cesárea	-
10	27	A	37,8	Obesidade	33 s	39 s 1 d	Normal	-
11	35	A	36,4	Obesidade	38 s	39 s	Cesárea	1
12	31	a, j	25,3	Peso adequado	27 s	28 s	Cesárea	7
13	28	A	35,2	Obesidade	28 s	29 s	Cesárea	-
14	29	A	45,9	Obesidade	36 s 5 d	38 s 6 d	Cesárea	-
15	34	a, j	37,2	Obesidade	14 s 1 d	39 s 2 d	Normal	-

IMC: índice de massa corporal; (semanas-s; dias-d).

Medicamentos associados: 1: metildopa; 2: salbutamol nifedipino; 3: levotiroxina sódica; 4: metformina; 5: furosemida; 6: sertralina; 7: propranolol; 8: fluoxetina.

Doenças maternas: a: HAS; b: diabetes; c: dislipidemia; d: síndrome do pânico; e: depressão; f: leiomiomatose; g: osteoartrite; h: anemia; i: hipotireoidismo, j: pré-eclâmpsia.

*Classificação de IMC por semana gestacional segundo Atalah et al., 1997.

Tabela 6 - Exames laboratoriais das gestantes hipertensas que concluíram o protocolo clínico.

Pacientes	AST (U/L)	ALT (U/L)	Albumina (g/dL)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	*Cl creatinina (mL/min/1,73m ²)	Glicemia (mg/dL)	Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)	Proteinúria 24h (mg/24h)
1	17	9	-	13	0,66	107	80	134,5	4,2	28,2
2	13	8	3,5	14	0,73	153	83	135,4	3,7	-
3	14,3	1,7	3,2	20	0,75	96	113	135,6	3,78	278,3
4	17,9	6,1	3	41	1,05	78	67	136,9	4,3	-
5	17,9	-	-	6	0,61	131	81	137,6	3,2	-
6	13	10	3,7	13	0,55	172	90	135	4	140,2
7	17,9	30	3,8	37	0,93	112	88	133,7	4,2	5416,7
8	19,8	8	3,9	23	0,81	100	84	140,2	4,6	607,5
9	13,9	13,2	-	14	0,64	142	78	136,7	4	185,7
10	16,2	17	-	15	0,61	174	81	136,5	3,9	124,3
11	18,94	22,39	3,7	18,6	0,51	158	63	138,93	4,06	53,7
12	14,93	6,53	2,69	26,38	0,68	104	144	139,51	4,21	3885,4
13	10,56	7,84	3,71	26,02	0,72	124	81	137,62	4,66	3339,8
14	18,4	34,9	3,3	21	0,7	140	83	139	4,3	161,5
15	8,5	6,5	3,8	17	0,8	115	87	143,7	4,1	131,9

Valores de referência: AST: até 38 U/L; ALT: até 31 U/L; albumina: 3,5-4,8 g/dL; uréia: 10-50 mg/dL; creatinina: 0,70-1,5 mg/dL; Na⁺: 135-145 mEq/L; K⁺ 3,5-5,0 mEq/L; proteinúria: 30-140 mg/24h. *Clearance de creatinina foi determinado pela equação de Cockcroft e Gault corrigida pela superfície corporal (SC) de 1,73 m² (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

A concentração de nifedipino no plasma das lactantes hipertensas (n=15) tratadas com doses múltiplas de 20 mg a cada 12 horas variou de 11,8 a 178,1 ng/mL, com valor mediano de 46,0 ng/mL. Os valores de concentração plasmática observados no presente estudo são compatíveis com resultados previamente publicados na literatura em estudo de farmacocinética de doses múltiplas (SILBERSCHMIDT et al., 2007). Cabe ressaltar que as pacientes foram tratadas com comprimidos de liberação controlada (Adalat retard[®]) e que as coletas foram realizadas no vale em estado de equilíbrio. A meia-vida do nifedipino varia de 4,3 a 5,0 horas em gestantes hipertensas com e sem diabetes após a administração de dose única de comprimidos 20 mg de liberação controlada (FILGUEIRA et al., 2017). Portanto, o período de 15 dias de tratamento, é suficiente para alcançar o estado de equilíbrio (> 6 meias-vidas do fármaco). Estudos anteriores mostraram que a concentração de nifedipino 12 horas após uma dose única de 20 mg de comprimidos de liberação controlada resultaram em concentrações plasmáticas de aproximadamente 10 ng/mL em gestantes hipertensas com ou sem diabetes mellitus tipo 2 (FILGUEIRA et al., 2017).

O nifedipino foi detectada em todas as amostras de leite materno coletadas das pacientes lactantes hipertensas. A concentração de nifedipino no leite materno humano foi similar a encontrada no plasma, variando de 4,8 a 93,8 ng/mL, com valores medianos de 13,9 ng/mL (Tabela 6). Em seis mulheres que tomaram 10 mg de nifedipino de liberação normal, três vezes ao dia, os níveis de concentração do fármaco no leite materno variaram de menos que 1 a 10,3 µg/L em momentos variados entre 1 e 8 horas após a dose, com uma média de 3,5 µg/L (MANNINEN & JUHAKOSKI, 1991). A razão da concentração do nifedipino leite/plasma apresentou grande variabilidade, com valores na faixa de 0,06 a 2,52 (Tabela 7).

Não houve correlação positiva entre as concentrações de nifedipino no plasma e no leite materno (Spearman $r = -0,2377$; IC95%: $-0,6778$ a $0,3278$; $p = 0,3936$). Em estudos anteriores, a quantidade de nifedipino excretada no leite materno apresentou correlação positiva com a dose diária de nifedipino, e representou 0,00038 e 0,0027% da dose ingerida pela mãe (EHRENKRANZ et al., 1988). Considerando que aproximadamente 90% do nifedipino no plasma encontra-se ligada a proteínas plasmáticas, acredita-se que uma melhor correlação com a concentração do nifedipino no leite materno seria observada com a concentração

livre do fármaco no plasma (EHRENKRANZ et al., 1988). Uma das limitações deste estudo é que a concentração livre do nifedipino não foi investigada até o momento.

