



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Karine Souza Seba

**Determinação dos níveis de dextrometorfano e dextrorfano em saliva humana para
avaliação fenotípica de CYP2D6**

Rio de Janeiro

2017

Karine Souza Seba

**Determinação dos níveis de dextrometorfano e dexrorfano em saliva humana para
avaliação fenotípica de CYP2D6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Rita de Cássia Elias Estrela.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Rosane Vianna-Jorge.

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

S443d Seba, Karine Souza.
Determinação dos níveis de dextrometorfano e dextrorfano em saliva humana para avaliação fenotípica de CYP2D6 / Karine Souza Seba. -- 2017.
116 f. ; il. ; tab. ; graf.

Orientadora: Rita de Cássia Elias Estrela.
Coorientadora: Rosane Vianna-Jorge.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2017.

1. Dextrometorfano. 2. Dextrorfano. 3. Citocromo P-450 CYP2D6. 4. Preparações Farmacêuticas. 5. Sondas-utilização. 6. Métodos de Análise. 7. Tamoxifeno - uso terapêutico. 8. Antitussígenos - uso terapêutico. 9. Polimorfismo Genético.
I. Título.

CDD – 22.ed. – 615.72

Karine Souza Seba

**Determinação dos níveis de dextrometorfano e dexrorfano em saliva humana para
avaliação fenotípica de CYP2D6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 02 de agosto de 2017.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra Renata Santana Lorenzo Raices
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Sérgio Rabello Alves
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra Rita de Cássia Elias Estrela (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Nacional de Infectologia

Rio de Janeiro

2017

Aos meus pais, Nilma e Jorge, eu dedico esse trabalho. Obrigada por sempre apoiarem as minhas escolhas e por nunca me darem limites para sonhar. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Rita Estrela, eu agradeço por todos os sete anos de aprendizado como sua aluna. Obrigada pela confiança em mim e por toda a dedicação para que este trabalho fosse possível. Mais do que uma orientadora, você é uma amiga, e sentirei muitas saudades da nossa convivência, mas como você costuma dizer: “Orientador é para sempre”. Obrigada por tudo!

Ao meu marido, Felipe De Rosa, que acompanhou todo o processo. Obrigada pelas sessões de terapia e pelo super apoio diante dos altos e baixos ao longo desse período. Eu agradeço por todo o amor, compreensão, cumplicidade e colo. Você é o melhor do universo.

À Vitória Catanni, por me dar suporte técnico nas análises laboratoriais e “suporte psicológico” com mimos em forma de “twix” após as tentativas frustradas de validação. Obrigada, Vi, por se fazer presente desde a minha graduação e dar continuidade ao trabalho que iniciei. Você foi muito importante na realização desse trabalho.

À Edlaine, por me ensinar a operar o espectrômetro de massas. Obrigada por sempre estar disponível e me dar suporte mesmo de longe. Eu agradeço pela paciência, amizade e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora, Rosane Vianna-Jorge, pela ajuda na realização desse trabalho.

Às minhas irmãs, Marcelle e Camille, pela compreensão diante da minha ausência e por fazerem a minha vida mais feliz.

Aos amigos da turma de mestrado, por compartilharem muitos momentos de incertezas, frustrações e desafios, e pela motivação que vocês me deram.

Aos professores do curso de mestrado, pelos ensinamentos e por contribuir para a minha formação.

Aos amigos do LabFARMA, Thales e Camila, pelas conversas e por todo o suporte, que fizeram a rotina do laboratório ser mais leve e divertida.

Aos amigos da vida, em especial Bella, Érica, Paula, Felipe e Marta pela compreensão e apoio incondicionais no período do mestrado e sempre.

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.

Albert Einstein

RESUMO

A CYP2D6 é uma enzima metabólica e sua atividade varia entre indivíduos em função de fatores genéticos, ambientais, presença de doenças e/ou comedições. A fenotipagem de CYP2D6 com dextrometorfano (DXM) é uma abordagem útil para a determinação da atividade metabólica individual de CYP2D6 e seu procedimento envolve o uso de um método analítico adequado. O uso de matrizes alternativas como a saliva pode tornar a fenotipagem mais simples, e favorecer sua aplicação na rotina clínica. O objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método analítico em CL-EM/EM para a quantificação de DXM e dextrorfano (DTF) em saliva humana. Foi necessária uma alíquota de 200 µl de amostras de saliva, processadas utilizando-se a precipitação de proteínas com metanol. O método utilizou uma coluna Zorbax Eclipse fenil XDB (150 x 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel constituída de tampão formiato de amônio 10 mM e acetonitrila, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, nas proporções de 65:35 (v:v) e fluxo de 1 ml/min. Os compostos foram eluídos em sistema de eluição isocrático, com tempos de retenção de 2,6 min (DTF), 3,6 min (padrão interno) e 5 min (DXM). O método mostrou ser preciso ($CV\% \leq 7,5$), exato (EPR%: -13,6 a +8,8), e linear ($r \geq 0,997$) nas faixas de concentração de 1-100 ng/ml para DTF e de 5-1000 ng/ml para DXM. Adicionalmente, nenhum efeito matriz ($CV\% \leq 11,8$) ou questões relacionadas à estabilidade dos compostos foram observados para todas as condições testadas. A aplicação do método foi demonstrada através da determinação de DTF e DXM em 53 amostras de saliva de mulheres com câncer de mama em tratamento com tamoxifeno. Foi administrada uma dose de 30 mg de DXM e amostras de saliva foram coletadas 4 h após a dose. As concentrações salivares variaram de 12,3 a 3232 ng/ml para o DXM e de < 1 a 19,9 ng/ml para o DTF. Os valores de razão metabólica ($RM_{DXM/DTF}$) foram calculados individualmente para a classificação fenotípica e variaram de 4 a 383, sendo todas as pacientes classificadas como metabolizadoras extensivas. O presente método é adequado para a quantificação de DTF e DXM em saliva e pode ser aplicado na rotina clínica para a fenotipagem de CYP2D6.

Palavras-chave: Dextrometorfano. Fenotipagem de CYP2D6. Fármaco-sonda. CL-EM/EM.

ABSTRACT

CYP2D6 is a metabolic enzyme and its activity varies according to factors like environment, genetic, drug interactions and disease determinants. CYP2D6 phenotyping with dextromethorphan (DXM) is a useful approach to determine an individual metabolic activity and its procedure involves the use of an appropriate analytical method. The use of alternative matrices such as saliva can make phenotyping simpler, and favor its application in the clinical routine. The aim of this study was to develop and validate an analytical method in LC-MS/MS for DXM and dextrophan (DX) quantification in human saliva. Aliquots of 200 μ l of saliva were required for analysis and samples were processed with methanol for protein precipitation. The method used a Zorbax Eclipse phenyl XDB column (150 x 4,6 mm; 5 μ m) and mobile phase consisting of 10 mM ammonium formate buffer and acetonitrile, both acidified with 0.1% formic acid, in the proportions of 65:35 (v: v) and flow rate of 1 ml / min. The compounds were eluted using an isocratic system, and the retention times were 2.6 min, 3.6 min and 5 min for DX, internal standard and DXM, respectively. The method was precise ($CV\% \leq 7.5$), accurate (EPR%: -13.6 to +8.8), and linear ($r \geq 0.997$) in the concentration ranges of 1-100 ng/ml for DX and 5-1000 ng/ml for DXM. In addition, neither matrix effect ($CV\% \leq 11,8$) or stability issues were observed for all tested conditions. The application of the method was demonstrated by the determination of DX and DXM in 53 saliva samples from women with breast cancer under tamoxifen therapy. A dose of 30 mg of DXM was administered and saliva samples were collected 4 hours after dose. Salivary concentrations ranged from 12.3 to 3232 ng/ml for DXM and from < 1 to 19.9 ng/ml for DX. The metabolic ratio ($MR_{DXM/DX}$) values were individually calculated for phenotype classification and ranged from 4 to 383, all patients being classified as extensive metabolizers. The present method is suitable for the quantification of DX and DXM in saliva and may be applied in clinical routine for CYP2D6 phenotyping.

Keywords: Dextromethorphan. CYP2D6 phenotyping. Probe drug. LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resumo dos alelos de CYP2D6 com SNPs e/ou pequenas deleções e inserções.....	20
Figura 2 -	Duplicação ou multiplicação do gene CYP2D6	22
Figura 3 -	Distribuição de frequências da RM DXM/DTF em saliva do estudo de Lutz et al. (2004).....	36
Figura 4 -	Moléculas de dextrometorfano e dexrorfano.....	36
Figura 5 -	Metabolização do dextrometorfano pelo sistema citocromo P-450 ...	39
Figura 6 -	Método de processamento das amostras escolhido	57
Figura 7 -	Cromatogramas de amostras de C7 (A) e saliva branca (B), obtidos com a utilização da coluna Ascentis Express	58
Figura 8 -	Cromatogramas mostrando os picos cromatográficos dos compostos e PI em solução e em saliva	59
Figura 9 -	Cromatogramas de amostras de saliva branca para ensaio de seletividade	60
Figura 10 -	Cromatogramas do ensaio de efeito residual	65
Figura 11 -	Dados de comorbidades e uso de medicamentos (n= 44)	68
Figura 12 -	Cromatograma de amostra de saliva da paciente 051	69
Figura 13 -	Gráficos de distribuição de frequência de RM DXM/DTF em escala log	70
Figura 14 -	Resultado do teste BIC	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Frequências das principais variantes alélicas nas populações mundiais.....	23
Quadro 2 -	Classificação fenotípica com base nos genótipos	25
Quadro 3 -	Propriedades físico-químicas do dextrometorfano	37
Quadro 4 -	Parâmetros farmacocinéticos de DXM e DTF	40
Quadro 5 -	Metodologias em cromatografia líquida para determinação simultânea de DXM e DTF	42
Quadro 6 -	Dados demográficos e de hábitos de vida das pacientes (N=49)	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Preparo de calibradores e CQs em saliva	47
Tabela 2 -	Sistemas cromatográficos testados	49
Tabela 3 -	Parâmetros de operação do espectrômetro de massas	57
Tabela 4 -	Resultados de precisão e exatidão inter-corrída	62
Tabela 5 -	Resultados de precisão e exatidão intra-corrída	63
Tabela 6 -	Resultados do ensaio de efeito matriz	64
Tabela 7 -	Resultados dos ensaios de estabilidade	66
Tabela 8-	Parâmetros cromatográficos do presente método e dos métodos já descritos para quantificação em saliva	74
Tabela 9 -	Determinação de DTF e DXM em saliva humana em diferentes estudos	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-HM	3-hidroxi- morfinano
3-MM	3-metoxi-morfinano
4OHD	4-hidroxi-debrisoquina
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIC	Crítérios de informação bayesiano
CE	Energia de colisão
CG-EM/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas triplo- quadropolo
CL-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas triplo-quadropolo
CQA	Controle de qualidade alta
CQB	Controle de qualidade baixo
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
CXP	Potencial de saída da célula de colisão
DHS	Desidrosparteína
DP	Potencial de desaglomeração
DTF	Dextrorfano
DXM	Dextrometorfano
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
EPR	Erro padrão relativo

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Fator de matriz normalizado pelo padrão interno
FS	Fármaco-sonda
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LVF	Levalorfano
ME	Metabolizador extensivo
MeOH	Metanol
MI	Metabolizador intermediário
MP	Metabolizador pobre
MRM	Monitoração de reações múltiplas
MUR	Metabolizador ultrarrápido
NMDA	N-metil-D-aspartato
PI	Padrão interno
RAM	Reações adversas ao medicamento
RM	Razão metabólica
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
SNVs	Variações de nucleotídeos
STBs	Soluções de trabalho
TAM	Tamoxifeno
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	A CYP2D6.....	19
2.1.1	Estrutura do gene <i>CYP2D6</i> e polimorfismos	19
2.1.2	Avaliação do perfil de metabolização para CYP2D6	24
2.1.3	Relevância clínica da CYP2D6 no uso de medicamentos	26
2.2	A FENOTIPAGEM DE CYP2D6	29
2.2.1	Medidas e procedimentos	29
2.2.2	Fármacos-sonda de CYP2D6	29
2.2.2.1	Debrisoquina e esparteína.....	30
2.2.2.2	Metoprolol	31
2.2.2.3	Tramadol	32
2.2.2.4	Dextrometorfano	33
2.3	DEXTROMETORFANO.....	36
2.3.1	Propriedades físico-químicas	36
2.3.2	Usos gerais	37
2.3.3	Farmacodinâmica e farmacocinética	38
2.3.4	Toxicidade	40
2.4	DETERMINAÇÃO DE DEXTROMETORFANO E DEXTRORFANO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo principal.....	44
3.2	Objetivos secundários	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAL.....	45
4.2	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA.....	46
4.2.1	Preparo das soluções-padrão, padrões de calibração e controles de qualidade	46
4.2.2	Escolha do método de processamento da amostra biológica	48
4.2.3	Parâmetros do espectrômetro de massas	48
4.2.4	Parâmetros cromatográficos	48
4.3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA	49

4.4	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA	54
4.4.1	Protocolo do estudo	54
4.4.2	Questões éticas	54
4.4.3	Análise das amostras de pacientes	54
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	56
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	56
5.1.1	Método de processamento das amostras	56
5.1.2	Definição dos parâmetros de espectrometria de massas	57
5.1.3	Definição dos parâmetros cromatográficos	57
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	60
5.3	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA	67
5.3.1	Descrição da amostra	67
5.3.2	Determinação dos níveis de DTF e DXM em saliva e classificação fenotípica	68
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A – CONCENTRAÇÕES DE DXM E DTF EM AMOSTRAS DE SALIVA	89
	APÊNDICE B - ARTIGO CIENTÍFICO PARA PUBLICAÇÃO	91
	ANEXO – CURVAS DE CALIBRAÇÃO	109

1 INTRODUÇÃO

As diferenças na resposta terapêutica a determinados medicamentos são comuns entre os indivíduos. Essa variabilidade de resposta é observada devido à contribuição de múltiplos fatores como, por exemplo, fatores ambientais, genéticos, hábitos alimentares, interações medicamentosas e/ou presença de doenças que possam interferir na farmacocinética do fármaco em questão (WILKINSON, 2005). Atualmente, existe um entendimento mais amplo de como esses fatores podem influenciar na farmacocinética e na resposta clínica a determinados tratamentos, especialmente quando o fármaco utilizado é metabolizado predominantemente pelas enzimas metabólicas do citocromo P-450 (WILKINSON, 2005).

A CYP2D6 é uma enzima pertencente ao citocromo P-450, responsável pela metabolização de uma série de fármacos comumente prescritos na prática clínica como, por exemplo, antidepressivos tricíclicos, neurolépticos, antiarrítmicos, β -bloqueadores entre outros (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). Esta enzima é codificada por um gene altamente polimórfico, para o qual já foram descritas mais de 100 variantes alélicas (YANG *et al.*, 2017). Já é bem estabelecido que, devido principalmente a essas diferenças genéticas, a atividade metabólica dessa enzima varia consideravelmente entre indivíduos (GAEDIGK *et al.*, 2008). Fármacos metabolizados pela via CYP2D6 podem apresentar variações importantes quanto aos parâmetros farmacocinéticos, bem como quanto aos efeitos farmacológicos. Essas diferenças podem levar desde a ocorrência de efeitos adversos graves, a ausência ou baixa resposta a determinados tratamentos farmacológicos (SAMER *et al.*, 2013).

A determinação do perfil de metabolização para CYP2D6 tem sido uma estratégia amplamente adotada para a individualização da terapia de fármacos substratos de CYP2D6, uma vez que auxilia na tomada de decisões clínicas (SAMER *et al.*, 2013). Empregando-se os métodos de genotipagem ou fenotipagem com fármaco-sonda (FS), é possível avaliar a atividade enzimática de CYP2D6 e classificar os indivíduos em quatro diferentes perfis de metabolização, sendo eles: metabolizador pobre (MP) - com atividade enzimática praticamente nula; metabolizador intermediário (MI) - com atividade enzimática reduzida; metabolizador extensivo (ME) - com atividade enzimática normal e metabolizador ultrarrápido (MUR) - com atividade enzimática elevada (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004).

Estudos mostram que indivíduos classificados como MP para CYP2D6 podem apresentar níveis plasmáticos mais elevados de fármacos como os antiarrítmicos e antidepressivos, devido à depuração diminuída, apresentando por isso maior incidência de reações adversas ao medicamento (RAM). Por outro lado, indivíduos classificados como MUR, podem apresentar níveis plasmáticos insuficientes devido à depuração aumentada, levando muitas vezes à ineficácia terapêutica (SAMER et al., 2013). No caso de pró-fármacos como o tamoxifeno e alguns opióides, por exemplo, essa relação pode ser inversa, uma vez que a eficácia terapêutica é muitas vezes atribuída à formação de um metabólito ativo (BEVERAGE et al., 2007; BROUSSEAU et al., 2007; GOETZ; AMES; KAMAL, 2008; SAMER et al., 2010).

O método mais comum utilizado para a classificação do perfil de metabolização é a genotipagem de CYP2D6. O genótipo de CYP2D6 é determinado individualmente a partir da identificação dos alelos e, por conseguinte, traduzido em um perfil de metabolização (GAEDIGK, 2013). Embora tenha se mostrado útil em diferentes contextos, umas das principais questões acerca da genotipagem é o fato desta técnica avaliar unicamente fatores genéticos, não levando em consideração outros fatores que contribuem para a variabilidade da atividade enzimática (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

Uma abordagem mais completa para se classificar um indivíduo quanto ao perfil de metabolização de CYP2D6 é a fenotipagem com fármaco-sonda (FS). Esse procedimento é realizado através da administração de um FS, como por exemplo o dextrometorfano (DXM), seguida do cálculo da razão metabólica (RM) entre os níveis do fármaco inalterado e seu principal metabólito (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016). Por se tratar de uma medição indireta da atividade metabólica individual, essa estratégia é capaz de avaliar a influência de outros fatores além dos fatores genéticos (ex: fatores ambientais ou presença de inibidores ou indutores enzimáticos) na atividade enzimática (OPDAM et al., 2015).

Na fenotipagem com FS é necessária a utilização de uma metodologia analítica adequada para a determinação dos níveis de fármaco inalterado e seu metabólito. Diversos métodos para determinação de DXM e DTF em plasma e/ou urina já foram documentados (AFSHAR; ROUINI; AMINI, 2004; ANTUNES et al., 2014; DONATO et al., 2012; EBESHI; OBODOZIE; BOLAJI, 2014; LOOS et al., 2011), porém, até o momento, poucos são os métodos que utilizam a saliva como matriz biológica para a análise desses compostos. Dentre os métodos já descritos para a determinação em saliva, todos apresentam pelo menos uma limitação relevante como, por exemplo, o preparo de amostras

envolvendo procedimentos demorados e/ou de alto custo (AMARATUNGA et al., 2016; LUTZ et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008) e a necessidade de altos volumes de amostra (até 3 ml) (HOU et al., 1991; HU et al., 1998). Logo, o objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método simples por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com triplo-quadrupolo (CL-EM/EM) para a determinação de DXM e DTF em saliva que possa ser aplicado na fenotipagem de CYP2D6.

2 REVISÃO DA LITERATURA

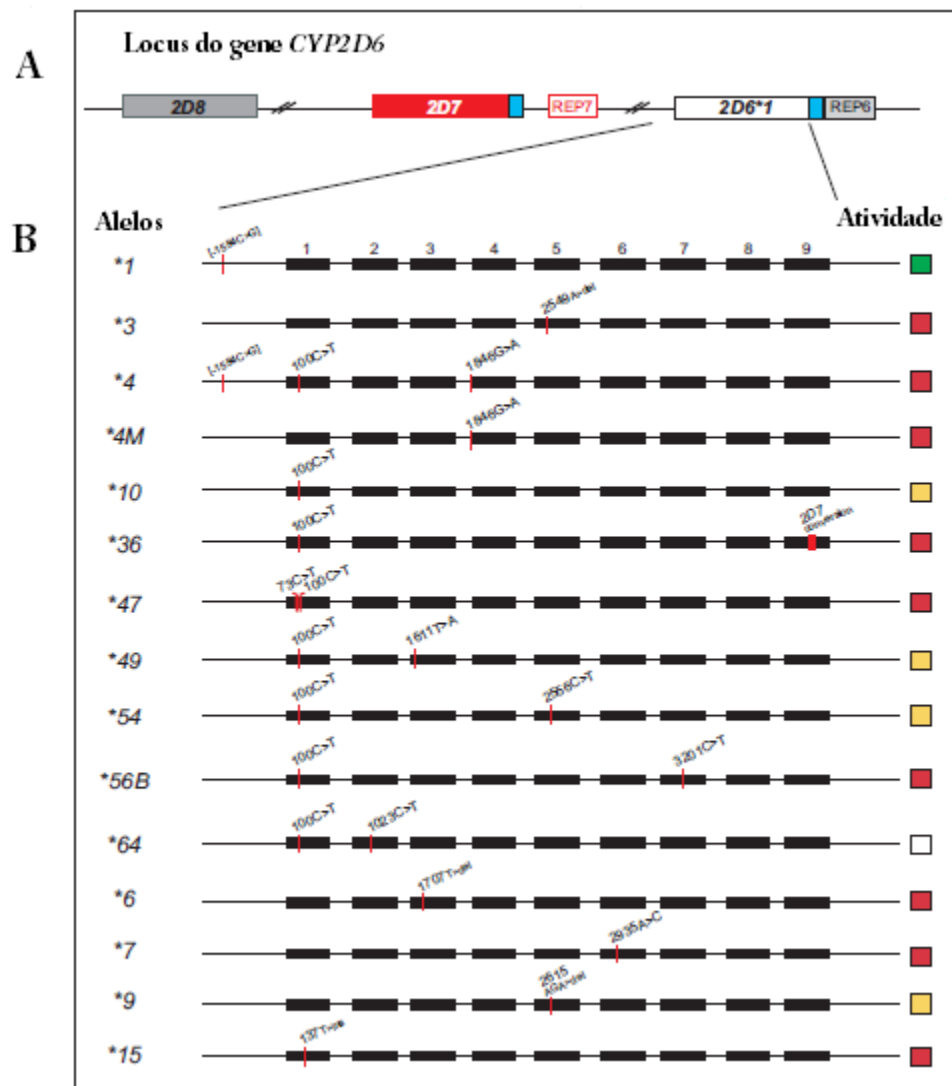
2.1 A CYP2D6

2.1.1 Estrutura do gene *CYP2D6* e polimorfismos

O *CYP2D6* é um gene localizado no cromossomo 22q13.1, no *locus* da CYP2D, e é composto por 4400 nucleotídeos e 9 exons. No mesmo *locus*, estão presentes dois outros genes vizinhos e inativos (pseudogenes), o *CYP2D7* e o *CYP2D8*, os quais não codificam proteínas funcionais (figura 1-A) (GAEDIGK, 2013). Esses três genes apresentam entre eles uma similaridade de nucleotídeos de 92-97% entre introns e exons. Ao longo da evolução humana, acredita-se que o *CYP2D7* e o *CYP2D8* contribuíram parcialmente para a alta prevalência de variantes genéticas no gene *CYP2D6*, através da transferência de mutações via conversão de genes (TEH; BERTILSSON, 2012).

O gene *CYP2D6* codifica a produção da enzima metabólica CYP2D6 do citocromo P-450, que age na biotransformação de fármacos, compostos endógenos e xenobióticos, catalizando reações de oxidação (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). A descoberta de variações na atividade metabólica da CYP2D6 se deu inicialmente em 1977, pelo estudo de Mahgoub et al. (1977). Neste estudo, os autores observaram a ocorrência de variações na hidroxilação de debrisoquina, um substrato seletivo de CYP2D6 (MAHGOUB et al., 1977). Alguns anos mais tarde, Eichelbaum et al. (1986) relataram também um efeito similar no processo de oxidação da esparteína, também substrato da CYP2D6 (EICHELBAUM et al., 1986). Essas variações interindividuais foram atribuídas à ocorrência de variações alélicas do gene *CYP2D6*.

Mais de 100 variantes alélicas já foram identificadas para o gene *CYP2D6* (YANG et al., 2017). As diferentes variantes alélicas levam à produção de enzimas CYP2D6 com diferentes graus de atividade entre os indivíduos (WILKINSON, 2005). As principais mutações que levam a formação dessas variantes são: 1) presença de uma ou mais variações de nucleotídeos (SNVs) como polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos; 2) rearranjo de genes, resultando em deleções, duplicações, multiplicações, ou genes híbridos compostos por *CYP2D6* e *CYP2D7*; e 3) presença de pequenos fragmentos derivados de *CYP2D7*, normalmente conhecido como conversão do intron 1 e exon 9 do gene *CYP2D7* (GAEDIGK, 2013). Os tipos mais comuns de polimorfismos são mostrados nas figuras 1(B) e 1(C).



Figural(A e B): Resumo dos alelos de *CYP2D6* com SNPs e/ou pequenas deleções e inserções. (A) Representação do *locus* do gene *CYP2D* com os três genes; (B) Alelos de *CYP2D6* com ausência de SNP C>T na posição 2850 (caracterizados como “*CYP2D6**1-like”); A atividade correspondente a cada alelo é indicada por cores ao lado direito: verde= funcional; amarelo= função reduzida; vermelho= não funcional ou nulo; branco= atividade desconhecida. Figura adaptada de Gaedgik A., 2013..

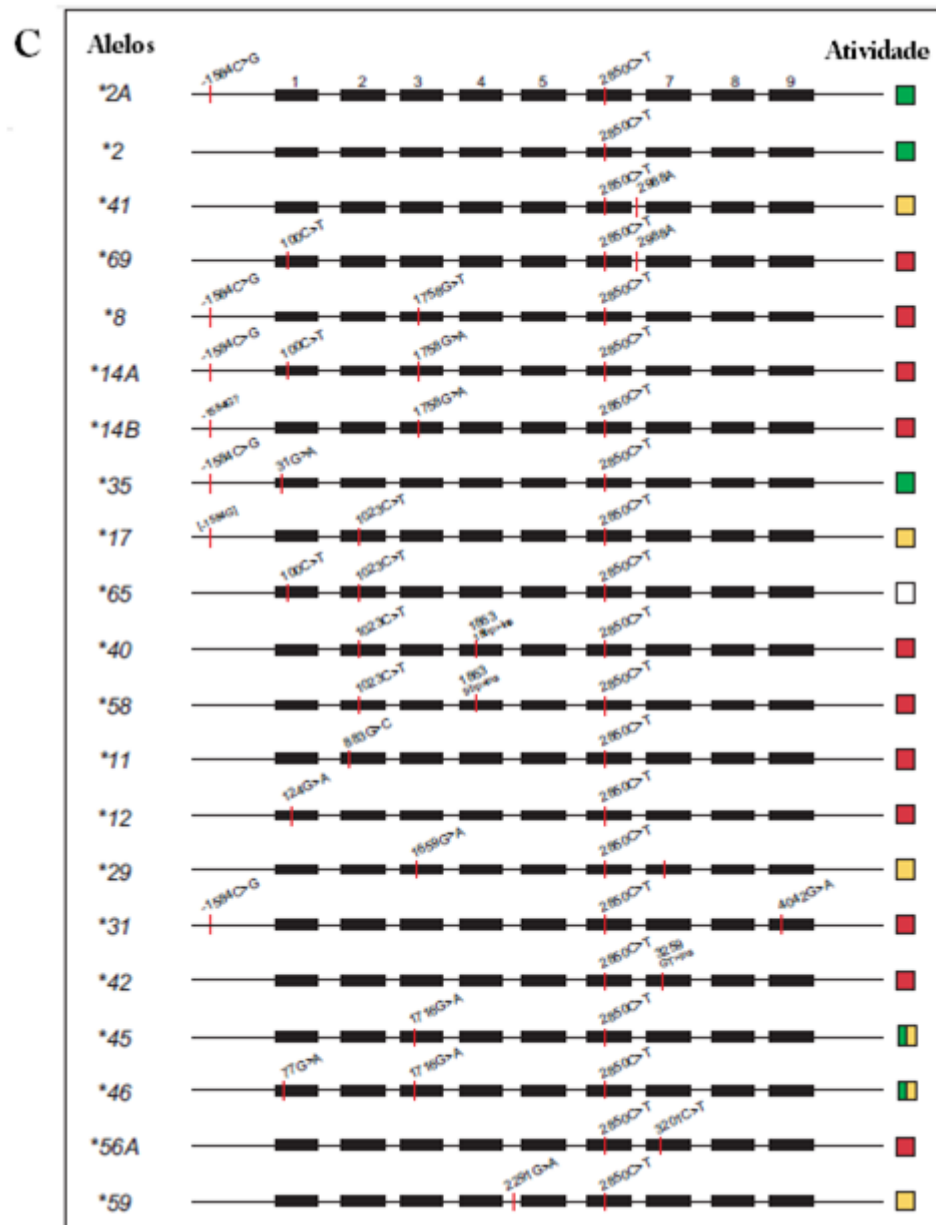


Figura 1 (C): Alelos de *CYP2D6* que possuem SNP C>T na posição 2850 (caracterizados como “*CYP2D6**2-like”). A atividade correspondente a cada alelo é indicada por cores ao lado direito: verde= funcional; amarelo= função reduzida; vermelho= não funcional ou nulo; branco= atividade desconhecida. Figura adaptada de Gaedigk A., 2013.

Os alelos CYP2D6*1, *2 e *35 são conhecidos como alelos funcionais, relacionados à atividade enzimática normal. Os alelos CYP2D6*9, *10, *17, *29 e *41 são os principais relacionados à função enzimática reduzida. Já os alelos *3, *4, *6, *7 e *8 são os alelos nulos mais reportados em estudos, que levam à perda de função enzimática (GAEDIGK et al., 2008). Há ainda a ocorrência de duplicações ou multiplicações do gene (figura 2) que normalmente resulta em atividade enzimática aumentada. A mais comum é a CYP2D6*2x2, na qual ocorre a duplicação do alelo funcional CYP2D6*2. Outras variações incluem CYP2D6*1xN, *2xN, *4xN (não funcional), *10xN, *41xN e *45xN (GAEDIGK et al., 2008).

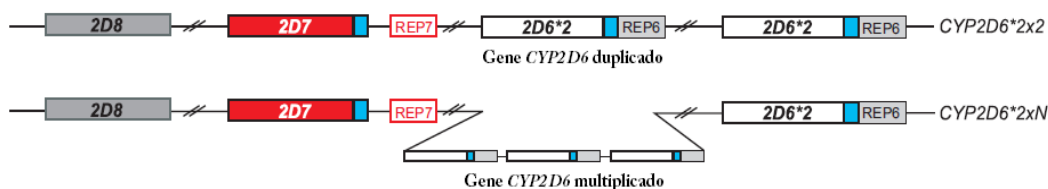


Figura 2: Duplicação ou multiplicação do gene *CYP2D6*.

Fonte: adaptado de Gaedigk A., 2013.

A frequência dos alelos de *CYP2D6* pode variar consideravelmente entre etnias. Estudos mostram que a frequência do alelo nulo CYP2D6*4 é alta em caucasianos (20-25%), embora baixa ou inexistente em algumas populações da Ásia ou Oceania. Por outro lado, as populações asiáticas apresentam uma frequência muito alta do alelo CYP2D6*10 (até 64%) com função reduzida quando comparada à outras populações (3-7%). Já o alelo de função reduzida CYP2D6*17 é observado predominantemente em populações africanas e afro-americanas com frequência variando de 14-26%. Esse alelo pode também ser encontrado em muitas populações com descendência africana como a população brasileira, por exemplo (BRADFORD, 2002; TEH; BERTILSSON, 2012; ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004).

As frequências de duplicações ou multiplicações do gene *CYP2D6* também são diferentes entre populações. As frequências de CYP2D6*1xN ou *2xN assumem valores de 1-2% para norte-europeus e de 5-10% para população do oriente médio, mediterrâneo e norte-africanos. Já para a população da Etiópia e da Papua Nova Guiné, as frequências chegam a valores de 16% e 13%, respectivamente (GAEDIGK, 2013). O quadro 1 descreve as frequências das principais variantes alélicas nas diferentes populações do

mundo.

Assim como esperado, há também uma diferença na prevalência de MP entre as populações. Em caucasianos, a prevalência de MP é de 7-10% enquanto em asiáticos assume valores de 1-2%, devido à baixa frequência dos alelos CYP2D6*3 e*4. Já em africanos a prevalência de MP pode variar de 0-19% (BRADFORD, 2002).

Quadro 1 - Frequências das principais variantes alélicas nas populações mundiais

Alelos	África	Afro-americanos	Europa e América do norte	Oriente médio	Leste asiático	Sul e centro asiático	América	Oceania
*1	0.39	0.41	0.52	0.59	0.34	0.53	0.62	0.70
*2	0.20	0.12	0.27	0.24	0.12	0.31	0.24	0.012
*3	0.0003	0.0034	0.013	0.0013	0.00	0.00	0.0052	0.00
*4	0.033	0.06	0.18	0.076	0.0045	0.065	0.11	0.011
*5	0.06	0.058	0.028	0.023	0.058	0.025	0.016	0.049
*6	0.00	0.0027	0.0091	0.0096	0.0002	0.00	0.005	0.00
*7	0.00	0.00	0.0012	0.00	0.00	ND	0.00	0.00
*8	0.00	0.00	0.0003	0.00	0.00	ND	0.0015	0.00
*9	0.0010	0.0054	0.02	0.00	0.0008	0.014	0.013	0.00
*10	0.067	0.043	0.028	0.035	0.42	0.19	0.034	0.016
*14	0.0013	0.00	0.00	0.00	0.0092	0.00	0.0047	0.00
*17	0.19	0.18	0.0027	0.014	0.0002	0.0038	0.023	0.0005
*36	0.00	0.0056	0.00	0.00	0.017	ND	ND	0.00
*41	0.10	0.10	0.092	0.22	0.022	0.10	0.057	0.00
xN	0.075	0.043	0.028	0.067	0.015	0.013	0.033	0.088
*1xN	0.014	0.0044	0.0077	0.038	0.0031	0.0050	0.0078	0.11
*2xN	0.015	0.016	0.013	0.036	0.0042	0.0050	0.023	0.00
*4xN	0.014	0.020	0.0028	0.00	0.00	0.00	0.0036	0.00

Legenda: ND: não determinado.

Fonte: Adaptado do estudo de HICKS et al., 2013.

2.1.2 Avaliação do perfil de metabolização para CYP2D6

Através de métodos de genotipagem ou fenotipagem é possível avaliar a atividade enzimática de CYP2D6 e classificar os indivíduos em 4 diferentes perfis de metabolização: MP - com atividade enzimática praticamente nula; MI - com atividade enzimática reduzida; ME - com atividade enzimática normal e MUR - com atividade enzimática elevada (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004).

A determinação do genótipo para *CYP2D6* ao longo dos anos mostrou ser uma estratégia útil para a classificação do perfil metabólico em diferentes contextos clínicos (exemplos: farmacoterapias com antidepressivos ou com tamoxifeno) (GOETZ; AMES; KAMAL, 2008; HICKS et al., 2013), sendo atualmente o método de escolha. A genotipagem para *CYP2D6* é feita através da identificação das variantes alélicas e subsequentemente da tradução dos genótipos em diferentes fenótipos (HICKS; SWEN; GAEDIGK, 2014).

Diferentes sistemas de tradução já foram propostos e fatores como a falta de um método padrão de tradução e a variedade de variantes alélicas avaliadas nos estudos são apontados como limitações que corroboram para resultados controversos na literatura além de dificultar a tomada de decisões clínicas (HICKS; SWEN; GAEDIGK, 2014).

Frente à necessidade de padronização, um método proposto por Gaedigk et al. (2008), tem sido bem aceito e implementado atualmente (YANG et al., 2017). Este método consiste em um sistema de classificação fenotípica com base em pontuações. Para cada alelo de *CYP2D6* identificado é atribuída uma pontuação de acordo com sua atividade (pontuação: 1 para funcionais, 0,5 para função reduzida e 0 para nulos) e a soma das pontuações dos alelos indica o fenótipo para CYP2D6 do indivíduo (GAEDIGK et al., 2008). Caso seja identificada a presença de duplicações do gene, a pontuação do alelo duplicado é multiplicada pelo número de duplicações antes de se calcular a pontuação final. Por fim, pacientes com pontuação final de 0 são classificados como MP, aqueles com pontuação 0,5 são classificados como MI e aqueles com pontuação entre 1,0 e 2,0 são classificados como ME (quadro 2) (GAEDIGK et al., 2008). Não existe um consenso se pacientes com pontuação final igual a 1,0 devem ser classificados como MI ou ME (HICKS et al., 2013).

Quadro 2: Classificação fenotípica com base nos genótipos

Fenótipo	Pontuação final	Genótipo	Exemplos de diplótipos
MUR	> 2,0	Indivíduos com duplicações em um alelo funcional	(*1/*1) x N, (*1/*2) x N, (*2/*2) x N
ME	1,0-2,0	Indivíduos com 2 alelos funcionais ou dois alelos com função reduzida ou um alelo funcional e um nulo ou um alelo funcional e um com função reduzida	*1/*1, *1/*2,*2/*2, *1/*9, *1/*41, *41/*41, *1/*5, *1/*4
MI	0,5	Indivíduos com um alelo com função reduzida e um nulo	*4/*41, *5/*9, *4/*10
MP	0	Indivíduos com 2 alelos nulos	*4/*4, *3/*4, *5/*5, *5/*6

Legenda: ME- metabolizador extensivo; MI- metabolizador intermediário; MP- metabolizador pobre; MUR- Metabolizador ultrarrápido.

Fonte: Gaedigk et al, 2008; Hicks et al, 2013.

Embora o genótipo de *CYP2D6* seja responsável por grande parte da variabilidade na atividade enzimática, ele não é capaz de explicar sozinho as diferenças interindividuais observadas para a via. Alguns fatores desconsiderados pela genotipagem podem modificar a atividade enzimática da *CYP2D6* como fatores ambientais (coadministração de indutores ou inibidores enzimáticos e hábitos alimentares) e presença de comorbidades (doenças hepática ou renal, câncer e infecções) (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). A presença de um desses fatores pode levar a uma conversão do fenótipo, na qual um indivíduo sofre uma mudança temporária no perfil de metabolização. Logo, indivíduos genotipados como ME podem apresentar temporariamente um fenótipo MP, devido à administração de um inibidor enzimático, por exemplo. Da mesma forma, indivíduos genotipados como MP podem ser convertidos em ME temporariamente, na presença de um fármaco indutor enzimático ou de outros fatores (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016).

Por esse motivo, para se obter uma caracterização mais precisa da atual capacidade metabólica de um indivíduo deve-se preconizar a fenotipagem com fármaco-sonda (FS). A fenotipagem consiste em uma medição indireta da atividade metabólica de uma via utilizando-se um fármaco marcador de metabolização (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016). O método de fenotipagem tem a capacidade de captar a complexidade do sistema metabólico, considerando, além dos polimorfismos genéticos, fatores ambientais e

interações farmacocinéticas que venham a interferir na capacidade da via. Com isso, suas medidas se traduzem em resultados mais fidedignos, e em um maior poder de predição em farmacoterapias, quando comparado à genotipagem (OPDAM et al., 2015).

2.1.3 Relevância clínica da CYP2D6 no uso de medicamentos

Embora a CYP2D6 represente apenas entre 1-5% do conteúdo hepático de CYPs, esta isoenzima é responsável pela metabolização de até 25% dos fármacos comumente prescritos na prática clínica como antidepressivos, antipsicóticos, opióides dentre outros (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). Sabe-se que a variabilidade interindividual relacionada à atividade dessa enzima tem impactos significativos na prática clínica, em especial, na terapia medicamentosa (INGELMAN-SUNDBERG, 2005).