Tabela 7. Concentração de nifedipino no plasma e leite maternos nas pacientes investigadas no estudo e genótipos das pacientes para o polimorfismo c.421C>A (n=15)

Pacientes	Concentração plasmática (ng/mL)	Concentração no leite materno (ng/mL)	Razão L/P	Genótipo ABCG2/BCRP
1	49,7	4,8	0,10	CC
2	53,2	74,8	1,40	CA
3	44,3	58,5	1,32	CC
4	46,9	13,1	0,28	CC
5	178,1	10,5	0,06	CC
6	54,8	40,2	0,73	CC
7	38,0	93,8	2,47	CA
8	71,0	5,2	0,07	CC
9	46,0	57,2	1,24	CC
10	11,8	11,8	1,00	CA
11	43,3	25,6	0,59	CA
12	14,6	5,5	0,37	CC
13	73,8	10,5	0,14	CA
14	13,9	13,9	1,00	CC
15	12,9	32,4	2,52	CA
Média	50,1	30,5	0,9	
Desvio padrão	40,6	28,3	0,8	
Mediana	46,0	13,9	0,73	
Percentil 25-75	26,3-54,0	10,5-48,7	0,21-1,28	

CC = homocigoto para o alelo selvagem (n=9); CA = heterocigoto (n=6); AA = homocigoto para o alelo raro (n=0).

Assumindo a ingestão diária de 150 mL/kg/dia de leite materno pelo lactente e considerando a concentração máxima encontrada de 93,8 ng/mL de nifedipino no leite materno, a quantidade diária máxima ingerida pelo lactente é de 0,014 mg/kg/dia. Dado que as doses terapêuticas recomendadas para o tratamento da hipertensão em crianças variam de 0,25 a 0,5 mg/kg/dia (MEYERS e SIU, 2011), a exposição diária dos lactentes é equivalente a apenas 5,6% da menor dose terapêutica recomendada para crianças. Entretanto, cabe ressaltar que os dados de

segurança do nifedipino são relativos a crianças (2 a 12 anos) e a exposição do lactente ao fármaco pode ocorrer desde o nascimento.

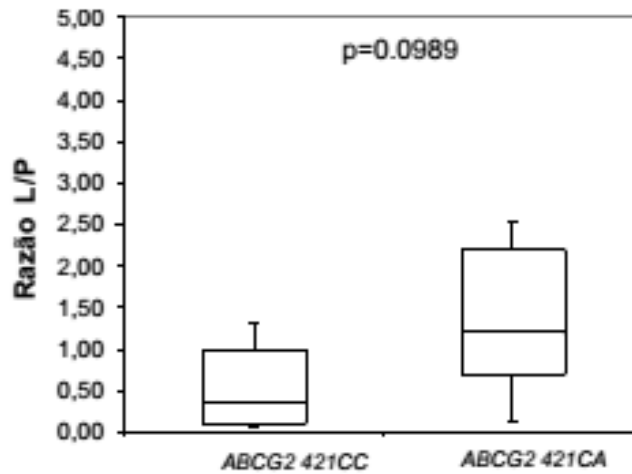
Dados de ontogenia de CYP3A4, principal isoforma que metaboliza o nifedipino, mostram que neonatos (até 1 mês) e bebês com 1 ano apresentam, respectivamente, até 20% e 70% da atividade dos adultos. Por outro lado, fármacos metabolizados por CYP3A4 em adultos, tem seu metabolismo mediado pela isoforma CYP3A7 em neonatos, e esta última tem sua expressão reduzida ao longo do desenvolvimento em detrimento do aumento da expressão de CYP3A4 (JOHNSON et al., 2008; STROUGO et al., 2014).

Também não houve correlação entre a razão de concentração do nifedipino leite/plasma com o índice de massa corpóreo (Spearman $r = 0,1360$; IC95%: -0,4185 a 0,6166; $p=0,6290$), com clearance de creatinina (Spearman $r = 0,2145$; IC95%: -0,3494-0,6643; $p =0,4427$), ou com a idade das pacientes (Spearman $r = -0,4328$; IC95%: -0,7802 a 0,1188; $p=0,1071$).

O diabetes tipo 2 controlado não altera a disposição cinética e nem transferência placentária do nifedipino em gestantes hipertensas (FILGUEIRA et al., 2017). Entretanto, dados da literatura mostram que ratos com diabetes experimental induzida pela estreptozotocina apresentam aumento da permeabilidade intestinal da glibenclamida, sugerindo redução de efluxo mediado pela atividade de Bcrp intestinal (LIU et al., 2012). Ratos com diabetes experimental induzido por estreptozotocina e dieta rica em gorduras apresentaram redução na expressão de Bcrp hepático e intestinal, avaliado pela redução na expressão de RNAm de Bcrp (XU et al., 2014). No presente estudo apenas uma paciente lactante, dentre as 15 que concluíram o protocolo clínico, era diabética. Logo, não foi possível investigar neste estudo se o diabetes é covariável na transferência do nifedipino para o leite materno.

Os valores medianos (percentil 25-75) encontrados para o genótipo CC (homozigoto selvagem) foram 0,4 (0,1-1,0); e para o genótipo CA (heterozigoto) foram 1,2 (0,7-2,2). Considerando o valor de $p = 0,0989$ para o teste de Mann-Whitney, não houve diferença entre os genótipos de ABCG2 para a razão L/P (Figura 11), porém acreditamos que a inclusão de um número maior de pacientes pode resultar em diferenças significativamente estatísticas.

Figura 11 – Influência de ABCG2 c.421C>A na razão da concentração do nifedipino no leite/plasma maternos.



Outras limitações deste estudo são: pequeno número de lactantes que concluíram o estudo (n=15) apesar do relevante número de pacientes recrutadas; ausência de dados de genotipagem para o polimorfismo de base única c.421C>A em ABCG2/BCRP, cuja frequência é de 12% na população brasileira. O conhecimento da variabilidade na transferência do nifedipino para o leite materno em lactantes hipertensas, bem como a identificação das potenciais covariáveis deste processo poderá contribuir na avaliação da exposição de lactentes a este e outros substratos de ABCG2/BCRP bem como na elaboração de estratégias de intervenção que visem reduzir a exposição de lactentes a medicamentos.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos de análise do nifedipino em plasma e leite materno humanos por CLAE-UV. Os métodos apresentaram parâmetros de validação (precisão, exatidão, linearidade, detectabilidade e estabilidade) compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética de doses múltiplas. A transferência do nifedipino para o leite materno foi investigada em lactantes hipertensas, sendo que a razão leite/plasma variou de 0,06 a 2,52. Não houve influência de ABCG2 421C>A nas 15 pacientes investigadas na razão L/P, mas a futura investigação de um número maior de pacientes será realizada para a conclusão dessa análise.

REFERÊNCIAS

- ABOU-AUDA, H. S.; NAJJAR, T. A.; AL-KHAMIS, K. I.; AL-HADIYA, B. M.; GHILZAI, N. M.; AL-FAWZAN, N. F. Liquid Chromatographic Assay of Nifedipine in Human Plasma and its Application to Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.22, n.2, p.241-249, 2000.
- ADKISON, K. K.; VAIDYA, S. S.; LEE, D. Y.; KOO, S. H.; LI, L. MENTHA, A. A.; GROSS, A. S.; POLL, J. W.; LOU, Y.; LEE, E. J. The ABCG2 C421A Polymorphism Does Not Affect Oral Nitrofurantoin Pharmacokinetics In Healthy Chinese Male Subjects. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 66, n. 2, p. 233-9, 2008.
- ADKISON, K. K.; VAIDYA, S. S.; LEE, D. Y.; KOO, S. H.; LI, L.; MEHTA A. A.; GROSS, A. S.; POLLI, J. W.; HUMPHREYS, J. E.; LOU, Y.; LEE, E. J. D. Oral Sulfasalazine as a Clinical BCRP Probe Substrate: Pharmacokinetic Effects of Genetic Variation (C421A) and Pantoprazole Coadministration. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, p. 1046-1062, 2010.
- ALLIKMETS, R.; SCHRIMI, L. M.; HUTCHINSON, A.; ROMANO-SPICA, V.; DEAN, M. A human placenta-specific ATP-Binding Cassete Gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer Res.** v. 58, p. 5337-5339, 1998.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON DRUGS. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**, v. 108, p. 776-789, 2001.
- ATALAH, E.; CASTILLO, C.; CASTRO, R.; ALDEA, A. Proposal of a New Standard for the Nutritional Assessment of Pregnant Women. **Rev. Med. Chile.** V. 125, n.12, p. 1429-36, 1997.
- ATKINSON, H. C.; BEGG, E. J. Prediction of Drug Concentrations in Human Skim Milk from Plasma Protein Binding and Acid-Base Characteristics. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 25, n. 4, p. 496-503., 1990.
- AZEREDO, F.J. ET AL. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas. **Rev. Bras. Farm.**, v. 4, n.90, p. 321-326, 2009.
- BAUER, J. H.; PEPE, B.; ZAJICEK, J.; GROSHONG, T. Propranolol in Human Plasma and Breast Milk. **J. Cardiol.**, v. 43, p. 860-862, 1981.
- BAYLISS, H.; CHURCHILL, D.; BEEVERS, M.; BEEVERS, D. G. Anti-hypertensive drugs in pregnancy and fetal growth: evidence for “pharmacological programming” in the first trimester? **Hypert. Pregn.**, v. 21, n. 2, p. 161-74, 2002.
- BETHESDA, M. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **J. Obstet. Gynecol.**, v. 183, n. 1, p. 1-22, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias**. 2. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional De Vigilância Sanitária: Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Brasília, DF: ANVISA, 2012. Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in pregnancy and lactation.** 6th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2002.

BROWN, M. A.; HAGUE, W. M.; HIGGINS, J.; LOWE, S.; McCOWAN, L.; OATS, J.; PEEK, M. J.; ROWAN, J. A.; WALTERS, B. N. J. The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 40, n. 2, p. 139-155, 2000.

BRUNTON, L. L. **GOODMAN & GILMAN:** As bases farmacológicas da terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CHAVES, R.G. et al. Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 25, n. 3, p. 276-288, 2007.

COSTA, A.G.; DOMICIANO, M.F. **Medicamentos e lactação: Uma revisão do tema.** Monografia apresentada à Universidade Católica de Goiás (Para obtenção do título de Especialista em Farmácia Clínica) – Goiânia, 2008.

CUSATIS, G.; GREGORC, V.; LI, J.; SPREAFICO, A.; INGERSOLL, R. G.; VERWEIJ, J.; LUDOVINI, V.; VILLA, E.; HIDALDO, M.; SPARREBOOM, A.; BAKER, S. D. Pharmacogenetics of ABCG2 and Adverse Reactions to Gefitinib. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 98, n. 23, p. 1739-42, 2006.

DEL CIAMPO, L. A.; FERRAZ, I. S.; DANELUZZI, J. C.; RICCO, R. G.; MARTINELLI JÚNIOR,, C. E. Aleitamento Materno e o uso de medicamentos durante a lactação. **Rev. Paul. Pediatr.**; v. 25, n. 4, p. 355-7, 2007.

DEPPE, S. Impact of Genetic Variability in the ABCG2 Gene on ABCG2 Expression, Function, and Interaction With AT1 Receptor Antagonist Telmisartan. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 443, p. 1211-1217, 2014.

DEVLIN, R, G.; FLEISS, P. M. Captopril in Human Blood and Breast Milk. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 21, n. 2, p. 110-3, 1981.

DOYLE, L. A.; YANG, W.; ABRUZZO, L. V.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. A Multidrug Resistance Transporter From Human MCF-7 Breast Cancer Cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, p. 15665–15670, 1998.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. PS Power and Sample Size Program Available for Free on the Internet. **Controlled Clin. Trials.**, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.

EDDABRA, L.; WENNWE, T.; EI BTAOURI, H.; BARANEK, T.; MADOULET C.; CORNILLET-LEFEBVRE,P.; MORJANI, H. Arginine 482 to Glycine Mutation in ABCG2/BCRP Increases Etoposide Transport And Resistance to The Drug in HEK-293 Cells. **Oncol. Rep.**, v. 27. n. 1, p. 232-237, 2012.

EHRENKRANZ, R. A.; ACKERMAN, B. A.; HULSE, J. D. Nifedipine transfer into human milk. **J. Pediatr.**, v. 114, n. 3, p. 478-480, 1989.

EYAL, S.; KIM, J. D.; ANDERSON, G. D.; BUCHANAN, M. L., BRATENG, D. A.; CARR, D.; WOODRUM, D. E.; EASTERLING, T. R.; HEBERT, M. F. Atenolol Pharmacokinetics and Excretion in Breast Milk During the First 6–8 Months Postpartum. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 50, n. 11, p. 1301–1309, 2011.