Uma série de estudos mostra que fármacos metabolizados pela via CYP2D6 podem apresentar variações importantes quanto ao grau de exposição do organismo (farmacocinética) bem como quanto aos efeitos farmacológicos (farmacodinâmica) (SAMER et al., 2013). Essas diferenças podem levar desde a ocorrência de efeitos adversos graves à ausência ou baixa resposta a determinados tratamentos farmacológicos. Alguns dos principais medicamentos afetados por essas diferenças incluem antipsicóticos (ex: antidepressivos e neurolépticos), antiarrítmicos, opióides e o tamoxifeno (SAMER et al., 2013).

Os agentes antipsicóticos são em sua maioria metabolizados pela via CYP2D6, mesmo que parcialmente. Dados da literatura mostram uma redução importante na eliminação, além do aumento do tempo de meia vida de vários antipsicóticos como o haloperidol, a perfenazina e o zuclopentixol em pacientes com fenótipo MP (DAHL, 2002). Com isso, uma associação importante pode ser observada entre MP e maior incidência de efeitos tóxicos relacionados à terapia.

Em um estudo envolvendo pacientes psiquiátricos, a frequência de MP foi 2 vezes maior para os pacientes que apresentaram RAM quando comparado ao grupo de pacientes sem RAM (44% versus 21%) (CHEN et al., 1996). Outro estudo desenvolvido por CHOU et al. (2000) mostrou que entre os pacientes em terapia com antipsicóticos (haloperidol, risperidona, tioridazina, perfenazina, dentre outros), a ocorrência de RAM tende a ser maior em pacientes MP e menor em MUR (CHOU et al., 2000).

Para os antidepressivos, a definição do perfil de metabolização pode ser bastante relevante clinicamente tanto para a toxicidade quanto para a garantia da eficácia. Os MP

apresentam uma depuração reduzida para muitos fármacos antidepressivos (nortriptilina, clomipramida, fluoxetina, desipramina, imipramina, amitriptilina, e outros) sendo as RAMs muito frequentes nesses pacientes (BERTILSSON et al., 2002). Em um estudo realizado por Spina et al. (1997) envolvendo pacientes em tratamento com desipramina (100 mg por dia por 3 semanas) foi observado que os dois pacientes com fenótipo MP apresentaram as maiores concentrações plasmáticas do fármaco e reportaram RAMs mais severas como confusão e sedação (SPINA et al., 1997).

Por outro lado, pacientes com fenótipo MUR apresentam frequentemente resposta terapêutica baixa ou inexistente ao tratamento antidepressivo. Atualmente, o fenótipo MUR é conhecido como uma das causas de resistência ou ineficácia ao tratamento com antidepressivos (SAMER et al., 2013) e pacientes MUR tendem a apresentar maior persistência de distúrbios de humor quando comparados aos outros fenótipos de metabolização (WUTTKE et al., 2002).

Por esses motivos, a dose efetiva recomendada de alguns antidepressivos varia consideravelmente entre pacientes com fenótipos MP e MUR, podendo ser de 10-500 mg para nortriptilina ou amitriptilina e de 25-300 mg para clomipramina (BERTILSSON et al., 2002).

Os antiarrítmicos carvedilol, metoprolol, propranolol, timolol e bufuralol são também substratos conhecidos da enzima CYP2D6, apresentando variações farmacológicas importantes. Um estudo com pacientes em uso de metoprolol mostrou que 38% dos pacientes que relataram RAMs eram MP, frequência essa 5 vezes maior do que na população geral (WUTTKE et al., 2002). Outros estudos na literatura apontam ainda que os MP apresentam efeitos como uma redução de taxa cardíaca mais pronunciada quando em uso de timolol (LENNARD et al., 1986) e uma redução da pressão sanguínea sistólica maior após administração de carvedilol (GIESSMANN et al., 2004). Já quando em uso de propafenona, os MP podem apresentar reações adversas relacionadas ao sistema nervoso central cinco vezes mais pronunciadas do que em outros grupos de metabolização (SIDDOWAY et al., 1987).

Alguns fármacos opióides considerados pró-fármacos também sofrem influência dos polimorfismos da CYP2D6, na medida em que a alta variabilidade na atividade metabólica impacta na formação de metabólitos ativos, muitas vezes responsáveis pelo efeito terapêutico. Com isso, pode-se observar diferenças no efeito analgésico alcançado e nos desfechos clínicos relacionados à terapia (SAMER et al., 2013).

Os fármacos codeína, tramadol e oxicodona são bioativados via CYP2D6,

formando os principais metabólitos ativos: morfina (CARACO; SHELLER; WOOD, 1996), O-desmetil-tramadol (POULSEN et al., 1996) e oximorfona (SAMER et al., 2010), respectivamente. Estudos mostram que os MP podem apresentar uma redução ou ausência da formação desses metabólitos e uma consequente redução do efeito analgésico (BROUSSEAU et al., 2007; SAMER et al., 2010; STAMER et al., 2003).

Em contrapartida, pacientes com fenótipo MUR tratados com tramadol ou oximorfona, em geral, alcançam o efeito analgésico mais rápido, embora apresentem uma maior toxicidade relacionada aos receptores mu-opiídeos (KIRCHHEINER et al., 2008). O risco do uso de codeína na pediatria ou em neonatos lactentes em associação com o fenótipo MUR já foi discutido em vários estudos (KELLY et al., 2012; KOREN et al., 2006; MADADI et al., 2009; MADADI et al., 2007; STAMER; STÜBER, 2008; VORONOV; PRZYBYLO; JAGANNATHAN, 2007). Indivíduos com fenótipo MUR em uso de codeína produzem níveis elevados e, por vezes, tóxicos de morfina. Devido a isso, a administração de codeína em crianças com fenótipo MUR foi associada com alto risco de RAMs graves como parada respiratória, muitas vezes levando ao óbito (KELLY et al., 2012; STAMER; STÜBER, 2008; VORONOV; PRZYBYLO; JAGANNATHAN, 2007). Foi mostrado ainda que mulheres com fenótipo MUR em uso de codeína podem colocar neonatos lactentes em risco de óbito devido à exposição destes a níveis tóxicos de morfina durante a amamentação (KOREN et al., 2006; MADADI et al., 2009; MADADI et al., 2007).

O tamoxifeno (TAM) é um fármaco também metabolizado pela via CYP2D6 utilizado no tratamento adjuvante do câncer de mama positivo para receptores de estrogênio. O efeito da variação genotípica da via CYP2D6 na bioativação do TAM é um dos exemplos mais estudados na farmacogenética do câncer (PUNGLIA et al., 2008).

O TAM é um pró-fármaco e a biotransformação em seu principal metabólito ativo, o endoxifeno, envolve a via CYP2D6. Uma infinidade de estudos aponta uma correlação entre os diferentes fenótipos para CYP2D6 e os níveis de endoxifeno, bem como com a resposta clínica das pacientes à terapia. Pacientes com fenótipo MP apresentam menores níveis circulantes de endoxifeno quando comparadas às pacientes com fenótipo ME. Dessa forma, podem apresentar pior prognóstico, embora estejam menos propensas às RAMs da terapia (ex: fogacho) (BEVERAGE et al., 2007; DE LEON, 2007; GOETZ et al., 2005). Somado a isso, pacientes com fenótipo MP apresentam uma menor sobrevida livre de recidiva do câncer quando comparadas às MI e ME (GOETZ et al., 2005; SCHROTH et al., 2009). Por outro lado, pacientes com fenótipo MUR apresentam maior risco de

ocorrência de efeitos tóxicos relacionados à terapia com TAM.

2.2 A FENOTIPAGEM DE CYP2D6

2.2.1 Medidas e procedimentos

De forma geral, o procedimento de fenotipagem de uma enzima metabólica envolve a administração de um substrato seletivo da enzima seguida da determinação de uma medida fenotípica específica. A medida fenotípica consiste normalmente em um parâmetro farmacocinético como a depuração sistêmica de um FS, a concentração em um ponto no tempo ou razões metabólicas entre o fármaco administrado e o metabólito (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

Segundo Frank et al. (2007), do ponto de vista teórico, o padrão ouro para se medir de forma mais precisa a atividade enzimática seria a determinação da depuração parcial de um composto metabolizado em seu principal metabólito via CYP2D6. Entretanto, essa abordagem envolveria múltiplas coletas de sangue, além da determinação de recuperação urinária, o que tornaria o procedimento mais caro, demorado e, por vezes, desconfortável para os indivíduos testados. Por esse motivo, um procedimento mais simples é preferido (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

Uma das medidas mais frequentes na avaliação fenotípica é a RM de FS. Após um tempo determinado da administração do FS, amostras biológicas são coletadas e a RM é calculada normalmente pela razão entre os níveis de FS inalterado e seu metabólito, quantificados por método analítico adequado. Posteriormente, com base na literatura, as RMs obtidas são traduzidas nos diferentes perfis de metabolização (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

2.2.2 Fármacos-sonda de CYP2D6

Entende-se por FS um fármaco usado para prever o grau de atividade metabólica de uma determinada via, de forma individual, e em um momento no tempo (LOOS et al., 2011). Um FS ideal deve atender aos seguintes critérios: 1) ser predominantemente metabolizado por uma enzima metabólica específica; 2) ser seguro e apresentar baixo risco de efeitos adversos na dose recomendada para fenotipagem; e 3) não apresentar outras causas significativas que levem à variabilidade, além da que está sendo avaliada (KELLER et al., 2017). São exemplos de FS da CYP2D6 a debrisoquina, a esparteína, o metoprolol, o tramadol e o DXM (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

2.2.2.1 Debrisoquina e esparteína

O uso da debrisoquina e da esparteína como FS data do final da década de 70 (BERTILSSON et al., 1980; EICHELBAUM et al., 1986). Ao longo dos anos, esses fármacos foram amplamente utilizados e validados para a fenotipagem de CYP2D6. A debrisoquina é originalmente um fármaco anti-hipertensivo, e sua biotransformação via CYP2D6 envolve a formação do metabólito 4-hidroxi-debrisoquina (4OHD). A debrisoquina inalterada e os metabólitos formados são eliminados na urina, e dentro do período de 12 h após a administração de dose oral, 42-70% da dose é recuperada na urina em forma de debrisoquina e 4OHD (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

Normalmente, a fenotipagem com debrisoquina é feita através da administração de dose única oral de 10 mg seguida da avaliação da RM de debrisoquina/4OHD na urina em múltiplas coletas, sendo uma imediatamente após a administração e as outras por um período de 5 a 8 horas (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

Evidências de um estudo de Sloan et al. (1983) mostraram que o metabolismo de debrisoquina em MP é dose dependente em uma faixa de dose de 1-20 mg, no qual um aumento na dose leva à um aumento do valor da RM urinária, podendo influenciar na classificação fenotípica final. Já para ME, a mesma relação não foi observada para uma faixa de dose de 1-40 mg. Em ME, a excreção de debrisoquina e 4OHD é log-linear após as fases de absorção e de distribuição enquanto que para MP a excreção de 4OHD é constante entre 0 e 12 h, indicando uma saturação do processo de metabolização ou eliminação, embora se torne log-linear após o período de 12 h (SLOAN et al., 1983).

Uma das principais vantagens da medição da RM de debrisoquina na urina é a baixa ou nenhuma influência do pH urinário na medição devido ao alto pKa (=11,9) e polaridade da molécula (OZDEMIR et al., 2004). Por outro lado, uma das desvantagens é que a formação de 4OHD não é exclusivamente via CYP2D6 e envolve também a via CYP1A1. Além disso, a disponibilidade limitada de debrisoquina no mercado e incertezas quanto à segurança de seu uso (relatos de ocorrência de hipotensão) são fatores que limitam seu uso (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

A esparteína é originalmente um fármaco antiarrítmico. Quando metabolizada via CYP2D6, sofre um processo de oxidação formando um intermediário instável que logo é degradado originando o 2- e 5-desidrosparteína (DHS). Em MP, a esparteína é eliminada quase que 100% pela via urinária em sua forma inalterada (EICHELBAUM et al., 1979).

A medida normalmente adotada para a fenotipagem com esparteína é a RM do fármaco inalterado dividido pela soma dos metabólitos 2- e 5-DHS em urina. A maioria

dos estudos relata a administração de dose única de 100 mg de esparteína em sua forma de sal sulfato, embora tenha sido relatado também o uso de dose de 20 mg (STREETMAN.; BERTINO; NAFZIGER, 2000). Amostras de coleta de urina de 0- 12 horas após a administração são recomendadas, já que para ME, a excreção renal de esparteína e metabólitos é praticamente completa dentro de 12 h. Já para MP, para uma medida de RM mais precisa, o tempo de coleta deve ser estendido para 24 horas, uma vez que a esparteína e metabólitos continuam a ser excretados no período entre 12 e 24 horas após a administração (EICHELBAUM et al., 1979). Outros intervalos de coleta foram testados e os intervalos de 0-4 horas e de 0-8 horas de urina mostraram boa correlação de RM com o intervalo de coleta de 0-24 h de urina ($r= 0,92$, $p<0,001$ e $r= 0,98$, $p< 0,001$, respectivamente) (VINKS et al., 1982).

A metabolização da esparteína acontece quase que exclusivamente via CYP2D6, o que reforça seu potencial como FS para CYP2D6 (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). Além disso, uma grande vantagem deste fármaco é que, diferente da debrisoquina e DXM, a esparteína e metabólitos não são conjugados via glucuronidação antes de serem eliminados. Esse fator torna a sua utilização especialmente viável em pacientes com função renal alterada, uma vez que a eliminação de compostos glucuronidados é dependente da taxa de filtração glomerular (KÉVORKIAN et al., 1996). Apesar disso, assim como a debrisoquina, a disponibilidade da esparteína no mercado é limitada, dificultando seu uso (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

2.2.2.2 Metoprolol

O uso de metoprolol como FS já foi demonstrado em alguns estudos, mas a sua validade na fenotipagem da CYP2D6 ainda é questionável. A dose normalmente empregada para fenotipagem é de 100 mg de metoprolol (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). A via primária de metabolização do metoprolol envolve uma reação de O-desmetilação através da ação de outras enzimas desmetilases e em uma menor fração pela CYP2D6. Sendo assim, o metabólito formado é encontrado na urina de todos os indivíduos que usaram metoprolol, não apresentando nenhuma relação com o perfil de metabolização (JOHNSON; BURLEW, 1996). Foi demonstrado, no entanto, que a reação de O-desmetilação é estereoseletiva e em ME o (R)-metoprolol é preferencialmente O-desmetilado enquanto que em MP o (S)-metoprolol é o preferido para a reação. Isso sugere que indivíduos MP apresentariam menores concentrações do isômero (S) em urina que os ME (JOHNSON; BURLEW, 1996). Por esse motivo foi proposto o uso da RM de S/R

metoprolol para a fenotipagem de CYP2D6, mas embora a RM de S/R tenha sido menor em MP (n=12) que em ME (n=12) ($P < 0.001$), o método falhou em demonstrar a bimodalidade nos dois grupos (KELLER et al., 2017).

Outra rota de metabolização do metoprolol inclui a alfa-hidroxilação, responsável por cerca de 10% da sua metabolização. Esta reação é exclusivamente feita via CYP2D6, o que faz desta uma etapa potencial para fins da fenotipagem de CYP2D6 (MASIMIREMBWA et al., 1996). O uso da RM urinária de metoprolol e alfa-hidroxi-metoprolol foi largamente estudado como teste para fenotipagem de CYP2D6 e os resultados foram altamente variáveis, provando que a medição de RM em urina para metoprolol é uma estratégia questionável (STREETMAN.; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

A medição da RM de metoprolol/alfa-hidroxi-metoprolol foi estudada também em plasma. Uma boa correlação foi observada entre a RM de 3 h em plasma e as medidas de RM_{0-12h} (ASC) em plasma ($r = 0,997$, $p < 0,05$) (TAMMINGA et al., 2001) ou em urina de 0-8h ($r = 0.688$; $p < 0,001$) (SOHN et al., 1992). Apesar disso, em algumas populações caucasianas, uma relação fraca foi observada entre a RM de metoprolol e as RM de debrisoquina, esparteína ou DXM, limitando o uso do metoprolol como FS (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

Outra limitação importante do uso de metoprolol para fenotipagem inclui o risco de reações adversas como hipotensão, sintomas ortostáticos e bradicardia, quando administrado em doses de 50-100 mg (KELLER et al., 2017).

2.2.2.3 Tramadol

O uso do tramadol para fenotipagem de CYP2D6 foi pouco estudado até o momento (KELLER et al., 2017). O tramadol é metabolizado via CYP2D6 através de uma reação de O-desmetilação, formando o metabólito ativo (+) M1. Sabe-se ainda que a formação de (+) M1 envolve outras vias metabólicas, não sendo uma reação exclusiva da CYP2D6 (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). Quando metabolizado via CYP2D6, a reação mostrou ser estereoespecífica in vitro (PAAR; FRANKUS; DENGLER, 1992).

Dois diferentes estudos pesquisaram a correlação entre as medidas de RM do tramadol e de outros FS. O estudo de Abdel-Raman et al. (2002) envolvendo crianças encontrou uma modesta correlação entre a RM de tramadol/(+)M1 em plasma (AUC 0-24h) e a RM_{DXM/DTF} em urina de 12- 24h ($r = 0,43$, $p < 0,01$) (ABDEL-RAHMAN et al., 2002). O segundo estudo de Pedersen et al. (2005) investigou o uso de tramadol como FS

comparando os resultados com a RM de esparteína em urina. Foi demonstrado que a medida de RM dos isômeros dos metabólitos de tramadol ((-)/M1/(+)/M1) em urina deve ser preferida frente à RM de tramadol/(+)/M1 em urina, já que a primeira mostrou ser capaz de separar os grupos de ME e MP, assim como os resultados com esparteína. Nesse estudo, a classificação de MP feita com base na RM de (-)/M1/ (+)/M1 coincidiu em 27 dos 28 pacientes MP fenotipados com esparteína (PEDERSEN; DAMKIER; BROSEN, 2005).

Além da ausência de validação de métodos de fenotipagem com tramadol, uma das principais desvantagens do metoprolol como FS é a baixa contribuição da enzima CYP2D6 na metabolização desse fármaco (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

2.2.2.4 Dextrometorfano

O DXM é um dos FS mais utilizados para fenotipagem de CYP2D6. A disponibilidade comercial do DXM somada a sua farmacocinética favorável para o procedimento e sua segurança terapêutica frente a outros FS fazem do DXM o melhor candidato para a fenotipagem de CYP2D6 (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000). O processo de metabolização do DXM envolve a O-desmetilação via CYP2D6 formando o DTF e a N-desmetilação via CYP3A formando o 3-metoxi-morfinano, sendo a formação de DTF a etapa predominante e limitante da metabolização (YU; HAINING, 2001). O DXM e metabólitos são excretados na urina após glucuronidação e em indivíduos com a função renal normal, a eliminação é dependente da atividade da CYP2D6 (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000). A medida mais utilizada é a $RM_{DXM/DTF}$ que pode ser avaliada em plasma, urina e saliva (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). Nos estudos de fenotipagem com DXM é comum a administração de doses de 15 a 60 mg de DXM. A dose de 30 mg de DXM é a mais recomendada para o procedimento visto que é suficiente para a detecção do fármaco e metabólitos nas diferentes matrizes, além de relativamente segura (STREETMAN et al., 1999).

A $RM_{DXM/DTF}$ urinária é uma das medidas mais empregadas na avaliação da atividade de CYP2D6 usando DXM e a validade dessa medida já foi bem estabelecida em diferentes estudos (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000). A $RM_{DXM/DTF}$ urinária mostrou uma correlação significativa com a depuração parcial de DXM à DTF além de uma boa correlação com dados de fenotipagem de CYP2D6 com outros FS como a debrisoquina (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

A maioria dos estudos mede a $RM_{DXM/DTF}$ na urina em um intervalo de coleta de 0 a 8 horas (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). No estudo de Hu et al. (1998), os autores

mostraram que a $RM_{DXM/DTF}$ em urina coletada nos intervalos de tempo de 0-4, 0-6, 0-8, 0-12 e 0-24 h também podem ser utilizada já que apresentaram boa correlação com a área sob a curva ($ASC_{0-\infty}$) (todos com $r \geq 0,84$ e $p\text{-value} < 0.0006$) (HU et al., 1998).