FILGUEIRA, G. C. O.; FILGUEIRA, O. A. S.; CARVALHO, D. M.; MARQUES, M. P.; MOISÉS, E. C. D.; DUARTE, G.; LANCHOTE, V. L.; CAVALLI, R. C. Analysis of Nifedipine in human plasma and amniotic fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to clinical pharmacokinetics in hypertensive pregnant women. **J. Chromatogr. B**, v. 993-994, p. 20-25, 2015.

FROMM, M.F.; KIM, R.B. (Ed.). **Drug Transporters**. Heidelberg: Springer, 2004. (Handbook of Experimental Pharmacology, v. 201).

GARBACZ, G.; GOLKE, B.; WEDEMEYER, R. S., AXELL, M.; SÖDERLIND, E.; ABRAHAMSSON, B.; WEITSCHIES, W. Comparison of Dissolution Profiles Obtained From Nifedipine Extended Release Once a Day Products Using Different Dissolution Test Apparatuses. **J. Pharm. Sci.**, v. 38, n. 2, p. 147-55, 2009.

GARDNER, E. R.; BURGER, H.; van SCHAIK, R. H.; van OOSTEROM, A. T.; BRUIJN, E. A.; GUETENS, G.; BATES, S. E.; FIGG, W. D.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A.; NOOTER, K. Association Of Enzyme And Transporter Genotypes With The Pharmacokinetics Of Imatinib. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 80, n. 2, p. 192-2001, 2006.

GHANEM, F.; MOVAHED, A. Use of Antihypertensive Drugs During Pregnancy and Lactation. **Cardiovasc. Ther.**, v. 26, n. 1, p. 38-49, 2008.

GIANNUBILO, S. R.; BEZZECCHERI, V.; CECCHI, S.; LANDI, B.; BATTISTONI, G. I. VITALI, P.; CECCHI, L.; TRANQUILLI, A. L. Nifedipine versus labetalol in the treatment of hypertensive disorders of pregnancy. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 286, n. 3, p. 1-6, 2012.

GUO, Y.; DAI, J.; QIAN, G.; GUO, N.; ZHENG, M.; GUO, X. Determination of nifedipine in human plasma and its use in bioequivalence study. **Int. J .Pharm.**, v. 341, n. 1-2, p. 91-96, 2007.

HALE, T. W. **Medications and Mother's Milk**. 13th. ed. Amarillo: Hale Publishing, 2008. 1172 p.

HAN, Ji-Youn; LIM, Hyeong-Seok; SHIN, E. S.; PARK, Y. H.; LEE, S. Y.; LEE, Jong-Eun; LEE, D. H.; KIM, H. T.; LEE, J. S. Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 Polymorphisms With Irinotecan-Pharmacokinetics and Clinical Outcome in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. **Am. Cancer. Soc.**, v. 110, n. 1, p. 138-147, 2007.

HEALY, M. Suppressing Lactation with Oral Diuretics. **Lancet.**, v. 277, p. 1353-1354, 1961.

HO, T. K.; MORETTI, M.E.; SCHAEFFER, J. K. et al. Maternal Beta-Blocker Usage and Breast Feeding in the Neonate. **Pediatr. Res.**, v. 45, n. 67a, p. 385, 1999.

HO, R. H.; CHOI, L.; LEE, W.; MAYO, G.; SCHWARZ, U. I.; TIRONA, R. G.; BAILEY, D. G.; STEIN, C. M.; KIM, R. B. Effect of Drug Transporter Genotypes on Pravastatin Disposition in European and African-American Participants. **Pharmacogenet. Genomics**, v. 17, p. 647-656, 2007.

IMAI, Y.; ISHIKAWA, E.; ASADA, S.; SUGIMOTO, Y. Estrogen-Mediated Post Transcriptional Down-Regulation of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2. **Cancer Res.**, v. 65, n. 2, p. 596-604, 2005.

ITO, N.; ITO, K.; IKEBUCHI, Y.; KITO, T.; MIYATA, H.; TOYODA, Y.; TAKADA, T.; HISAKA, A.; HONMA, M.; OKA, A.; KUSUHARA, H.; SUZUKI, H. Organic Cation Transporter/Solute Carrier Family 22a is Involved in Drug Transfer into Milk in Mice. **J. Pharm. Sci.**, v. 103, n. 10, p. 3342-3348, 2014.

ITO, N.; ITO, K.; IKEBUCHI, Y.; TOYODA, Y.; TAKADA, T.; HISAKA, A.; OKA, A.; SUZUKI, H. Prediction of Drug Transfer into Milk Considering Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)-Mediated Transport. **Pharm. Res.**, v. 32, n. 8, p. 2527-37, 2015.

JAIN, L. Effect of pregnancy-induced and chronic hypertension on pregnancy outcome. **J. Perinatol.** v.17, n. 6 p. 425-7., 1997.

JAMES, P. R.; PIERCY, C. N. Management of hypertension before, during and after pregnancy. **J. Heart**, v.90, p.1499-1504, 2004. doi: 10.1136/hrt.2004.035444.

JANKOWSKI, A.; LAMPARCZYK, H. E. Evaluation of Chromatographic Methods for the Determination of Nifedipine in Human Serum. **J. Chromat. A**, v. 668, p. 469-473, 1994.

JOHNSON, T. N.; TUCKER, G.T.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. Development of CYP2D6 and CYP3A4 in the first year of life. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 83, n. 5, p. 670-671, 2008.

JONKER, J. W.; MERINO, G.; MUSTERS, S.; VAN HERWAARDEN, A. E.; BOLSCHER, E.; WAGENAAR, E.; MESMAN, E.; DALE, T. C.; SCHINKEL, A. H. The Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2) Concentrates Drugs and Carcinogenic Xenotoxins Into Milk. **Nat. Med.**, v. 11, n. 2, p. 127-9, 2005.

KATTAH, A. G.; GAROVIC, V. D. The management of hypertension in pregnancy. **J. Adv. Chronic. Kidney Dis.** v. 20, n. 3, p. 229-39, 2013.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic & Clinical Pharmacology.** 12th. ed. New York: McGraw-Hill Medical. 1054 p., 2012.

KESKITALO JE, PASANEN MK, NEUVONEN PJ, NIEMI M. Different Effects of the ABCG2 c.421C>A SNP on the Pharmacokinetics of Fluvastatin, Pravastatin and Simvastatin. **Pharmacogenomics.** v. 10, n. 10, p. 1617-24, 2009.