Em MP, há um atraso na excreção urinária de DTF e de 3-metoxi-morfineno, sendo necessário um período de até 8 dias para se estimar o verdadeiro valor de RM do indivíduo. Esse fato levou alguns autores a aumentar o tempo de coleta de urina em MP, embora isso torne o procedimento pouco conveniente para o indivíduo testado (JONES et al., 1996). Cabe ressaltar ainda que a $RM_{DXM/DTF}$ na urina pode sofrer variações significativas devido ao pH, sendo altamente recomendável uma correção do valor em função do pH (OZDEMIR et al., 2004).

A medida de $RM_{DXM/DTF}$ em plasma ou soro também é utilizada frequentemente para a fenotipagem de CYP2D6. Normalmente, coletas pontuais são preferidas frente à múltiplas coletas devido principalmente a maior conveniência para o indivíduo testado (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

Hu et al. (1998) mostraram que amostras de plasma nos tempos de coleta de 2 ($r=0,96$, $p < 0,01$), 3 ($r=0,87$, $p < 0,01$), 4 ($r=0,81$, $p < 0,01$), 5 ($r=0,94$, $p < 0,01$) ou 8 ($r=0,95$, $p < 0,01$) horas tem boa correlação com a $ASC_{0-\infty}$ enquanto a amostra de 6h não ($r=0,79$, $p=0,011$). Logo, com exceção do ponto de 6h em plasma, os pontos citados são boas alternativas para fenotipagem de CYP2D6 com DXM (HU et al., 1998). Outro estudo mostrou que a $RM_{DXM/DTF}$ da $ASC_{0-\infty}$ de DXM ($r=0,84$, $p=0,005$) ou amostras de soro sanguíneo nos tempos de 3 ($r=0,60$, $p=0,003$), 4 ($r=0,72$, $p < 0,001$), 6 ($r=0,67$, $p < 0,001$) e 8 horas ($r=0,74$, $p < 0,001$) tem boa correlação com a depuração de DXM (BORGES et al., 2006).

O tempo de coleta preferido em estudos mais recentes é de 3 horas após a administração de DXM (ANTUNES et al., 2012; CHEN; ZHENG; HU, 2017; GOGTAY et al., 2014). Os estudos de Tamminga et al. (2001) e Jurica et al. (2012) mostraram que a $RM_{DXM/DTF}$ em amostras de 3h de plasma após administração de dose única de DXM tem uma alta correlação com a ASC_{0-12h} de DXM ($r=0,999$, $p=0,000$) e com a $RM_{DXM/DTF}$ 0-8 h em urina ($r=0,87$, $p=$ não especificado) respectivamente, provando ser um tempo de coleta adequado para a fenotipagem (JURICA et al., 2012; TAMMINGA et al., 2001). Por fim, o uso de medidas de $RM_{DXM/DTF}$ em plasma ou soro permite a distinção entre ME e MP, mas não se mostrou capaz de distinguir entre os grupos de MI e ME (JURICA et al., 2012; YEH et al., 2003).

A validade do uso de saliva para a medição da $RM_{DXM/DTF}$ também já foi

demonstrada em alguns estudos (HOU et al., 1996; HOU et al., 1991; HU et al., 1998; LUTZ et al., 2004). O uso da saliva para a fenotipagem é particularmente interessante, pois sua obtenção é fácil, pouco invasiva e exige uma única coleta (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016).

Hou et al (1991) foi o primeiro a investigar o uso de saliva para fenotipagem com DXM. Seu estudo mostrou uma correlação entre a $RM_{DXM/DTF}$ em saliva de 3 h e a $RM_{DXM/DTF}$ 0-8h de urina ($r= 0,92$, $p< 0,001$) (HOU et al., 1991). Já no estudo de Hu et al. (1998) foi mostrado que a coleta de amostras de saliva nos tempos de 2h ou 6h são melhores para a medição da $RM_{DXM/DTF}$, pois mostraram uma boa correlação com a $ASC_{0-\infty}$ de DXM ($r= 0,81$ e $0,82$, respectivamente) e boa repetibilidade enquanto amostras de 3, 4 ou 5h de saliva não foram apropriadas (HU et al., 1998).

Dois estudos classificaram fenotipicamente pacientes utilizando medidas de $RM_{DXM/DTF}$ em amostras de saliva (HOU et al., 1996; LUTZ et al., 2004). O primeiro, também de Hou et al. (1996), envolveu pacientes com insuficiência renal em hemodiálise ($n=104$). Foi administrada a dose oral de 30 mg de DXM e amostras de saliva foram coletas 3 horas após a dose. Nesse estudo, de acordo com as $RM_{DXM/DTF}$ obtidas não foi possível identificar nenhum MP, provavelmente devido à baixa frequência de MP na população chinesa (0-3%) (HOU et al., 1996).

No estudo de Lutz et al. (2004) foi administrada dose de 30 mg de DXM em estudantes voluntários ($n= 170$) e a coleta de saliva foi feita 2 horas após a administração. Como resultado, foi observada uma distribuição bimodal de frequência de RM com a separação entre os grupos de MP ($n=14$) e ME ($n= 156$), com antimoda no valor de $RM = 27$ (figura 3) (LUTZ et al., 2004).

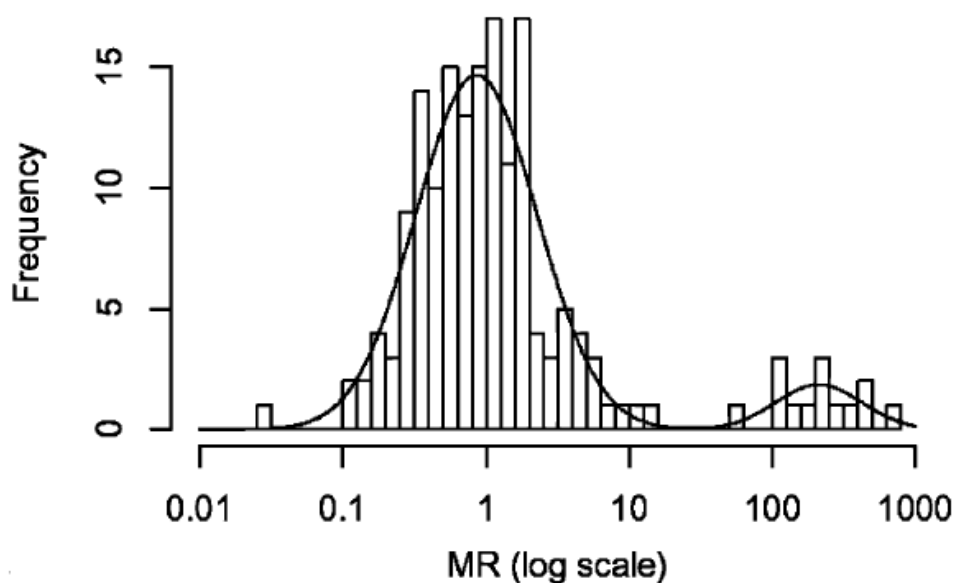


Figura 3: Distribuição de frequências da $RM_{DXM/DTF}$ em saliva do estudo de Lutz et al., 2004.

2.3 DEXTROMETORFANO

2.3.1 Propriedades físico-químicas

O DXM (d-3-metoxi-N-metilmorfinano) (figura 4) é um análogo metilado dextrorrotatório de levorfanol. Em sua forma de base livre apresenta-se como um pó inodoro e cristalino de cor branca à levemente amarelado. Normalmente está disponível comercialmente como um sal hidrobromado (PUBCHEM, 2017). Um resumo das propriedades físico-químicas do DXM e de seu metabólito DTF foi descrito no quadro 3.

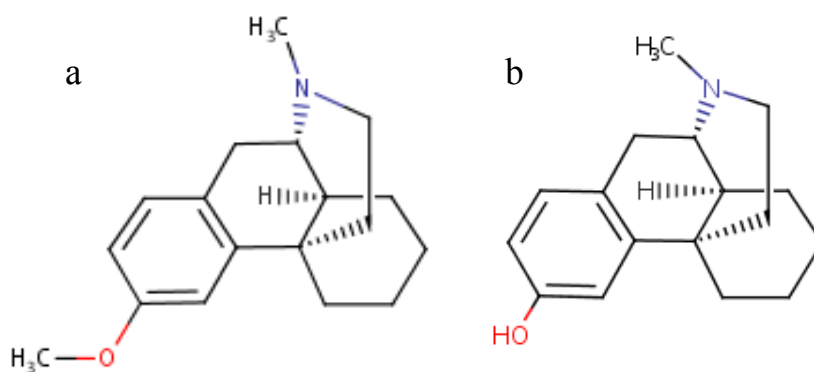


Figura 4: Moléculas de DXM (a) e DTF (b)
Fonte: TOXNET, 2017.

2.3.2 Usos gerais

Há aproximadamente cinco décadas o DXM vem sendo utilizado mundialmente. O DXM é um fármaco presente em uma infinidade de formulações de venda livre para o tratamento de tosse e resfriados, sozinho ou em combinação a outros fármacos como analgésicos, anti-histamínicos, descongestionantes e/ou expectorantes (TAYLOR et al., 2016).

Além do tratamento da tosse seca irritativa, sua principal indicação terapêutica, o uso de DXM em outros contextos terapêuticos tem sido reportado. O DXM é o FS de CYP2D6 preferido, sendo utilizado amplamente em procedimentos de fenotipagem (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007) como já discutido anteriormente (tópico 2.2.2.4). Além disso, nos últimos 20 anos, diversos estudos vêm apontando sua utilidade no tratamento de algumas condições do sistema nervoso central como depressão, convulsões e dor, devido à um potencial efeito anticonvulsivante e neuroprotetor (NGUYEN et al., 2016). O uso de DXM em combinação com a quinidina foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 2010, e pela European Medicines Agency (EMA) em 2013, para o tratamento da síndrome pseudobulbar (NGUYEN et al., 2016).

Adicionalmente, o uso ilícito e recreativo de DXM tem sido reportado mundialmente, principalmente entre adolescentes, já que em altas doses o DXM causa efeitos como euforia e alucinações visuais e auditivas (MULLER et al., 2014; ROMANELLI; SMITH, 2009).

Quadro 3 - Propriedades físico-químicas do DXM

Propriedades	DXM	DTF
Fórmula molecular	$C_{18}H_{25}NO$	$C_{17}H_{23}NO$
Peso molecular	271,404 g/mol	257,375 g/mol
Solubilidade em água	74,7 mg/L	170 mg/L
Solubilidade em clorofórmio	8.51 mg/L	-
Ponto de fusão	109-111 °C	-
PKa	9.85	9,66 – 10,46
LogP octanol/água	3,97	3,11

Fontes: HMDB, 2017; PUBCHEM, 2017.

2.3.3 Farmacodinâmica e farmacocinética

Embora estruturalmente similar a agonistas opióides como morfina e heroína, o DXM não age nos receptores opióides. Seu mecanismo de ação para o tratamento da tosse, bem como para condições do SNC, se deve a sua ação antagonista não competitiva em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), além de sua ação agonista em receptores sigma-1. O DXM pode ainda antagonizar receptores nicotínicos e inibir transportadores de serotonina (NGUYEN et al., 2016). Por esse motivo, o DXM não causa efeitos comuns de agonistas opióides como analgesia e depressão respiratória, nem dependência quando administrado em doses terapêuticas. Quando usado como antitussígeno, as doses recomendadas de DXM para adultos ou crianças (>12 anos) variam de 60 a 120 mg/dia em doses fracionadas (NGUYEN et al., 2016).

O DXM é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, e sofre um efeito de primeira passagem, com concentração plasmática máxima ocorrendo dentro de 2,5 horas e a duração do efeito variando de 3 à 6 horas. Após a administração de doses de 50 mg de DXM, o volume de distribuição no estado de equilíbrio assume valores em torno de 7,3 L \pm 4,8 L (média \pm DP) (BOEHRINGER INGELHEIM, BISOLTUSSIN®; 2014).

O DXM é metabolizado pelo complexo enzimático citocromo P-450 (CYP). O principal metabólito ativo formado é o DTF via CYP2D6 através de O-desmetilação. O DXM é também metabolizado via CYP3A4 através de N-desmetilação formando o 3-metoxi-morfinano (3-MM), um metabólito relativamente inativo (YU; HAINING, 2001). Subsequentemente, o DTF e o 3-MM podem ser biotransformados à 3-hidroxi-morfinano (3-HM), um metabólito secundário inativo, através de desmetilação via CYP3A4 e CYP2D6, respectivamente (YU; HAINING, 2001). Entretanto, apenas uma pequena fração livre de DTF está normalmente disponível para metabolização, uma vez que esse metabólito sofre rapidamente uma reação de glucuronidação e é eliminado pela urina (POPE et al., 2004). Um esquema mostrando a via metabólica do DXM e metabólitos é mostrado na figura 5.

O processo de excreção do DXM é predominantemente via renal e a proporção pode variar de 20 a 80% da dose administrada. Os metabólitos livres ou conjugados e uma pequena porção do DXM inalterado podem ser recuperados na urina e menos de 0,1% é encontrado nas fezes. Já o tempo de meia-vida médio de eliminação ($t_{1/2}$) varia de 3,2 a 4 horas (BOEHRINGER INGELHEIM, BISOLTUSSIN®; 2014).

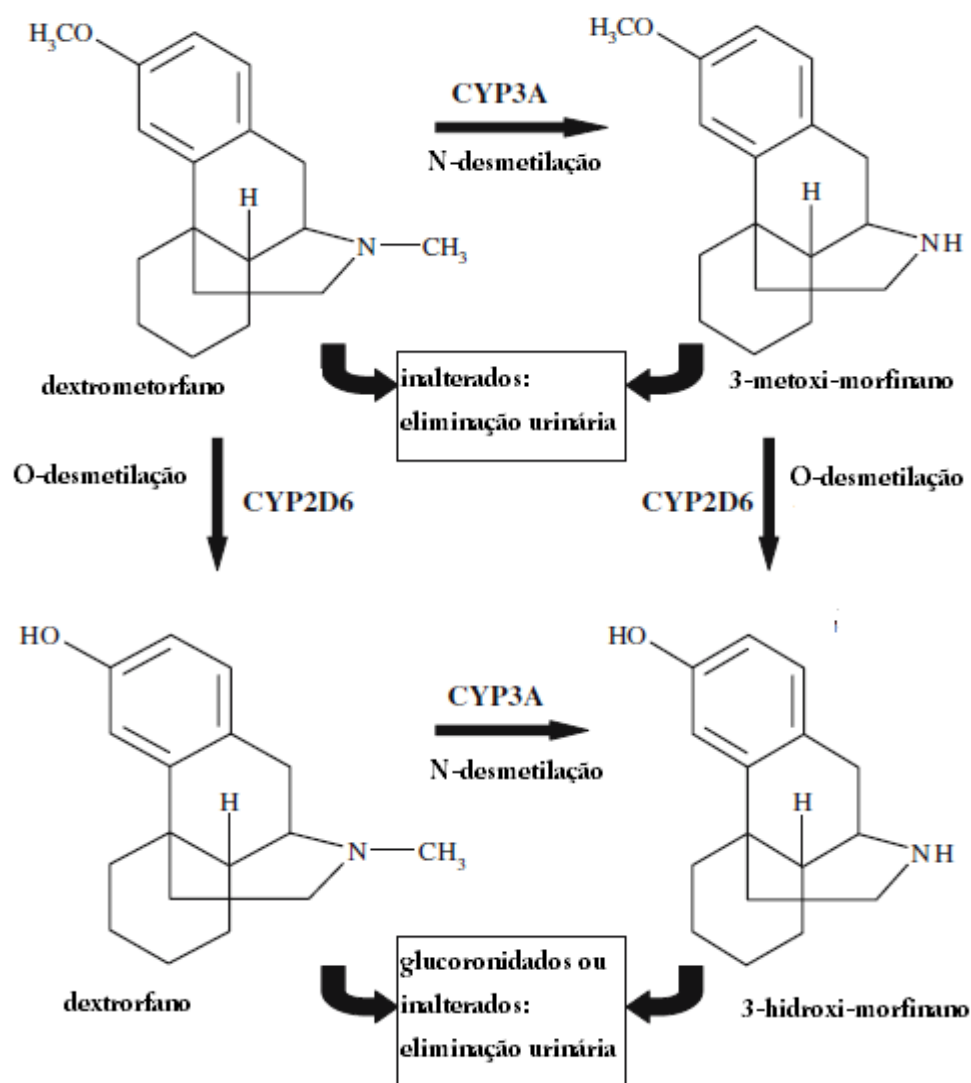


Figura 5: Metabolização do dextrometorfano pelo sistema citocromo P-450;
 Fonte: adaptado do trabalho de FRANK et al., 2007.

O DTF mostrou ter um perfil farmacológico bastante similar ao DXM, apresentando também efeitos antitussígeno, anticonvulsivante e neuroprotetor em vários estudos (NHUYEN et al, 2016). A disposição cinética de DXM e DTF varia de acordo com a atividade metabólica da via CYP2D6. Por esse motivo, torna-se justificável que a avaliação do perfil farmacocinético seja feita de forma estratificada (CAPON et al., 1996).

Quando administrada uma dose oral única de 30 mg de DXM, os valores de concentração máxima ($C_{máx}$), $t_{1/2}$ e $ASC_{0-\infty}$ para DXM são maiores em MP (n=6) do que em ME (n=6) (quadro 4) (CAPON et al., 1996).

A biodisponibilidade oral do DXM foi de 1-2% em ME e em torno de 80% em MP e a depuração aparente parcial de DXM à DX foi de 1,2 L/h e 970 L/h para MP e ME, respectivamente (CAPON et al, 1996).

O DXM e DTF são excretados também na saliva. Quando administrada dose única de 30 mg, estão presentes em concentrações variando de 0,3 a 229 ng/ml e 0,078 a 39 ng/ml, respectivamente, após 2 h de administração (LUTZ et al, 2004).

Quadro 4: Parâmetros farmacocinéticos de DXM e DTF

Parâmetros farmacocinéticos				
Composto	Perfil metabólico	C _{máx} (mg/L)	t _{1/2} (h)	ASC _{0-∞} (mg/L x h)
DXM	ME	1,4	2,4	9
	MP	26	19,1	1362
DTF	ME	396	1,4	1701
	MP	9,1	10	198

Legenda: ASC_{0-∞}: área sob a curva; C_{máx}: concentração máxima; DXM: dextrometorfano; DTF: dextroorfano; ME: metabolizador extensivo; MP: metabolizador pobre; t_{1/2}: tempo de meia vida.
Fonte: Capon et al, 1996.

2.3.4 Toxicidade

A segurança do uso de DXM é dose-dependente (STREETMAN, 1999). Quando administrado na dose recomendada (60 – 120 mg por dia) para o tratamento da tosse, o DXM é seguro, com baixa ocorrência de efeitos adversos. As RAMs mais comuns ($\geq 1/100$ e $< 1/10$) incluem tontura, náusea, vômitos, distúrbios gastrintestinais e fadiga. Já as RAMs consideradas mais raras ($< 1/10.000$) incluem sonolência e alucinações (BOEHRINGER INGELHEIM ,BISOLTUSSIN®; 2014).

Quando utilizado como FS para fenotipagem de CYP2D6 em dose única ≤ 30 mg, o DXM se mostrou seguro, com pouca ou nenhuma ocorrência de RAMs. Por outro lado, para a administração de dose única de 50 mg, algumas RAMs foram reportadas como tonteira, sonolência ou inchaço abdominal (HOU et al, 1991).

Quando altas doses são administradas (> 7 mg/kg), uma série de efeitos psicotrópicos pode ser observada, primariamente devido ao acúmulo do metabólito ativo DTF (ROMANELLI; SMITH, 2009). Os sintomas observados decorrentes do uso ilícito de

DXM são descritos pelos usuários em estágios em função da dose, variando de sintomas como inquietação, euforia e sensibilidades visual e auditiva (doses de 1,5–2,5 mg/kg) a efeitos mais pronunciados como alucinações, delírios e ataxia (>15 mg/kg). Em intoxicações mais severas, as RAMs reportadas incluem nistagmo, midríase, depressão respiratória, taquicardia e hipertensão (ROMANELLI; SMITH, 2009).