KIM, K. A. Effects of the ABCG2 and ABCB1 Drug Transport Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Bicalutamide in Humans. **Clin. Chim. Acta,** v. 438c, p. 7-11, 2015.

KOBAYASHI, D.; LEIRI, I.; HIROTA, T.; TAKANE, H.; MAEGAWA, S.; KIGAWA, J.; SUZUKI, H.; NANBA, E.; OSHIMURA, M.; TERAKAWA, N.; TARAKAWA, N.; OTSUBO, K.; MINE, K.; SUGIYAMA, Y. Functional Assessment of ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphism to Protein Expression in Human Placenta. **Drug. Metab. Dispos.,** v. 33, p. 94-101, 2005.

LI, J.; CUSATIS, G.; BRAHMER, J.; SPARREBOOM, A.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E.; HIDALDO, M.; BAKER, S. Association of Variant ABCG2 and the Pharmacokinetics of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Patients. **Cancer Biol. Therap.,** v. 6, n. 3, p. 432-438, 2005.

LIU, H.; LIU, L.; LI, J.; MEI, D.; DUAN, R.; HU, N.; GUO, H.; ZHONG, Z.; LIU, X. Combined contributions of impaired hepatic CYP2C11 and intestinal breast cancer resistance protein activities and expression to increased oral glibenclamide exposure in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Drug Metab. Dispos.** V. 40, n.6, p. 1104-12. doi: 10.1124/dmd.111.043513. 2012.

MAGEE, L. A.; ORNSTEIN, M. P.; von DADELSZEN, P. Management of hypertension in pregnancy. **BMJ.,** v. 318, p. 1332-6, 1999.

MAGEE, L. A.; von DADELSZEN, P. Treatment of hypertension in pregnancy. **J. Clin. Pharmacol.,** Canadian, v. 11, p. e199-e201, 2004.

MALIEPAARD, M.; SCHEFFER, G. L.; FANEYTE, I. F.; VAN GASTELEN, M. A.; PIJNENBORG, A. C.; SCHINKEL, A. H.; VAN DE VIJVER, M. J.; SCHEPER, R.J.; SCHELLENS, J. H. Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. **Cancer. Res.,** v. 61, n. 8, p. 3458-3464, 2001.

MANNINEN, A. K.; JUHAKOSKI, A. Nifedipine concentrations in maternal and umbilical serum, amniotic fluid, breast milk and urine of mothers and offspring. **J. Clin. Pharmacol. Res.,** v. 11, n. 5, p. 231-6, 1991.

MARTENS, J.; BANDITT, P.; MEYER, F. P. Determination of Nifedipine in Human Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Validation of the Method and its

Use in Bioavailability Studies. **J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.**, v. 660, n. 2, p. 297-302, 1994.

MERINO, G.; JONKER, J. W.; WAGENAAR, E.; VAN HERWAARDEN, A. E.; SCHINKEL, A. H. The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Affects Pharmacokinetics, Hepatobiliary Excretion, and Milk Secretion of the Antibiotic Nitrofurantoin. **Mol. Pharmacol.**, v. 67, n. 5, p. 1758-64, 2005.

METZGER, I.F. ET AL. Farmacogenética: Princípios, Aplicações e Perspectivas. Simpósio Farmacogenética. Medicina, Ribeirão Preto, 39(4): 515-21, out/dez. 2006.
MICHAEL, C. A. Use of Labetalol in the Treatment of Severe Hypertension During Pregnancy. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 8, Suppl. 2, p. 211s–215s., 1979.

MEYERS, R. S.; SIU, A. Pharmacotherapy review of chronic pediatric hypertension. **Clin. Ther.** V. 10, p. 1331-1356, 2011.

MIND THE GRAPH. **Create beautiful life science infographics.** Disponível em: <https://mindthegraph.com>, Acesso em: jan. 2017.

MUGO, M.; GOVINDARAJAN, G.; KURUKULASURIYA, L. R.; SOWERS, J. R.; McFARLANE, S. I. Hypertension in pregnancy. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 7, p. 348-54, 2005.

NATIONAL HEART, LUNG, and BLOOD INSTITUTE (NHLBI). Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **J. Obst. Gynecol.**, v. 183, n. 1, p.s1–s22, 2000.

NATIONAL HEART, LUNG, and BLOOD INSTITUTE (NHLBI). The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **J. Obst. Gynecol.**, v. 4-5230, p. 49-53, 2004.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 39, p. S1-S266, 2002.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A. C. Determination of Nifedipine in Human Plasma by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography: Validation and Application to Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 1213-1218, 2003.

OLIVEIRA, M. H. N.; COSTA, M. E. N. C.; TOSCANO, P. R. P.; TEDOLDI, C. L. Fármacos cardiovasculares na gestação e amamentação. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 93, n. 6, supl. 1, 2009.

PAPATSONIS, D. N.; LOK, C. A.; BOS, J. M.; GEIJIN, H. P.; DEKKER, G. A. Calcium channel blockers in the management of preterm labor and hypertension in pregnancy. **J. Obstetr. Gynecol. Reproductiv. Biol.**, v. 97, p. 122-140, 2001.

PODYMOW, T.; AUGUST, P. Antihypertensive Drugs in Pregnancy. **Semin. Nephrol.** ,v. 31, n. 1, p. 70-85, 2011.