2.4 DETERMINAÇÃO DE DEXTROMETORFANO E DEXTRORFANO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Diversas metodologias bionalíticas quantitativas ou qualitativas já foram descritas para a determinação de DXM e DTF em diferentes matrizes biológicas.

Para a quantificação de DXM e DTF em plasma, urina ou saliva, as técnicas de cromatografia são as mais utilizadas. Métodos desenvolvidos por diferentes grupos incluem a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de fluorescência (HPLC-FLU) (AFSHAR; ROUINI; AMINI, 2004; ANTUNES et al., 2014; HOU et al., 1991; HU et al., 1998), ultravioleta (HPLC-UV) (EBESHI; OBODOZIE; BOLAJI, 2014; HOU et al., 1991) ou à espectrometria de massas (AMARATUNGA et al., 2016; DONATO et al., 2012; LOOS et al., 2011; LUTZ et al., 2004). Métodos em cromatografia gasosa também já foram descritos (RODRIGUES et al., 2008).

Para métodos em cromatografia líquida, a técnica de escolha para o preparo de amostras varia, sendo comumente utilizada a extração líquido-líquido. Outras técnicas como a precipitação de proteínas e a extração em fase sólida também foram relatadas. Normalmente, são utilizadas colunas cromatográficas de fase reversa do tipo C₁₈ ou C₈ com dimensões e tamanhos de partícula variáveis e fases móveis compostas por tampão fosfato de potássio ou acetato de amônio e acetonitrila, eluídos de forma isocrática ou em gradiente. O quadro 5 compara as características de alguns métodos descritos em cromatografia líquida para determinação quantitativa de DTF e DXM.

Para a análise qualitativa, alguns métodos de ensaios imuno-enzimáticos (ELISA) já foram documentados os quais detectam a presença de DXM em amostras biológicas para fins toxicológicos. No entanto, esses métodos são pouco seletivos e não fornecem resultados quantitativos (AMARATUNGA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2008).

Quadro 5- continua: Metodologias em cromatografia líquida para determinação simultânea de DXM e DTF

Autor, ano	analitos	matriz	preparo da amostra	volume de amostra	coluna	fase móvel	fluxo (ml/min)	tempo de corrida (min)	técnica
Loos et al., 2011	DXM, DTF, 3-metoxi-morfinano e 3-hidroxi-morfinano	plasma	Extração líquido-líquido	200 µl	Acquity UPLC® BEH C ₁₈ (100 × 2.1 mm; 1.7µm)	Fase A: H ₂ O+ 0,1% AF; Fase B: ACN + 0,1% AF;	0,25	7	CL-EM/EM
Afshar et al., 2014	DXM, DTF e 3-hidroxi-morfinano	plasma	Precipitação usando sulfato de zinco e MeOH	100 µl	C ₁₈ Tracer Excel 15 cm × 0.4 cm	Fase A: tampão fosfato de potássio 0,01M (pH = 3,0): MeOH: tetrahydrofurano (68,5: 31 :0,5); fase B: MeOH: tetrahydrofurano (93,25:6,75).	0,7	33	HPLC-FL
Antunes et al., 2014	DXM e DTF	plasma	Extração líquido-líquido	500 µl	Hypersil Gold C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 3 µm)	Tampão fosfato 0,1M (pH=6): ACN (76:24)+0,1% trietilamina	1	12	HPLC-FL
Donato et al., 2012	DXM, DTF e doxilamina	plasma	Extração líquido-líquido	500 µl	Phenomenex Gemini ® C ₁₈ (150 x 4.6mm; 5µm)	ACN:H ₂ O:AF (90:9:1 v/v/v)	1,5	4	CL-EM/EM

Quadro 5: Metodologias em cromatografia líquida para determinação simultânea de DXM e DTF

Autor, ano	analitos	matriz	preparo da amostra	volume de amostra	coluna	Fase móvel	fluxo (ml/min)	tempo de corrida (min)	técnica
Hu et al, 1998	DXM e DTF	plasma	Extração líquido-líquido	1ml	Coluna Zorbax fenil (dimensões não especificadas)	Tampão fosfato de potássio 10mM: ACN (1:1) pH=4 (ajuste com ácido fosfórico 8,5%)	1	13	HPLC-FL
		urina		5ml					
Ebeshe et al, 2013	DXM e DTF	saliva	Extração líquido-líquido	3ml	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5µm)	Tampão acetato de amônio pH 2,8: MeOH: ACN (80:10:10; v:v:v)	1	11	HPLC-DAD
		urina		1ml					
Hou et al, 1991	DXM e DTF	urina	Extração em fase sólida	10ml	Zorbax phenyl C ₁₈ (150 x 4,6 mm)	Tampão fosfato de potássio 10 mM (pH=4):ACN (45:55; v:v)	1,5	não consta	HPLC-UV
		saliva		3ml					HPLC-FL
Lutz et al, 2004	DXM, DTF, 3-metoxi-morfinano, 3-hidroxi-morfinae e dois metabólitos glucuronidados.	urina	Adição de MeOH seguido de centrifugação.	250 µl	Hypersil 3 C ₈ -BD (100 × 2 mm)	Fase A: H ₂ O + 0,1% AF; Fase B: ACN+0,1% AF; Eluição em gradiente	0,24	8	CL-EM/EM
		saliva							
Amaratunga et al, 2016	DXM e DTF	saliva	Extração em fase sólida	400 µl	Zorbax SB-C ₈ RRHD (100 × 2.1 mm, 1.8 mm)	Fase A: H ₂ O + 0,1% AF:ACN (95:5; v:v); Fase B: ACN + 0,1% AF.	0,4	4	UPLC-MS/MS

Legenda: MeOH= metanol; AF: ácido fórmico; ACN: acetonitrila; HPLC= cromatografia líquida de alta eficiência; UPLC= cromatografia de ultra performance; FL= detector de fluorescência; DAD: detector de arranjo de diodos; EM/EM: detector de espectrometria de massas triplo quadrupolo.
Fonte: A autora, 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Desenvolver e validar um método bioanalítico em CL-EM/EM para determinação de DXM e DTF em saliva humana;

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Determinar os níveis de DXM e DTF em amostras de saliva de pacientes com câncer de mama em tratamento com tamoxifeno.
- Classificar fenotipicamente para CYP2D6 as pacientes envolvidas no estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

(A) Equipamentos

- Balança analítica AG 200 – Genaka (São Paulo, SP, Brasil);
- Homogeneizador de amostras do tipo vórtex CERTOMAT® MV - B. Braun Biotech International (Melsungen, Alemanha);
- Centrífuga SORVALL ST16R- Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA)
- Cromatógrafo líquido série 1200 composto por bomba quaternária e autoinjeter (G1367B) - Agilent Technologies® (Santa Clara, EUA);
- Espectrômetro de massas triplo-quadrupolo API 3200 - Applied Technologies® (Cleveland, Ohio, EUA);
- Estação de coleta e registro de dados dos cromatogramas com software Analyst®.

(B) Solventes e matriz biológica

- Acetonitrila grau HPLC - Tédia® e VWR®.
- Ácido fórmico 96% - Tédia®.
- Água ultrapura obtida através de sistema de purificação Elga US filter (Garden Grove, California, EUA).
- Metanol grau HPLC - Tédia®.
- Sal formiato de amônio grau analítico - Tédia®.
- Volumes de saliva humana isenta dos analitos obtidas de voluntários.

(C) Padrões analíticos

- Bromidrato de d-3-metoxi-N-metilmorfeno (dextrometorfano) - Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA);
- Tartarato de dextrorfano - Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA);
- Levalorfano - Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA);

(D) Colunas cromatográficas

- Ascentis Express C₁₈ 4,6 mm x 150mm x 2,6µm - Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA);
- Eclipse Zorbax fenil 4,6 mm x 150 mm x 5 µm – Agilent Technologies (Santa Clara, EUA).

4.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

O desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica foi realizada segundo o disposto na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4.2.1 Preparo das soluções-padrão, padrões de calibração e controles de qualidade.

O preparo das soluções-padrão de DXM, DTF e levalorfano (LVF) (1mg/ml) foi feito a partir da pesagem analítica de 10 mg de cada substância padrão e transferência para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, os balões foram avolumados com metanol (MeOH) resultando na concentração final de 1 mg/ml.

A partir dessa solução-estoque, foram feitas diluições de forma a se obter soluções de trabalho (STBs), necessárias para o preparo de calibradores de controles de qualidade. As STBs foram preparadas em balão de 10 mL com MeOH:água (1:1) nas concentrações de 0,1 à 10,0 µg/ml para DXM e DTF e de 0,25 µg/ml para o LVF.

Os padrões de calibração em saliva foram preparados através da adição de volumes adequados das STBs de DXM e DTF em um balão volumétrico de 5 ml para cada nível de concentração. Os balões foram posteriormente avolumados com o volume necessário (qsp) de mistura de saliva branca, conforme tabelas 1 (A) e 1 (B), a fim de se obter sete níveis de concentração, sendo eles: 5, 15, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/ml para o DXM e 1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/ml para o DTF.

Os controles de qualidade foram preparados de forma semelhante aos padrões de calibração, porém utilizando-se balões volumétricos de 10 ml ou 25 ml e em 5 níveis de concentração, sendo eles: limite inferior de quantificação (LIQ) (DXM 5 ng/ml e DTF 1ng/ml), controle de qualidade baixo (CQB) (DXM 10ng/ml e DTF 2ng/ml), controle de qualidade médio (CQM) (DXM 450 ng/ml e DTF 45 ng/ml), controle de qualidade alto (CQA) (DXM 800 ng/ml e DTF 80 ng/ml) e controle de qualidade de diluição (CQD) (DXM 3000 ng/ml e DTF 300 ng/ml). As amostras de CQD continham concentrações 3 vezes maiores que o maior padrão de calibração (C7) e foram analisadas após uma diluição de quatro vezes em saliva branca.

Tabela 1 (A) - Preparo de calibradores e CQs em saliva- valores para o DXM

	DXM	Concentração do calibrador (ng/ml)	Concentração da STB (ng/ml)	Volume de STB (μ l)	Volume de saliva qsp (μ l)
Calibradores	C1	5	100	250	5000
	C2	15	100	750	5000
	C3	50	5000	50	5000
	C4	100	5000	100	5000
	C5	250	5000	250	5000
	C6	500	10000	250	5000
	C7	1000	10000	500	5000
Controles	LIQ	5	100	500	10000
	CQB	10	5000	50	25000
	CQM	450	10000	450	10000
	CQA	800	50000	400	25000
	CQD	3000	50000	600	10000

Tabela 1 (B) - Preparo de calibradores e CQs em saliva - Valores para o DTF

	DTF	Concentração do calibrador (ng/mL)	Concentração da STB (ng/mL)	Volume de STB (μ L)	Volume de saliva qsp (μ L)
Calibradores	C1	1	100	50	5000
	C2	5	100	250	5000
	C3	10	500	100	5000
	C4	25	500	250	5000
	C5	50	500	500	5000
	C6	75	500	750	5000
	C7	100	1000	500	5000
Controles	LIQ	1	100	100	10000
	CQB	2	1000	50	25000
	CQM	45	1000	450	10000
	CQA	80	10000	200	25000
	CQD	300	10000	300	10000

Legenda: C1-C7: calibradores 1-7; LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto; CQD: controle de qualidade de diluição; qsp: quantidade suficiente para; STB: solução de trabalho. Fonte: A autora, 2017.

4.2.2 Escolha do método de processamento da amostra biológica

Para o processamento das amostras biológicas, foi testado o método de precipitação de proteínas com dois diferentes solventes: o MeOH e a acetonitrila (ACN). Diferentes tempos e velocidades de centrifugação também foram testados. A escolha do método a ser empregado foi feita com base nos seguintes parâmetros: capacidade de eliminar interferentes, perfil dos picos cromatográficos obtidos e condições de detecção e quantificação dos dois analitos.

O procedimento de precipitação de proteínas foi feito na proporção 1:2,5 (matriz:solvente, v:v) para ambos os solventes, assim como descrito: em microtubos tipo *eppendorf* foram adicionados uma alíquota de 200 µl de amostra de saliva e 50 µl de solução de padrão interno (PI) (250 ng/ml), e o conteúdo foi homogeneizado no vórtex por 5 segundos. Na sequência, foi feita a precipitação de proteínas através da adição de 500 µl de MeOH ou ACN, seguida de homogeneização no vórtex por mais 5 segundos. A amostra foi submetida à centrifugação (por 20 minutos à 20000 x g, 4°C ou por 15 minutos à 10000 x g, 4° C) e uma alíquota de 200 µl de sobrenadante foi transferida para um microtubo de vidro para análise. Foram injetados volumes de 20 µl no cromatógrafo para análise.

4.2.3 Parâmetros do espectrômetro de massas

Foi utilizado como detector um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo API 3200 (SCIEX, Toronto, Canadá), com fonte de ionização por *electrospray* e modo de ionização positivo. Utilizou-se o método de monitoração de reações múltiplas (MRM), e os resultados foram registrados e analisados através do software Analyst® 1.5.1 software (AB Sciex). Para se determinar os melhores parâmetros de operação, foi feita a infusão direta de soluções de DTF, DXM e LVF à 500 ng/ml em H₂O:MeOH:ácido fórmico (1:1:0,01, v:v:v). Na sequência, foram feitas otimizações automáticas para cada um dos compostos de forma a se estabelecer parâmetros da fonte de ionização como voltagem de ionização do spray, temperatura da fonte, e fluxo de gás. O gás da fonte de ionização e de colisão utilizado foi o nitrogênio de alta pureza, obtido através de um gerador de nitrogênio. As transições de massas, potencial de desaglomeração, energia de colisão e potencial de saída da célula de colisão também foram determinados para cada um dos compostos.

4.2.4 Parâmetros cromatográficos

Foram testados diversos sistemas cromatográficos a fim de se definir as melhores condições para o método. A escolha dos sistemas cromatográficos testados foi pautada na

disponibilidade de materiais no laboratório, bem como em metodologias previamente descritas para a determinação simultânea de DXM e DTF (quadro5). A tabela 2 traz um resumo das principais condições cromatográficas testadas na etapa de desenvolvimento. Foram testadas duas colunas cromatográficas diferentes (Ascentis express C₁₈ 4,6 x 150 mm x 2,7 µm e Eclipse Zorbax fenil 4,6 x 150 mm x 5 µm) e fluxos variando de 0,5 à 1 ml/min. As eluições foram investigadas nos modos isocrático e em gradiente. Para compor a fase A foi testada água Tipo I ou tampão formiato de amônio 10 mM, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Para a fase B, foram feitos testes com os solventes orgânicos ACN ou MeOH puros ou acidificados com 0,1% de ácido fórmico.

Para minimizar um possível efeito residual, a agulha do autoinjeter foi lavada por 40 segundos com uma solução de lavagem composta por MeOH:água:isopropanol (40:30:30; v:v:v) acrescida de trietilamina à 0,1% antes de cada injeção.

Tabela 2- Sistemas cromatográficos testados

Colunas	Condições cromatográficas testadas			Fluxo (ml/min)
	Fase A	Fase B	Eluição	
C ₁₈ (4,6 x 150 mm x 2,7µm)	Água ou tampão formiato de amônio 10mM acidificados com 0,1% AF	ACN + 0,1% AF	> 10 gradientes testados; 0-5 min= maiores proporções de fase A; 5-8 min = maiores proporções de fase B.	0,5
Coluna fenil (4,6 x 150 mm x 5µm)	Tampão formiato de amônio acidificado	MeOH ou ACN, puros ou acidificados	Isocrática; proporções de fase A: fase B (50:50), (60:40), (65:35) e (70:30).	0,8 ou 1

Legenda: ACN- acetonitrila; AF- ácido fórmico; MeOH- metanol.

Fonte: A autora, 2017.

4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA

A validação da metodologia bioanalítica foi realizada segundo a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012). Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, efeito residual, efeito matriz, limite de quantificação, limite de detecção e

estabilidades em matriz biológica (curta duração, ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento) e em solução.

Seletividade

A seletividade foi avaliada através da análise de amostras de branco de saliva de oito diferentes voluntários, sendo seis normais e duas coletadas após o consumo de café. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas amostras de LIQ. A avaliação deste parâmetro tem como objetivo investigar a presença de picos nos tempos de retenção dos analitos ou PI que possam interferir na quantificação. Segundo a legislação brasileira, as respostas de picos interferentes próximas ao tempo de retenção dos analitos e do PI devem ser inferiores à 20% das respostas dos analitos no LIQ e à 5% da resposta do PI.

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da injeção de três réplicas de cada calibrador, em sete níveis de concentração, sendo eles:

Calibrador 1: 5 ng/ml de DXM e 1 ng/ml de DTF.

Calibrador 2: 15 ng/ml de DXM e 5 ng/ml de DTF.

Calibrador 3: 50 ng/ml de DXM e 10 ng/ml de DTF.

Calibrador 4: 100 ng/ml de DXM e 25 ng/ml de DTF.

Calibrador 5: 250 ng/ml de DXM e 50 ng/ml de DTF.

Calibrador 6: 500 ng/ml de DXM e 75 ng/ml de DTF.

Calibrador 7: 1000 ng/ml de DXM e 100 ng/ml de DTF.

As curvas de calibração foram construídas calculando-se as razões entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do PI para cada uma das amostras e plotando-se esses valores com as respectivas concentrações nominais. As curvas foram ajustadas por regressão linear de mínimos quadrados com fator de ponderação de $1/x^2$.

Os padrões de calibração são considerados aceitos quando houver desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o C1 e desvio menor ou igual a 15% à concentração nominal para os outros padrões de calibração. As curvas devem ainda apresentar o $r^2 > 0,99$.

Precisão e exatidão

Foram avaliadas a precisão e exatidão em uma única corrida analítica (intra-corrída) e em 3 corridas diferentes (inter-corrídas). Para a precisão e exatidão intra-corrída, foram analisadas amostras de CQs nos 5 níveis de concentração em cinco réplicas. Já para a precisão e exatidão inter-corrídas, o mesmo procedimento foi feito em 3 dias consecutivos. Os valores experimentais médios das cinco réplicas por concentração foram utilizados para determinar a precisão e a exatidão em cada uma das concentrações analisadas. Os resultados foram expressos em coeficiente de variação (%CV) para a precisão e em erro padrão relativo (EPR%) para a exatidão conforme equações 1 e 2, respectivamente.

$$\text{Equação 1: Precisão} = \frac{DP}{CM} \times 100,$$

onde DP é o desvio padrão e CM é a concentração média experimental.

$$\text{Equação 2: EPR} = \frac{(CME - VN)}{VN} \times 100,$$

onde EPR é o erro padrão relativo, CME é a concentração média experimental, e VN é o valor nominal.

A precisão e exatidão intercorrídas foi calculada com base na média de todos os valores experimentais nos três dias de análise para cada uma das concentrações.

Os critérios de aceitação para a precisão e a exatidão são: a) para amostras de LIQ, o CV% ou EPR% devem ser $\leq 20\%$; b) para os outros CQs, os valores de %CV ou EPR% devem ser $\leq 15\%$.

Efeito matriz

Para avaliação do efeito matriz foram analisadas seis amostras de saliva branca fornecidas por seis voluntários. As amostras de saliva branca foram primeiramente processadas e posteriormente dopadas com DTF, DXM e PI com quantidades de STBs correspondentes, a fim de que alcançassem as concentrações de CQB e CQA. Foram analisadas 2 amostras por voluntário, sendo uma CQB e uma CQA, além de 6 amostras dos analitos em solução em cada nível de concentrações. As áreas dos picos de DXM e DTF foram comparadas com as áreas dos mesmos em solução nas mesmas concentrações através do cálculo do fator de matriz normalizado pelo PI (FMN) (equação 3). Os resultados do efeito matriz foram expressos em CV%. Segundo a legislação, os valores de

CV% devem ser $\leq 15\%$ para ambos os níveis testados.

$$\text{Equação 3: FMN} = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}}$$

Efeito residual (Carry-over)

É o efeito causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Para avaliar o efeito residual, foram feitas três injeções da mesma amostra de branco, sendo uma antes e duas após a injeção de uma amostra de C7. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos ou PI deve ser inferior à 20% da resposta dos analitos em amostras LIQ e inferior à 5% para a resposta do PI.

Limite inferior de quantificação e limite de detecção (LIQ e LD)

O LIQ foi definido, inicialmente, com base nos níveis mínimos de DXM e DTF esperados em saliva para as amostras de pacientes. Subsequentemente, a adequação foi comprovada com base nos resultados de precisão e exatidão de LIQ.

O limite de detecção (LD) foi estabelecido pelo método da relação sinal/ ruído da linha de base, determinado a partir de diluições sucessivas de amostras de LIQ em saliva até que fosse obtida uma relação sinal ruído ≥ 3 para ambos os analitos.

Estabilidades

Para todos os testes de estabilidade (exceto a estabilidade em solução), cinco amostras de CQB e CQA foram submetidas às seguintes condições:

- a) Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras foram congeladas à -20°C por 24 h e descongeladas à temperatura ambiente por pelo menos 1 hora até o início do próximo ciclo. Foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento, e ao final do terceiro ciclo as amostras foram processadas para análise.
- b) Estabilidade de pós-processamento: após serem processadas, as amostras foram

deixadas no rack do autoinjeter por um período de 13 horas à 4°C, e em seguida analisadas. O tempo de 13 horas foi escolhido com base no período máximo esperado de permanência das amostras do estudo no rack entre o processamento e a análise cromatográfica das mesmas.

- c) Estabilidade de bancada: as amostras foram deixadas na bancada, nas condições laboratoriais, por um período de 3 horas e, em seguida, foram processadas e analisadas. O tempo de 3 horas para a estabilidade de bancada foi escolhido com base no tempo máximo de permanência na bancada esperada para as amostras do estudo antes de serem processadas.
- d) Estabilidade em solução: as soluções-estoque (1 mg/ml) e as STBs de menor concentração (0,1ug/ml ou 0,25ug/ml) recém-preparadas de DXM, DTF e PI foram analisadas no T₀ (dia 1) e após serem armazenadas à 4°C por 13 dias. O período de 13 dias foi escolhido com o intuito de avaliar a estabilidade em solução dos compostos contemplando o período do início da validação (T_{zero}) até o dia da última análise de amostra de pacientes do estudo. Para tanto, as soluções foram diluídas em cada dia de análise de forma que as concentrações finais estivessem dentro da faixa de quantificação do método, sendo estas de 50 ng/ml para as soluções-mãe e de 10 ng/ml para as STBs. Cada nível de concentração foi analisado em cinco réplicas e os resultados foram obtidos comparando a média das áreas dos picos no T₀ e no T_{13 dias}.

Segundo a legislação brasileira, devem ser empregadas no estudo de estabilidade apenas amostras cujo resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal. A estabilidade em matriz é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. Para a estabilidade em solução, as soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas.

4.4 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA

4.4.1 Protocolo do estudo

Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia foram analisadas 53 amostras de saliva de pacientes incluídas no estudo “Avaliação dos níveis de tamoxifeno e seus metabólitos em mulheres com câncer de mama e correlação fenotípica para CYP2D6”, realizado no Hospital do Câncer III/INCA. No estudo referido foram elegíveis mulheres com câncer de mama em qualquer estágio da doença com indicação para o uso de tamoxifeno e que aceitassem participar do estudo. Os critérios de exclusão foram: a) uso de terapia hormonal combinada (tamoxifeno e anastrozol, por exemplo); b) presença de insuficiência hepática ou diabetes; c) uso de medicamentos inibidores ou indutores de CYP2D6, e que, portanto, possam interferir na avaliação fenotípica. São eles: *Inibidores*: inibidores de recaptção de serotonina (fluoxetina, paroxetina e citalopram), duloxetine, terbinafina e agentes antiarrítmicos de classe I (quinidina); *Indutores*: piperidinas e carbamazepina.

Todas as pacientes incluídas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Nessa ocasião, foram aplicados questionários para coleta de dados demográficos, comorbidades e hábitos de vida.

O procedimento de coleta das amostras seguiu como descrito: cada paciente recebeu o equivalente a uma dose oral de 30 mg de DXM (formulação em xarope fracionada por uma farmacêutica treinada) para a fenotipagem de CYP2D6. Após 4 horas, foram coletadas amostras de 1 ml de saliva de cada paciente em tubos de tampa rosca. As pacientes foram orientadas a cuspir dentro deste tubo e a lavar a boca com água imediatamente antes da coleta. Nenhum método foi utilizado para estimular a salivação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1000 g x min, 4°C por 20 minutos e armazenadas à -20°C até a análise.

4.4.2 Questões éticas

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (nº do protocolo CEP: 126/09) e da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (nº do protocolo do CEP: 5240).

4.4.3 Análise das amostras de pacientes

As amostras de saliva das pacientes foram processadas utilizando-se o método de precipitação de proteínas como descrito e, posteriormente, injetadas no cromatógrafo para

a análise. A análise das amostras foi feita em uma única corrida analítica composta por amostras de branco, zero (amostra de branco com PI), sete calibradores de diferentes concentrações em triplicatas, amostras de 53 pacientes e doze CQs (3 CQBs, 3 CQMs, 3CQA, e 3CQD). A cada cinco amostras de pacientes analisadas foi feita a análise de um CQ e no caso de reprovação de qualquer um dos CQs, os blocos de amostras de pacientes analisadas antes e após o CQ reprovado eram reanalisadas (n=10) para que houvesse maior confiança nos resultados.

Para que a corrida analítica seja aprovada, 67% das amostras de CQs testadas devem estar dentro dos critérios de aceitação, ou seja, desvio da concentração nominal \leq 15%. Além disso, a curva de calibração deve seguir os mesmos critérios de aceitação utilizados na validação da metodologia

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a validação da metodologia bioanalítica e descrição dos dados demográficos e hábitos de vidas foi utilizada uma estatística descritiva (média, coeficiente de variação), tendo como ferramenta o software Microsoft® Excel 2012.

O software R (versão 3.3.2) foi utilizado para a análise estatística das razões metabólicas. Foi empregado um método de estimação dos parâmetros da mistura de distribuições normais denominado “model based clustering”. As misturas das distribuições normais com um, dois ou três grupos com variáveis desiguais foram ajustadas usando algoritmo de máxima verossimilhança. Os critérios de informação bayesiana (BIC) foram utilizados para comparar os três ajustes.

5 RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

5.1.1 Método de processamento das amostras

O método de precipitação de proteínas foi testado com dois diferentes solventes: MeOH e ACN nas proporções de 1:2,5 (matriz:solvente, v:v). Após submeter amostras de saliva à precipitação de proteínas com ambos os solventes, foram obtidos picos cromatográficos com boa simetria e nenhum sinal interferente próximo ou no tempo de retenção dos analitos ou PI provenientes da matriz biológica. Além disso, mesmo diante da diluição da amostra (devido à adição do solvente), os analitos mostraram sinais quantificáveis nos níveis de LIQ (relação sinal/ruído ≥ 10).

Logo, o processo de precipitação de proteínas com MeOH ou ACN se mostrou eficiente para os parâmetros testados. O solvente de escolha para o processo foi o MeOH, devido principalmente a sua maior disponibilidade no laboratório.

A velocidade de rotação e tempo da centrifugação também foram testados. Inicialmente, o processo foi testado com centrifugação por 15 minutos a 10000 x g, porém, com o objetivo de otimizar a limpeza da amostra, a velocidade de centrifugação foi ajustada para 20000 x g e o tempo estendido para 20 minutos.

Sendo assim, o método de escolha para o processamento das amostras seguiu o seguinte procedimento (figura 6):

- 1) Adição de alíquota de 200 μ l de amostra de saliva e 50 μ l de solução de PI (250 ng/ml) em microtubos e homogeneização no vórtex por 5 segundos.
- 2) Precipitação de proteínas através da adição de 500 μ l de MeOH e homogeneização no vórtex por 5 segundos.
- 3) Centrifugação por 20 minutos à 20000 x g, 4°C.
- 4) Tomada de 200 μ l de sobrenadante em um microtubo para injeção no cromatógrafo.

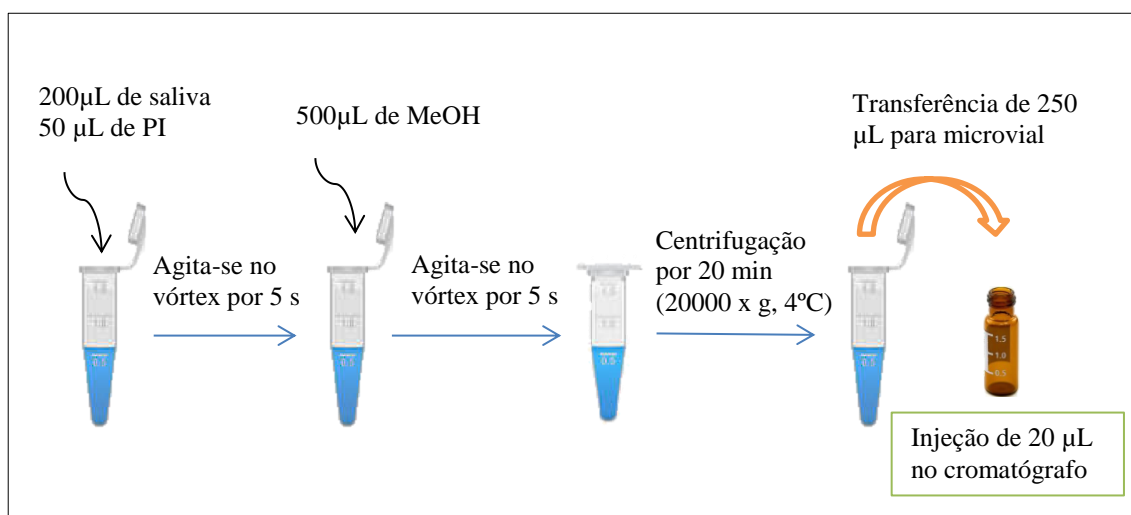


Figura 6 - método de processamento das amostras escolhido

Fonte: A autora, 2017

5.1.2 Definição dos parâmetros de espectrometria de massas

Com base na otimização automática do equipamento foram estabelecidos os parâmetros de operação para cada um dos compostos. Os parâmetros da fonte de ionização foram: temperatura da fonte= 650 °C, voltagem do íon spray= 4000 e fluxo de gás= 25.

As transições de massa escolhidas para análise e as respectivas voltagens aplicadas foram descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de operação do espectrômetro de massas

Composto	Transição (m/z)	DP (V)	CE(V)	CXP (V)
Dextrometorfano	272→147	46	39	2
Dextrorfano	258→157	51	47	4
Levalorfano	284→157	51	47	4

Legenda: DP- potencial de desaglomeração; CE- energia de colisão. CXP- potencial de saída da célula de colisão; V- volts; m/z- relação massa-carga.

Fonte: A autora, 2017.

5.1.3 Definição dos parâmetros cromatográficos

Durante o desenvolvimento do método analítico foram avaliadas diferentes colunas e combinações de fase móvel.

Em termos de resolução e simetria dos picos cromatográficos, ambas as colunas

testadas forneceram boa simetria e resolução dos picos cromatográficos, embora tenham sido utilizados sistemas de eluição diferentes. Para as análises feitas com a coluna cromatográfica Ascentis express, foi requerida uma eluição em gradiente com tempo de corrida mínimo de 12 minutos, observando-se ainda a ocorrência de um efeito residual nas condições testadas, com a presença de um pico interferente no tempo de retenção do DTF na amostra de branco de saliva proveniente de injeções anteriores (figura 7). Já a coluna Eclipse Zorbax fenil mostrou bons resultados quando a eluição era feita de forma isocrática, com tempo de corrida menor (7 minutos) e nenhum efeito residual. Por esses motivos, a coluna escolhida foi a Eclipse Zorbax fenil.

A melhor combinação de fase móvel avaliada foi composta por 65% de tampão formiato de amônio 10 mM e 35% de ACN, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. A adição de ácido fórmico na fase móvel facilita a protonação dos analitos e PI no modo positivo de ionização.

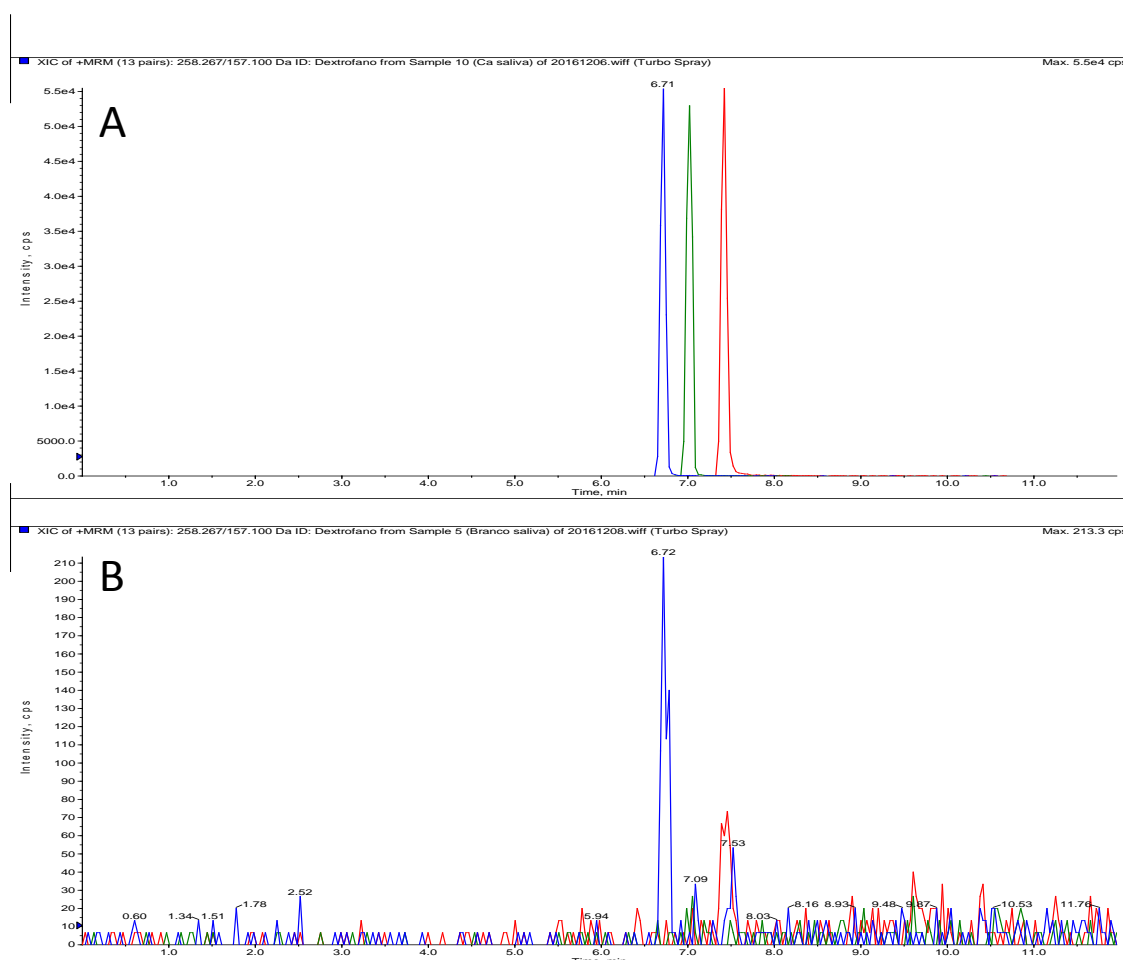


Figura 7 - Cromatogramas de amostras de C7 (A) e saliva branca (B), obtidos com a utilização da coluna Ascentis Express nas seguintes condições: fluxo de 0,5 ml/min, fase móvel composta por tampão formiato de amônio e ACN, ambos acidificados e eluição em gradiente.

Fonte: A autora, 2017.

Os parâmetros cromatográficos escolhidos para a metodologia analítica foram:

- Coluna cromatográfica: Zorbax Phenyl (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).
- Temperatura da coluna: 20°C.
- Fase móvel A:B (65:35), onde fase A é tampão formiato de amônio 10 mM e fase B é ACN, ambos acidificados com 0,1% de AF.
- Eluição isocrática; fluxo: 1 ml/min.
- Volume de injeção: 20 µl.
- Temperatura do autoinjeter: 4°C.
- Solução de lavagem da agulha: MeOH:água:isopropanol (40:30:30; v:v:v) basificada com 0,1% de trietilamina- lavagem por 40 segundos antes de cada injeção

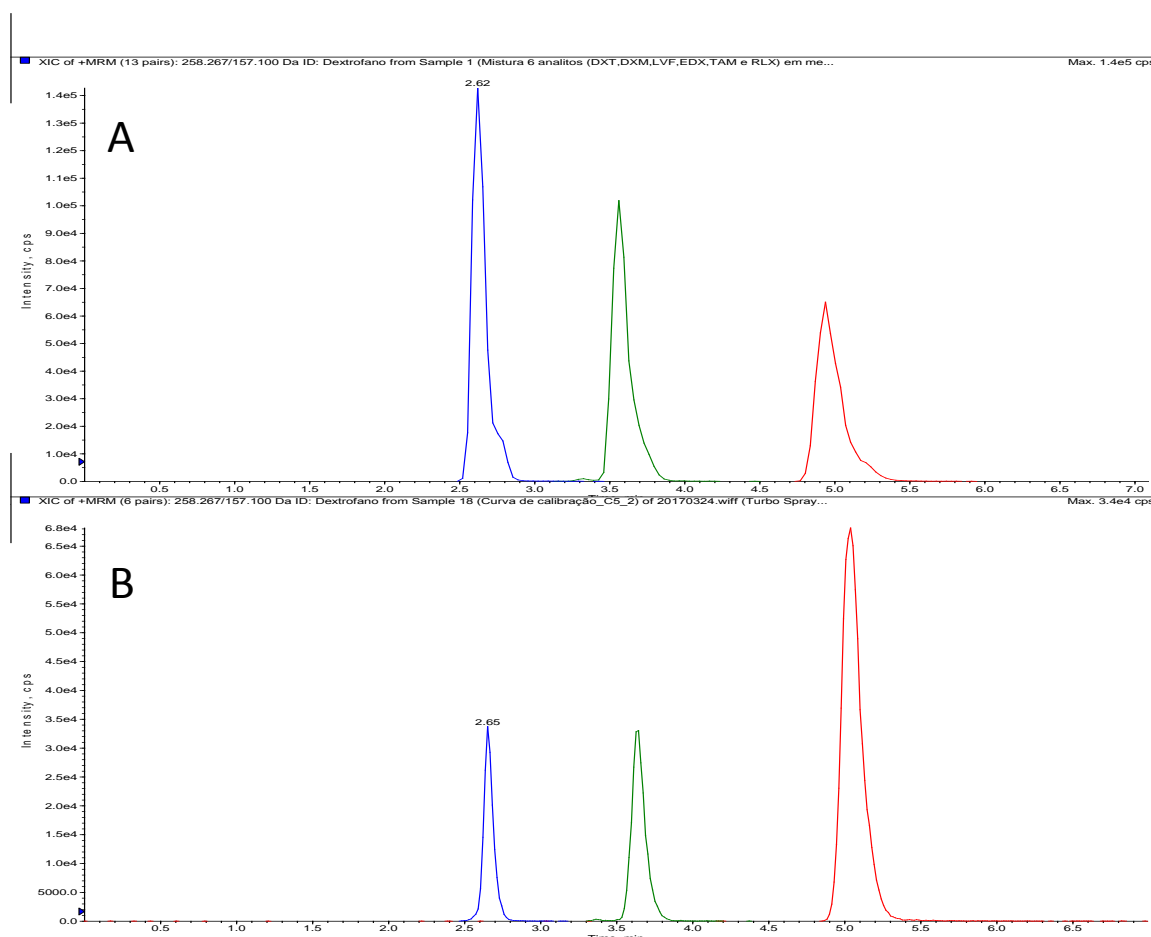


Figura 8 - Cromatogramas mostrando os picos cromatográficos dos compostos e PI em solução e em saliva. (A) cromatograma do DTF, PI e DXM (60 ng/ml) em solução de MeOH:H₂O (1:1) (B) cromatograma de uma amostra de calibrador 5 (em saliva), mostrando os picos correspondentes de DTF, PI e DXM, respectivamente.