- POONKUZHALI, B.; LAMBA, J.; STROM, S.; SPARREBOOM, K. T.; WATKIN, P.; SCHUETZ, E. Association of Breast Cancer Resistance Protein / ABCG2 Phenotypes and Novel Promoter and Intron 1 Single Nucleotide Polymorphisms. **Drug Metab. Dispos.**, v. 36, n. 4, p. 780-795, 2008.
- PREVOST, R. R.; AKL, S. A.; WHYBREW, W. D.; SIBAI, B. M. Oral Nifedipine Pharmacokinetics in Pregnancy-Induced Hypertension. **Pharmacotherapy**, v. 12, n. 3, p. 174-7, 1992.
- REFARGEN – Rede Nacional de Farmacogenética. Disponível em: <<http://www.refargen.org.br>>. Acesso em: 12/12/2016.
- ROMBALDI, A. R.; GALVÃO, A. L. C.; GREZZANA, G. B. Anti-hipertensivos e diuréticos no ciclo gravídico-puerperal. **Rev. Soc. Cardiol. RGS.**,v. XIV,n.5, p. 1-4, 2005.
- ROWE, H.; BAKER, T.; HALE, T. W. Maternal Medication, Drug Use, and Breastfeeding. **Pediatr. Clin. N. Am.**, v. 60, p. 275-294, 2013.
- SACHS, H.C. The Transfer of Drugs and Therapeutics Into Human Breast Milk: An Update On Selected Topics. **Pediatrics**, v. 132, n. 3, p. e796-e809, doi: 10.1542/peds.2013-1985, 2013.
- SCHELLENS, J. H.; VAN HAELST, I. M.; HOUSTON, J. B.; BREIMER, D. D. Nonlinear First-Pass Metabolism of Nifedipine in Healthy Subjects. **Xenobiotic.**, v. 21, n. 4, p. 547-55,1991.
- SHANNON, M. E.; MALECHA, S. E.; CHA, A. J. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (ACEIs) and Angiotensin II Receptor Blockers (ARBs) and Lactation: An Update. **J. Hum. Lact.**, v. 16, n. 2, p. 152-155, 2000.
- SHUKLA, S.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E.; AMBUDKAR, S. V. The calcium channel blockers, 1,4-dihydropyridines, are substrates of the multidrug resistance-linked ABC drug transporter, ABCG2. **Biochemistry.**, v. 45, n. 29, p. 8940-51, 2006.
- SIBAI, B. M. Treatment of hypertension in pregnant woman. **J. Med.**, v. 335, n. 4, p. 257-65, 1996.
- SIBAI, B. M. Antihypertensive drugs during pregnancy. **Semin. Perinatol.** v. 25, p.159-164, 2001.
- SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet.**, v. 365, n.9461, p. 785-799, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17987-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2) 2005.
- SIBAI, B. M. Hypertensive disorders of pregnancy: the United States perspective. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, v. 20, n. 2, p. 102-106. doi:10.1097/GCO.0b013e3282f73380. 2008.

SILBERSCHMIDT, A. L.; KÜHN-VELTEN, W. N.; JUON, A. M.; ZIMMERMANN, R.; VON MANDACH, U. Nifedipine concentration in maternal and umbilical cord blood after nifedipine gastrointestinal therapeutic system for tocolysis. **BJOG**, v.115, n.4, p.480-485. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01630.x. 2008

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão. **Rev. Bras. Hipertens.** v. 17, n. 1, p. 01 – 64, 2010.

SOLOMON, C. G.; SEELY, E. W. Hypertension in Pregnancy. **J. Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.**, v. 40, n. 4, p. 847–863, 2011.

SOONS, P. A.; SCHOEMAKER, H. C.; COHEN, A. F.; BREIMER, D. D. Intraindividual Variability in Nifedipine Pharmacokinetics and Effects in Healthy Subjects. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 32, n. 4, p. 324-331, 1992.

SOUSA, S. R.; BRAGA, A. F. A.; POTÉRIO, G. M. B.; BRAGA, F. S. S.; LOYOLA, Y. C. S.; FERNANDES, S. C. A. Influência do Nifedipino no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Atracúrio e Pelo Cisatracúrio. Estudo em Preparações Nervo Frênico-Diafragma de Rato. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 56, n. 2, 2006.

SPARREBOOM, A.; GELDERBLUM, H.; MARSH, S.; RANJEET, A.; OBACH, R.; PRINCIPE, P.; TWELVES, C.; JAAP, V.; McLEOD, H. Diflomotecan Pharmacokinetics in Relation to ABCG2 421C>A genotype. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 76, p. 38-44, 2004.

SPARREBOOM, A.; LOOS, W. J.; BURGER, H.; SISSUNG, T. M.; VERWEIJ, J.; FIGG, W. D.; NOOTER, K.; GELDERBLUM, H. Effect of ABCG2 Genotype on the Oral Bioavailability of Topotecan. **Cancer Biol. Therap.** v. 4, n. 6, p. e7-e10, 2005.

STROUGO, A.; YASSEN, A.; MONNEREAU, C.; DANHOF, M.; FREIJER, J. Predicting the "First dose in children" of CYP3A-metabolized drugs: Evaluation of scaling approaches and insights into the CYP3A7-CYP3A4 switch at young ages. **J Clin. Pharmacol.**, v. 54, n. 9, p. 1006-1015, 2014.

TANAKA, Y.; SLITT, A. L.; LEAZER, T. M.; MAHER, J. M.; KLAASSEN, C. D. Tissue Distribution and Hormonal Regulation of the Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Rats and Mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 326, p. 181–187, 2004, doi:10.1016/j.bbrc.2004.

TANAKA, Y.; KITAMURA, Y.; MAEDA, K.; SUGIYAMA, Y. Quantitative Analysis of the ABCG2 c.421C>A Polymorphism Effect on *in vivo* Transport Activity of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Using an Intestinal Absorption Model. **J. Pharm. Sci.**, v. 104, p. 3039-3048, 2015.

TOMLINSON, B.; HU, M.; LEE, V. W.; LUI, S. S.; CHU, T. T.; POON, E. W.; KO, G. T.; BAUM, L.; TAM, L. S.; LI, E. K. ABCG2 Polymorphism Is Associated With The Low-Density Lipoprotein Cholesterol Response To Rosuvastatin. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 87, n. 5, p. 558-62, 2010.

van HERWARDEEN, A. E. Multidrug Transporter ABCG2/Breast Cancer Resistance Protein Secretes Riboflavin (Vitamin B2) into milk. **Mol. Cel. Biol.**, v. 27, n. 4, p. 1247-1253, 2007.

VORE, M.; LEGGAS, M. Progesterone Acts Via Progesterone Receptors A and B to Regulate Breast Cancer Resistance Protein Expression. **Mol. Pharmacol.**, v. 73, n. 3, p. 613-5, 2008.

WHANG, X.; MORRIS, M. E. Effects of the Flavonoid Chrysin on Nitrofurantoin Pharmacokinetics in Rats: Potential Involvement of ABCG2. **Drug Metabol. Dispos.**, v. 35, n. 2, p. 268-274, 2007.

WHITE, W. B. Management of Hypertension During Lactation. **Hypertension**, v. 6, p. 297-300, 1985.

WHO "WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: www.who.int. Acesso em: jan.,2017.