Fonte: A autora, 2017.

A corrida cromatográfica nas condições finais apresentou tempo total de 7 minutos. Os tempos de retenção observados foram de 2,6 min para o DTF, 3,6 min para o LVF e 5,0 min para o DXM. A figura 8 ilustra o perfil cromatográfico dos analitos e PI nas condições escolhidas para o método.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Seletividade

Não foram observados picos interferentes de substâncias endógenas em nenhuma das oito amostras de saliva testadas, como mostrado na figura 9 (A-H).

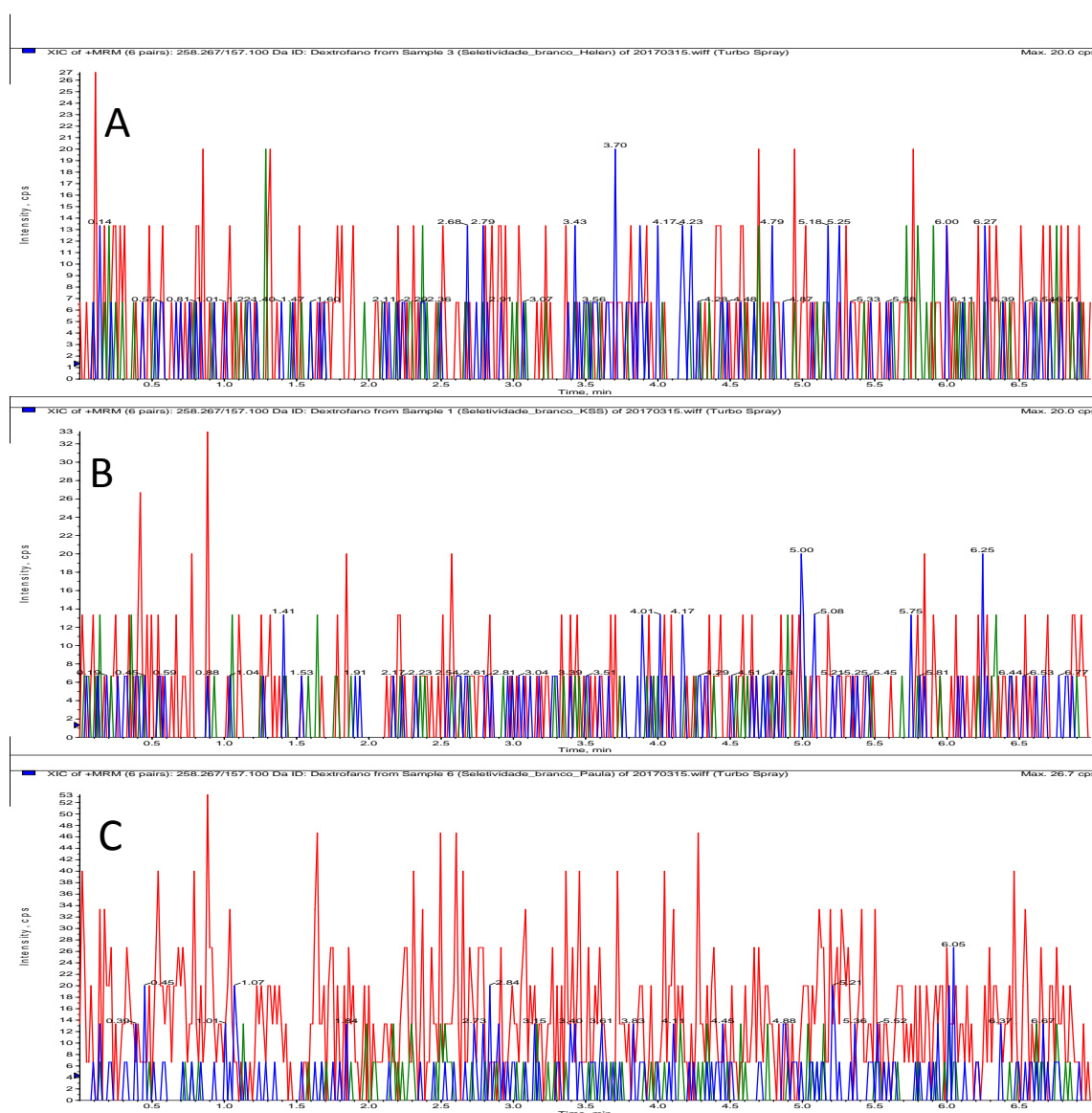


Figura 9 continuação (A-C) - Cromatogramas de amostras de saliva branca para ensaio de seletividade. Fonte: A autora, 2017.

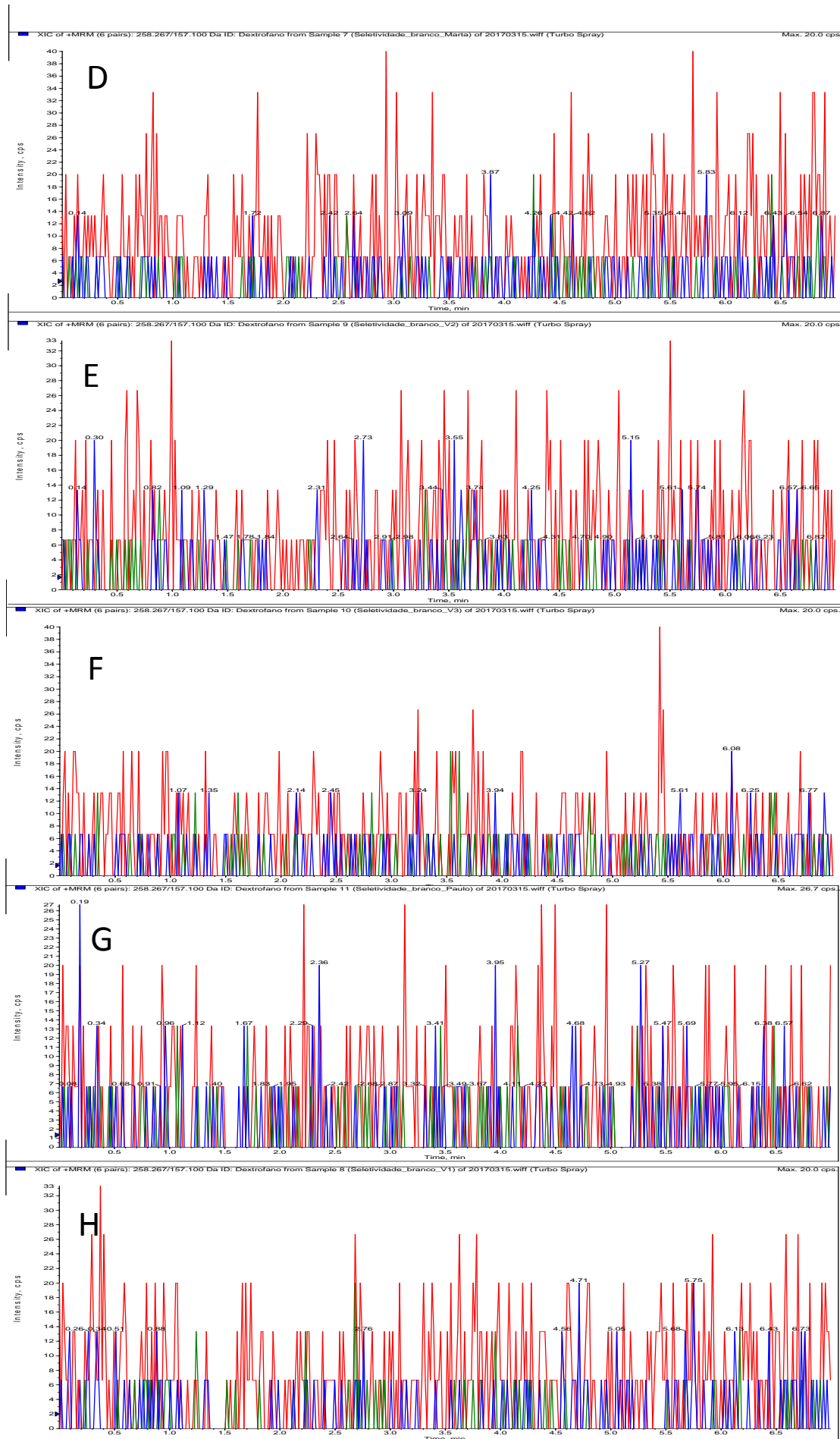


Figura 9 (D-H) - Cromatogramas de amostras de saliva branca para ensaio de seletividade. Fonte: A autora, 2017.

Linearidade, LIQ e LD

As curvas de calibração mostraram linearidade nas faixas de concentração de 1-100 ng/ml para o DTF e de 5-1000 ng/ml para o DXM. Os coeficientes de correlação de todas as curvas de calibração foram maiores que 0,998 para o DTF e maiores que 0,997 para o DXM. Para ambos os analitos, os valores de exatidão (desvio da concentração nominal) para os calibradores utilizados na construção das curvas variaram de 92,8% a 107,7% (ANEXO), respeitando os limites de 85-115% preconizados pela legislação brasileira. Os valores de LIQ foram de 5 ng/ml (S/R: 36) e 1 ng/ml (S/R: 20) para DXM e DTF, respectivamente. O LD de DXM e DTF foi de 0,5 ng/ml (S/R: 6,5) e 0,25 ng/ml (S/R:4,5), respectivamente.

Precisão e Exatidão

Os resultados de precisão e exatidão inter-corrída e intra-corrída foram descritos nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultados do ensaio de precisão e exatidão inter-corrída

Dextrorfano - concentração (ng/ml)					
	LIQ = 1	CQB = 2	CQM = 45	CQA = 80	CQD = 75
Média	0,93	1,94	41,89	84,57	76,89
DesvPad	0,06	0,09	0,90	3,05	2,91
CV%	6,36	4,46	2,15	3,60	3,79
EPR%	-6,88	-3,17	-6,92	5,71	2,52
Dextrometorfano- concentração (ng/ml)					
	LIQ = 5	CQB = 10	CQM = 450	CQA = 800	CQD = 750
Média	4,87	9,04	475,73	769,80	724,33
DesvPad	0,24	0,39	12,10	28,31	26,42
CV%	4,94	4,30	2,54	3,68	3,65
EPR%	-2,59	-9,59	5,72	-3,78	-3,42

Legenda: desvpad- desvio padrão; CV%- coeficiente de variação; EPR- erro padrão relativo

Fonte: A autora, 2017.

Tabela 5 - Resultados da precisão e exatidão intra-corrída

Concentração	Dextroanfano			Concentração	Dextrometorfano		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		Dia 1	Dia 2	Dia 3
LIQ=1	1,10	0,90	0,85	LIQ=5	5,25	4,99	5
	0,99	0,94	0,90		5,05	4,82	4,53
	0,92	0,91	0,88		5,01	4,75	4,52
	0,94	0,97	0,90		4,93	4,98	4,48
	0,95	0,99	0,93		5,08	4,99	4,55
Média	0,98	0,94	0,89	Média	5,06	4,91	4,62
Desvpad	0,07	0,04	0,03	Desvpad	0,12	0,11	0,22
CV%	7,45	4,12	3,26	CV%	2,33	2,31	4,68
EPR%	-2,26	-5,96	-10,84	EPR%	1,28	-1,88	-7,68
CQB=2	1,95	1,95	2,05	CQB=10	9,81	9	8,77
	2,01	2,00	1,89		9,44	9,43	8,57
	1,96	1,90	1,82		8,69	9,07	8,72
	1,90	1,97	2,01		9,39	9,11	8,57
	1,85	1,97	1,82		9,4	9,06	8,58
Média	1,93	1,96	1,92	Média	9,35	9,13	8,64
Desvpad	0,06	0,04	0,11	Desvpad	0,41	0,17	0,10
CV%	3,16	1,89	5,58	CV%	4,34	1,86	1,11
EPR%	-3,30	-2,10	-4,10	EPR%	-6,54	-8,66	-13,58
CQM=45	42,60	42,70	40,80	CQM=450	487	484	460
	42,80	42,20	39,80		493	466	458
	42,20	43,00	41,00		482	488	462
	42,10	42,80	41,40		490	470	464
	41,80	41,90	41,20		487	473	472
Média	42,30	42,52	40,84	Média	487,80	476,20	463,20
Desvpad	0,40	0,45	0,62	Desvpad	4,09	9,39	5,40
CV%	0,95	1,07	1,53	CV%	0,84	1,97	1,17
EPR%	-6,00	-5,51	-9,24	EPR%	8,40	5,82	2,93
CQA=80	85,3	83,2	82,8	CQA=800	763	743	724
	86,4	82,3	84		777	762	775
	85	86,1	82,1		780	784	760
	86,4	86,6	80,7		776	788	753
	92,1	86	79,5		848	776	738
Média	87,04	84,84	81,82	Média	788,80	770,60	750,00
Desvpad	2,90	1,95	1,76	Desvpad	33,73	18,35	19,71
CV%	3,33	2,30	2,15	CV%	4,28	2,38	2,63
EPR%	8,80	6,05	2,28	EPR%	-1,40	-3,68	-6,25
CQD=75	80,5	81,1	72,4	CQD=750	763	730	691
	75,8	79,9	75,4		745	716	703
	74,9	80,5	74,5		748	724	714
	78,2	75,7	72,7		754	677	692
	79	78,2	74,5		761	725	722
Média	77,68	79,08	73,90	Média	754,20	714,40	704,40
Desvpad	2,30	2,18	1,29	Desvpad	7,85	21,50	13,58
CV%	2,97	2,75	1,75	CV%	1,04	3,01	1,93
EPR%	3,57	5,44	-1,47	EPR%	0,56	-4,75	-6,08

Legenda: desvpad- desvio padrão; CV%- Coeficiente de variação; EPR- erro padrão relativo. Fonte: A autora, 2017.

O método mostrou ser preciso e exato para a quantificação de DXM e DTF em ambos os ensaios de intra-corrída e intercorrída e em todos os níveis testados. Para os ensaios de exatidão intra-corrída e inter-corrída, os resultados variaram de -13,6 a +8,8% e de -9,6 a +5,7%, respectivamente. Para os três dias de validação, a precisão intra-corrída teve todos os valores $\leq 7,5\%$. Já a precisão inter-corrída variou de 2,1 a 6,4%. A capacidade do método de quantificar DXM e DTF de forma precisa e exata em amostras diluídas também foi avaliada na validação. Os resultados de exatidão para amostras diluídas 4 vezes foram de -6,4% para o DXM e +5,4% para o DTF, atendendo aos critérios de aceitação ($\leq 15\%$). Esses valores comprovam que amostras com concentrações acima do limite superior de quantificação podem ser reanalisadas após diluição adequada a fim de que seus níveis se adequem à faixa linear de concentração validada.

Efeito matriz

Todos os resultados obtidos para o efeito matriz de ambos os analitos atenderam aos critérios de aceitação preconizados pela ANVISA ($CV\% \leq 15\%$). Os valores obtidos de FMN e de $CV\%$ nos dois níveis de concentração estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do ensaio de efeito matriz

Amostras	DTF		DXM	
	FMN CQB	FMN CQA	FMN CQB	FMN CQA
V1	0,87	0,88	0,98	1,42
V2	0,83	0,89	1,02	1,58
V3	1,03	1,01	1,05	1,38
V4	0,80	0,89	0,97	1,18
V5	0,80	0,83	0,95	1,45
V6	0,84	0,86	1,00	1,17
média	0,86	0,89	0,99	1,36
desvpad	0,09	0,06	0,04	0,16
CV%	10,24	7,09	3,70	11,77

Legenda: desvpad- desvio padrão; FMN- fator de matriz normalizado; $CV\%$ - coeficiente de variação em porcentagem. V- voluntário.

Fonte: A autora, 2017.

Efeito residual

Uma mesma amostra de branco foi injetada três vezes para avaliação do efeito residual, sendo uma antes e duas após a injeção do calibrador 7. Nenhum efeito residual foi observado para os analitos ou PI em nenhuma das injeções, assim como mostra a figura 10 (A-D).

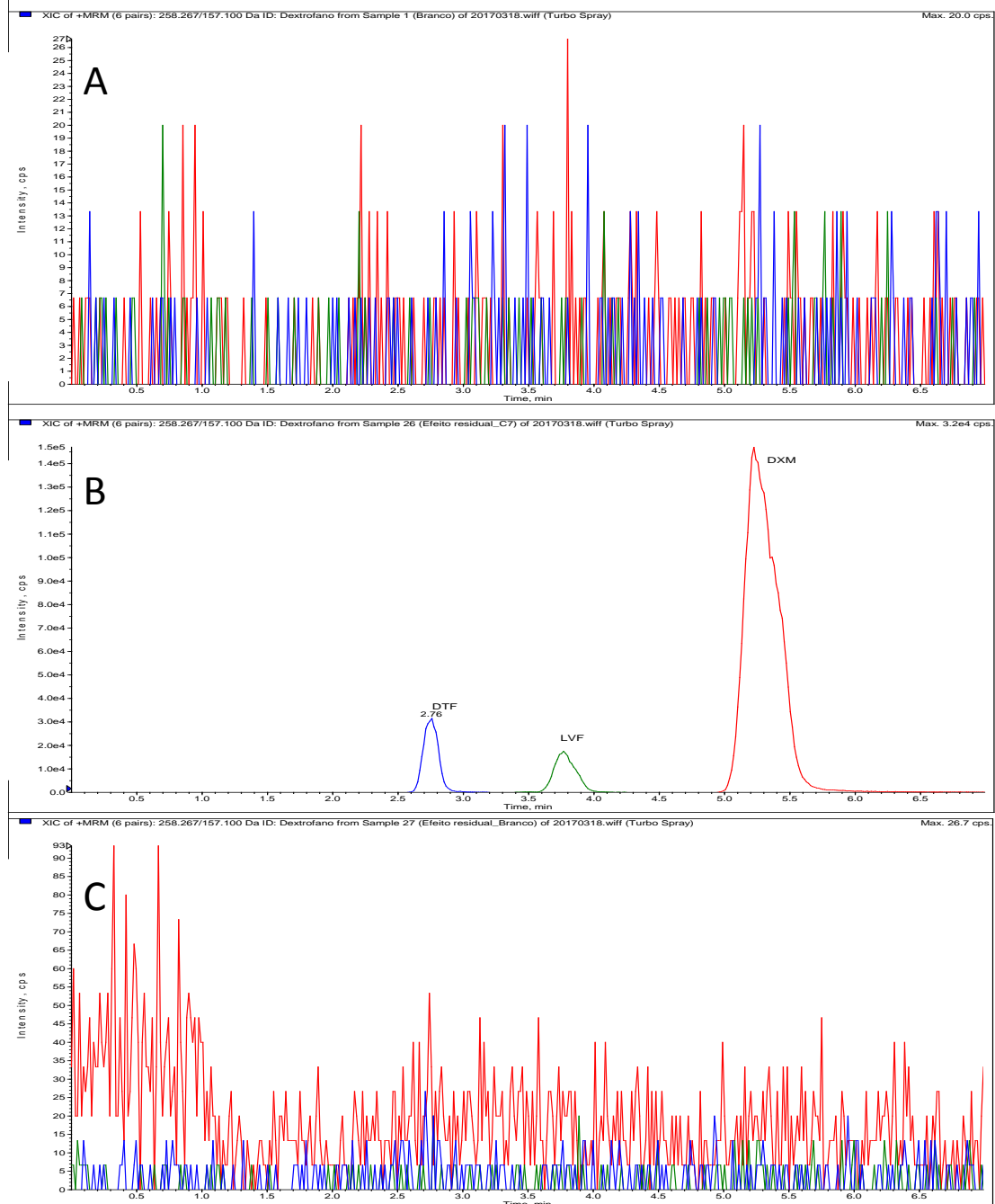


Figura 10 (A-C) continua - Cromatogramas do ensaio de efeito residual; (A) Cromatograma de amostra de saliva branca antes da injeção de C7. (B) cromatograma de amostra de C7; (C) Cromatograma da mesma amostra de saliva branca após injeção de C7. Fonte: A autora, 2017.