XU, D.; LI, F.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; LIU, C.; HU, MY; ZHONG, ZY; JIA, L. L.; WANG, D. W.; WU, J.; LIU, L.; LIU, X. D. Decreased exposure of simvastatin and simvastatin acid in a rat model of type 2 diabetes. **Acta Pharmacol. Sin.** V. 35, n.9, p. 1215-1225. doi: 10.1038/aps.2014.39. 2014.

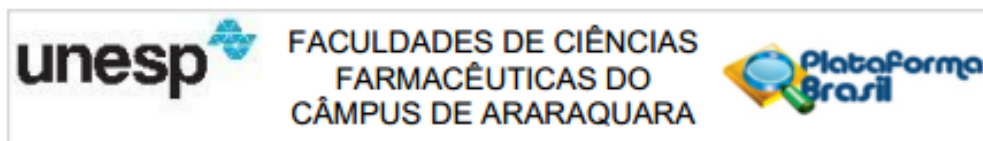
YAMASAKI, Y.; IERI, I.; KUSUHARA, H.; SASAKI, T.; KIMURA, M.; TABUCHI, H.; ANDO, Y.; IRIE, S.; WARE, J.; NAKAI, Y.; HIGUCHI, S.; SUGIYAMA, Y. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 84, n. 1, 2008.

ZHANG, W.; YU, B. N.; HE, Y. J.; FAN, L.; LI, Q.; LIU, Z. Q.; WANG, A.; LIU, Y. L.; TAN, Z. R.; JIANG, F.; HUANG, Y. F.; ZHOU, H. H. Role of BCRP 421C>A Polymorphism On Rosuvastatin Pharmacokinetics In Healthy Chinese Males. **Clin. Chim. Act.**, v. 373, p. 99-103, 2006.

ZENDELOVSKA, D.; SIMESKA, S.; SIBINOVSKA, O.; KOSTOVA, E.; MILOSEVSKA, K.; JAKOVSKI, K.; JOVANOVSKA, E.; KIKERKOV, I.; TROJACANEC, J.; ZAFIROV, D. Development of an HPLC Method for the Determination of Nifedipine in Human Plasma by Solid-Phase Extraction. **J. Chromatogr. B**, v. 839, p. 85-88, 2006.

zu SCHWABEDISSEN, H. M.; KROEMER, H. K. *in vitro* and *in vivo* Evidence for the Importance of Breast Cancer Resistance Protein Transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 201, p. 325-71. doi:10.1007/978-3-642-14541-4_9. 2011.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (parecer nº1.317.466)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: .Influência de polimorfismos genéticos de ABCG2/BCRP no transporte da nifedipina para o leite materno em lactantes hipertensas.

Pesquisador: Bianca Nayra Malfará

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 50836415.6.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.317.466

Apresentação do Projeto:

O projeto descreve o tema proposto de maneira clara e objetiva. Encontra-se adequado quanto à forma e à apresentação.

Objetivo da Pesquisa:

Adequado

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, aprovou ad-referendum as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Influência de polimorfismo genéticos de

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

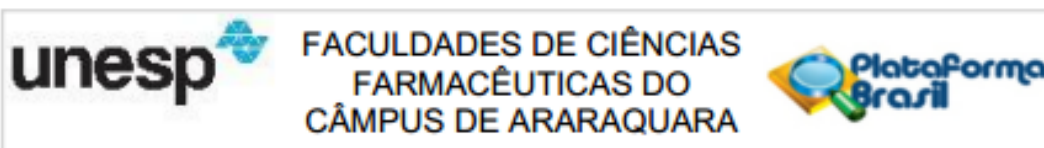
CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6897

E-mail: sta@fcar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.317.466

ABCG2/BCRP na transferência da nifedipina para o leite materno em lactantes hipertensas*, apresentado pela pesquisadora Bianca Nayra Malfará, sob orientação da Professora Doutora Natália Valadares de Moraes, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e toxicologia desta Faculdade.

Os Relatórios Parciais deverão ser entregues em MAIO de 2016; NOVEMBRO de 2016; MAIO de 2017 e o Relatório Final junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em SETEMBRO de 2017, em formulário para este fim.

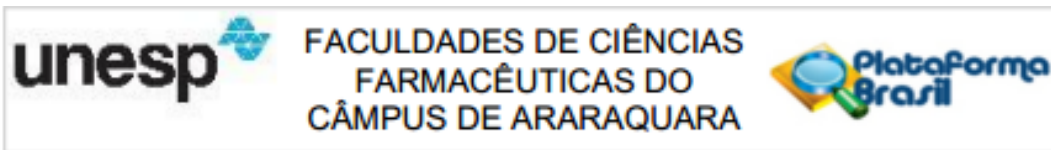
Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_623483.pdf	10/11/2015 09:18:23		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_FCF_UNESP.pdf	09/11/2015 19:38:08	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Outros	FolhadeaceiteUPC.pdf	09/11/2015 19:36:56	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Outros	relatorio_SAME.pdf	09/11/2015 19:33:14	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Outros	Carta_propONENTE_co_participante.pdf	09/11/2015 19:31:54	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	09/11/2015 19:27:07	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado.doc	09/11/2015 19:24:37	Bianca Nayra Malfará	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_nifedipina.pdf	09/11/2015 19:24:04	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Declaração de Pesquisadores	oficio_DGO.pdf	09/11/2015 19:21:31	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_realizacao_da_pesquisa_FCF_UNESP.pdf	09/11/2015 19:09:47	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	09/11/2015 19:08:36	Bianca Nayra Malfará	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
 Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-6897 E-mail: sta@fctfar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.317.468

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

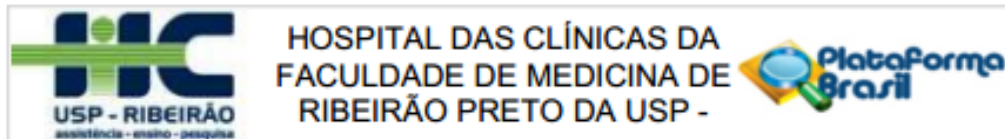
Não

ARARAQUARA, 11 de Novembro de 2015

**Assinado por:
Adriano Mondini
(Coordenador)**

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6897 E-mail: sta@fcar.unesp.br

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP-HCFMRP (parecer nº 1.332596)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: .Influência de polimorfismos genéticos de ABCG2/BCRP no transporte da nifedipina para o leite materno em lactantes hipertensas.

Pesquisador: Bianca Nayra Malfará

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 50836415.6.3001.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.332.596

Apresentação do Projeto:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

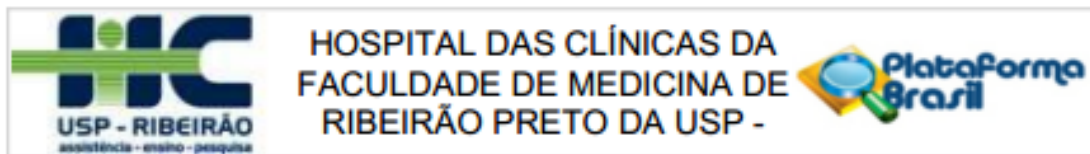
Apresentou carta de anuência do responsável pelo local de coleta no HCFMRP-USP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da Instituição Proponente.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.332.596

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_623483.pdf	10/11/2015 09:18:23		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_FCF_UNESP.pdf	09/11/2015 19:38:08	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Outros	FolhadeaceiteUPC.pdf	09/11/2015 19:36:56	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Outros	relatorio_SAME.pdf	09/11/2015 19:33:14	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Outros	Carta_proponente_co_participante.pdf	09/11/2015 19:31:54	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	09/11/2015 19:27:07	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado.doc	09/11/2015 19:24:37	Bianca Nayra Malfará	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_nifedipina.pdf	09/11/2015 19:24:04	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Declaração de Pesquisadores	oficio_DGO.pdf	09/11/2015 19:21:31	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_realizacao_da_pesquisa_FCF_UNESP.pdf	09/11/2015 19:09:47	Bianca Nayra Malfará	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	09/11/2015 19:08:36	Bianca Nayra Malfará	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 1.332.596

RIBEIRAO PRETO, 23 de Novembro de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Campus Universitário Monte Alegre – Ribeirão Preto – SP

PESQUISA CIENTÍFICA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Influência de polimorfismos genéticos de ABCG2/BCRP na transferência da nifedipina para o leite materno em lactantes hipertensas.

Nome do Paciente: _____
Data de nascimento ____/____/____ Registro e/ou Documento de Identificação: _____

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Bianca Nayra Malfará (FCF-UNESP), Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes (FCF-UNESP).
RESPONSÁVEIS CLÍNICOS: Prof. Dr. Geraldo Duarte (FMRP-USP), Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli (FMRP-USP).

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP) e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP (FCF-UNESP).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em ____/____/____ fui convidada e concordei voluntariamente em participar, como paciente, do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informada em detalhes pelo responsável da pesquisa que o estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

A nifedipina é um remédio aceito para o uso durante a gravidez e a amamentação para tratar a pressão arterial. A nifedipina pode passar para o leite materno durante a amamentação. O presente estudo visa avaliar a influência dos genes (código genético) do seu organismo na quantidade de nifedipina que passa para o leite da mãe. Como a senhora tem indicação médica para usar a nifedipina para tratar a pressão alta, a sua colaboração será importante para avaliarmos a exposição do bebê ao remédio nifedipina.

Inicialmente, no momento em que a senhora for atendida pelo médico durante o seu pré-natal você será avaliada por um profissional, sob responsabilidade dos Professores Dr. Geraldo Duarte e Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli, no ambulatório de hipertensão na gestação. Depois de 15 a 30 dias após o nascimento do seu bebê e enquanto estiver amamentando, a senhora será convidada a participar deste protocolo de pesquisa. Para isso, serão coletadas as seguintes amostras após jejum de 8 horas iniciado às 23 horas: leite materno (10mL, equivalentes a 2 colheres de sopa) e sangue (18mL, equivalentes a 4 colheres de sopa). Essas amostras serão usadas para avaliarmos a quantidade do remédio nifedipina no sangue e no leite materno. A amostra de sangue será usada também para a avaliação das funções do seu corpo e para avaliação dos genes. A avaliação dos genes poderá explicar a distribuição do remédio nifedipina no seu corpo. O volume total de sangue a ser coletado é 18mL. Este volume não é grande, pois representa menos de 1% do volume total de sangue do adulto, não representando nenhum risco.

Os riscos envolvidos com a sua participação no projeto são aqueles decorrentes de uma coleta de sangue, que são hematoma e dor no local da punção. Portanto, o procedimento que realizaremos é seguro.

A sua colaboração trará como benefícios o conhecimento de como os genes influenciam na transferência do remédio nifedipina para o leite materno. A sua participação poderá auxiliar na elaboração de futuras estratégias de intervenção para reduzir a exposição dos bebês a remédios usados na lactação como a nifedipina.

Eu, _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar:

1. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar minha vontade de continuar participando;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
3. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos benefícios, procedimentos e riscos ocasionados pelo tratamento a que serei submetida;
4. A garantia de acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo.

5. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;
6. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa.
7. Este documento é emitido em duas vias, sendo que uma dessas vias ficará com o participante da pesquisa e a outra com o pesquisador.

Tenho ciência do exposto acima e desejo o produto como método terapêutico recomendado pelos médicos que subscrevem este documento.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2016

Bianca Nayra Malfará
Pesquisador Responsável
CRF-SP: 68574, CPF: 392.004.608-01

Prof. Dr. Geraldo Duarte
Coordenador Clínico
CRM 34998, CPF: 061.191.586-34

Dra. Natália Valadares de Moraes
Pesquisador Responsável
CRF-SP: 67349, CPF: 318.183.798-99

Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli
Coordenador Clínico
CRM 91680, CPF: 705.704.006-78

Participante da pesquisa ou responsável legal

Identificação: _____

Contato: Bianca Nayra Malfará: (16) 99619 6090, e-mail: bia_malfara@yahoo.com.br

FCF-UNESP, Dept. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902, Araraquara, SP - Brasil

Dra. Natália Valadares de Moraes: (16) 3301 4689, (16) 98211 8363, e-mail: nmoraes@fcfar.unesp.br

FCF-UNESP, Dept. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902, Araraquara, SP - Brasil

Dr. Geraldo Duarte: (16)36022588, e-mail: gduarte@fmrp.usp.br

FMRP-USP, Dept. de Ginecologia e Obstetria, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP - Brasil

Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP: (16) 3602 2228

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-UNESP: (16)3301 4657

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1- _____
Assinatura Identificação

2- _____
Assinatura Identificação