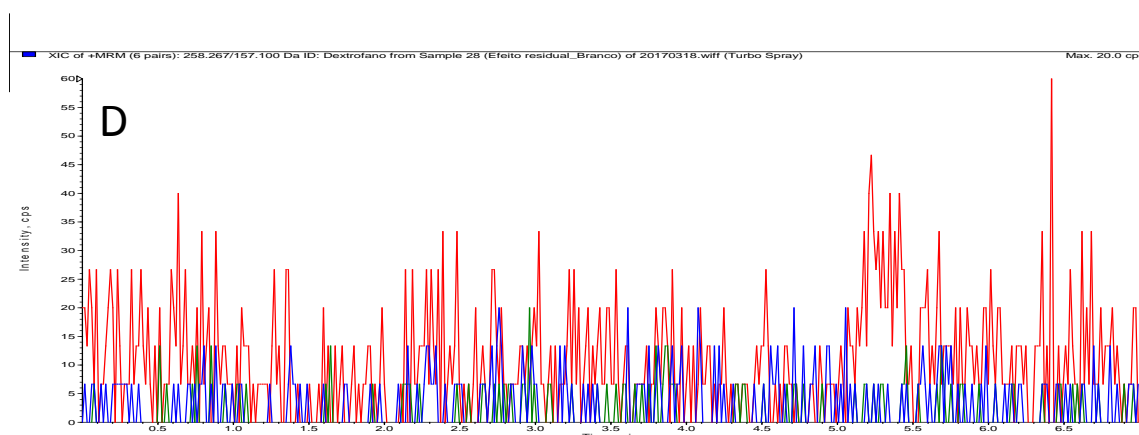


Figura 10 (D) - Cromatograma da mesma amostra de saliva branca após injeção de C7.
Fonte: A autora, 2017.

Estabilidades

Os resultados de estabilidade mostram que o DXM, DTF e LVF foram estáveis em todas as condições testadas (tabela 7). Para a estabilidade em saliva, os valores obtidos para todos os níveis testados estão de acordo com os critérios de aceitação (desvio da concentração nominal de $\leq 15\%$). Todos os compostos mostraram ser estáveis em solução estoque ou STBs por um período de 13 dias à 4°C, apresentando desvios da concentração nominal $\leq 8,5\%$.

Tabela 7 - Resultados dos ensaios de estabilidade

Ensaio	Condições	Composto	Conc. nominal (ng/ml)	Dev (%)
Estabilidade em solução	4°C, 13 dias	DXM	10	-2,3
			50	2,1
		DTF	10	7,4
			50	-3,7
		LVF	10	1,5
Estabilidade pós-processamento	4°C, 13h		50	-8,5
		DXM	10	-14,4
			800	-8,8
		DTF	2	-9,7
			80	-3,3
Estabilidade de bancada	25-30°C, 3h	DXM	10	-11,9
			800	-8,9
		DTF	2	-1,3
			80	1,3
		Estabilidade ciclos congelamento e descongelamento	3 ciclos de congelamento (-20°C)/ descongelamento	DXM
			800	-6,8
		DTF	2	-3,2
			80	2,1

Legenda: Dev- desvio da concentração nominal; DXM- Dextrometorfano; DTF- dextrofano; LVF- Levalorfano. Fonte: A autora, 2017.

5.3 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA

5.3.1 Descrição da amostra

Os dados demográficos e de hábitos de vida foram coletados através da aplicação de questionários, entretanto, alguns questionários estavam incompletos. Logo, os dados descritos nessa seção representam uma parte da amostra total de pacientes analisadas.

As características demográficas e alguns hábitos de vida de 49 pacientes foram dispostos no quadro 6. Todas as pacientes incluídas eram do sexo feminino. A mediana da idade foi de 50 anos (32-76 anos) e a maioria das pacientes era branca (57%). Cinquenta e um por cento apresentava ensino médio completo, enquanto 10% apresentava baixo ou nenhum grau de escolaridade (Ensino fundamental incompleto). Quase metade das participantes (47%) relataram nunca consumir álcool. Quanto ao hábito de fumar, 28% das participantes relataram fumar ou serem ex-fumante.

Quadro 6 - Dados demográficos e de hábitos de vida das pacientes (N=49).

Dados Demográficos		N = 49
Idade	Média	51,8
	Mediana (mín-máx)	50 (32-76)
		N (%)
Escolaridade	Ensino fundamental incompleto	5(10,2)
	Ensino fundamental completo	8(16,3)
	Ensino médio completo	25(51)
	Ensino superior completo	10(20,4)
	Não informado	1(2,1)
Raça	Branca	28 (57)
	Parda	16(33)
	Preta	4(8)
	Não informado	1(2)
Hábitos de Vida		N (%)
Consumo de álcool	Nunca	23(47)
	Raramente	14(29)
	Aos finais de semana	9(18)
	Regularmente	1(2)
	Não informado	2(4)
Hábito de fumar	Ex fumante	10(20)
	Fumante ativo	4(8)
	Não fumante	34(70)
	Não informado	1(2)

Fonte: A autora, 2017.

Outro fator avaliado foi a presença de comorbidades e o uso de medicamentos. A comorbidade mais frequente relatada pelas pacientes foi a hipertensão (38,4%), seguida da gastrite (31,8%) e artrose (27,3%), conforme ilustrado na figura 11. Da mesma forma, segundo relatos das pacientes, o uso de medicamentos para o tratamento da hipertensão foi o mais frequente, seguido de medicamentos para o tratamento da gastrite. Embora apenas uma paciente tenha relatado ter psicose ou quadros relacionados, um total de 3 pacientes faziam uso de medicamentos para o tratamento deste tipo de comorbidade (figura 11).

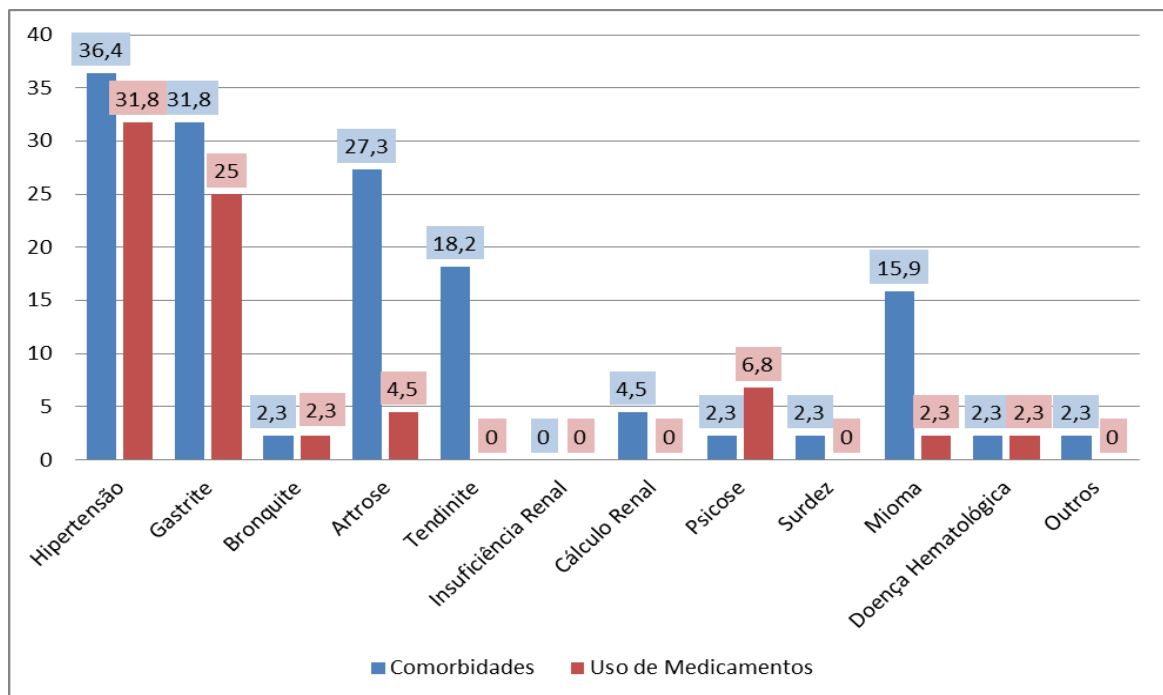


Figura 11 - Dados de comorbidades e uso de medicamentos (n= 44).

Fonte: A autora, 2017.

5.3.2 Determinação dos níveis de DTF e DXM em saliva e classificação fenotípica

As concentrações de DTF e DXM foram determinadas em 53 amostras de saliva. A figura 12 mostra um cromatograma da análise de saliva de uma das pacientes. Os valores experimentais e a razão metabólica para cada uma das pacientes estão listados no APÊNDICE A. As concentrações em saliva apresentaram uma mediana de 5,27 (variando de < 1 a 19,9 ng/ml) para DTF e de 265 (variando de 12,3 a 3232 ng/ml) para DXM. Duas pacientes apresentaram níveis de DTF em saliva detectáveis, porém abaixo do LIQ (1 ng/ml). Três pacientes apresentaram concentrações de DXM acima do limite superior de quantificação (1000 ng/ml), e tiveram suas amostras reanalisadas após diluição adequada.

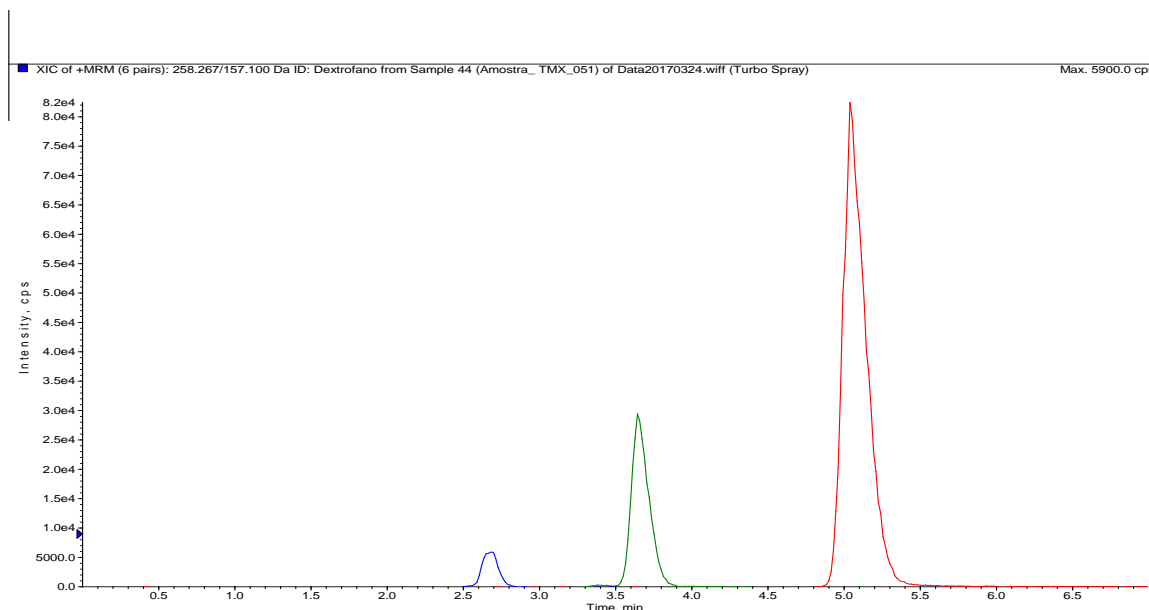


Figura 12 - Cromatograma de amostra de saliva da paciente 051; picos cromatográficos de DTF (13 ng/ml), LVF e DXM (306 ng/ml), respectivamente.
Fonte: A autora, 2017.

As $RM_{DXM/DTF}$ em saliva foram calculadas para cada paciente e os valores variaram de 4 a 383. A figura 13 mostra as distribuições de frequências das $RM_{DXM/DTF}$ em saliva para todas as pacientes ($n=53$) (A) e excluindo-se as pacientes que apresentaram níveis de DXT abaixo do LIQ (B).

Com base nos valores de $RM_{DXM/DTF}$, foi feita uma análise estatística para avaliar a existência de um, dois ou mais grupos de metabolização. Essa análise foi feita avaliando-se quantas distribuições normais (número de componentes) melhor explicariam a distribuição das amostras das pacientes obtidas. Sendo assim, foram testados diferentes ajustes utilizando-se o critério de informação bayesiana (BIC). Quando o melhor ajuste é uma única distribuição normal, dizemos que é possível identificar apenas um único grupo de pacientes (ou um grupo metabólico). Por outro lado, quando o melhor ajuste observado é composto de uma mistura de duas ou mais distribuições normais, é possível distinguir entre dois ou mais grupos, respectivamente, sendo cada distribuição normal referente a um grupo de pacientes caracterizando, neste caso, diferentes grupos metabólicos.

A adequação dos ajustes testados é avaliada através do valor de BIC, para o qual temos que quanto maior o valor de BIC, maior é a adequação da mistura. Como podemos ver na figura 14, o maior valor de BIC (eixo x) corresponde à uma única distribuição normal (ou um único grupo metabólico). Assim, estatisticamente, não foi possível fazer a distinção entre os grupos quanto ao perfil de metabolização, provavelmente devido ao tamanho

amostral limitado. Por esse motivo, todas as pacientes testadas nesse estudo foram classificadas como metabolizadoras normais ou ME.

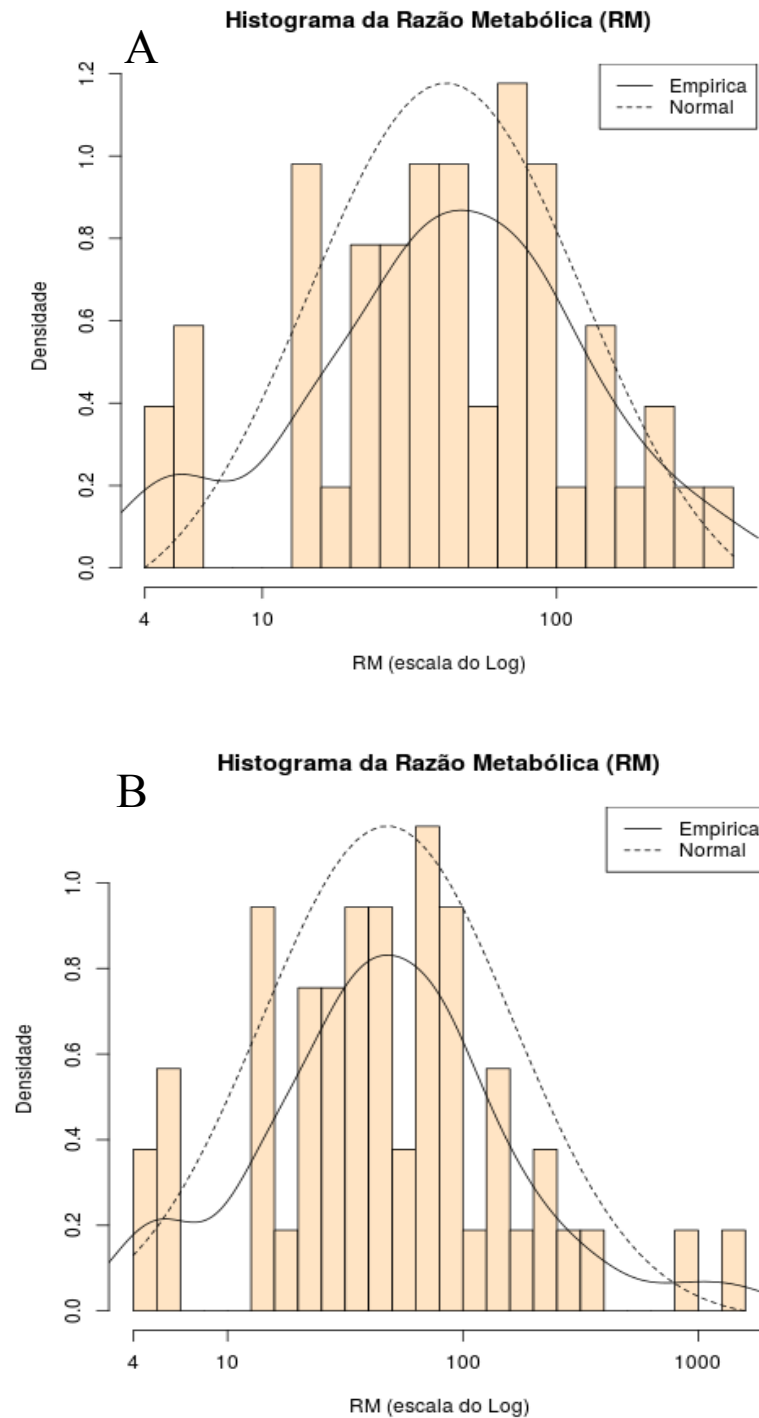


Figura 13 - Gráficos de distribuição de frequência de $RM_{DXM/DTF}$ em escala log. (A) distribuição de frequências das $RM_{DXM/DTF}$ com exclusão das pacientes abaixo do LIQ ($n=51$); (B) Distribuição de frequências das $RM_{DXM/DTF}$ para todas as pacientes ($n=53$).

Fonte: A autora, 2017.

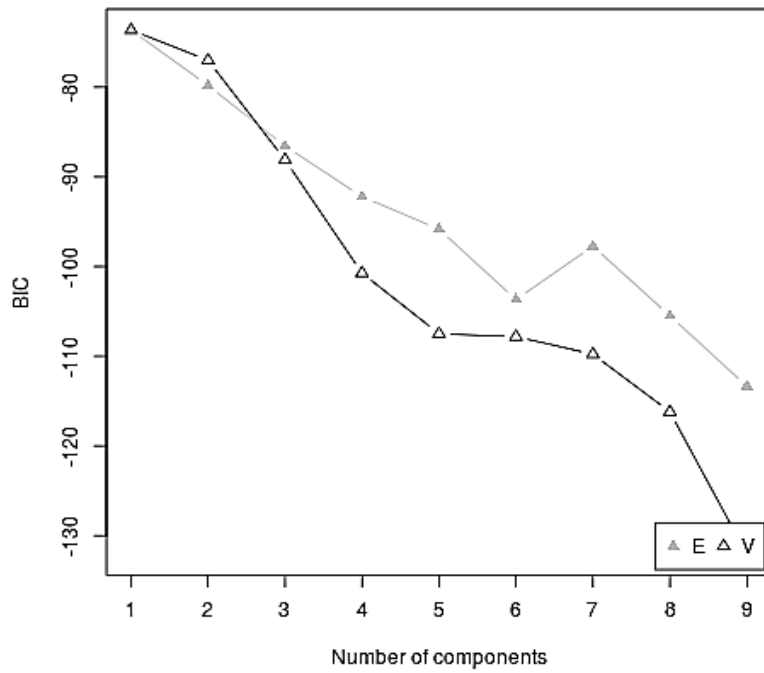


Figura 14 - Resultado do teste BIC.

Fonte: A autora, 2017.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos na literatura fazem o uso da fenotipagem de CYP2D6 empregando-se diferentes FS e matrizes biológicas (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). Foi demonstrado que o DXM e a debrisoquina são os FS mais adequados para a fenotipagem de CYP2D6 (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007). No presente estudo, a escolha do DXM como FS se deu principalmente devido a sua maior disponibilidade comercial e segurança, além da sua ampla utilização em outros estudos similares.

Para o procedimento da fenotipagem de CYP2D6, as matrizes biológicas mais utilizadas são o plasma ou soro sanguíneo e a urina. Embora mais comuns, essas matrizes apresentam algumas limitações no que se refere à coleta ou mesmo à análise das amostras (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016). Para a coleta de amostras de sangue, por exemplo, é necessária uma pessoa treinada para realizar a coleta, além de ser um procedimento invasivo para os indivíduos testados (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016). Já as amostras de urina têm como umas das principais limitações a susceptibilidade do DXM a variações do pH urinário. O DXM é uma molécula de caráter básico ($pK_a=9,85$) e lipossolúvel, e a sua reabsorção passiva nos túbulos renais pode variar consideravelmente em função do pH urinário, influenciando na depuração renal do composto. Assim, a $RM_{DXM/DTF}$ urinária varia em função do pH da urina para um mesmo indivíduo, o que pode levar à uma classificação fenotípica errônea (OZDEMIR et al., 2004). Outra questão que merece destaque é a necessidade de múltiplas coletas de urina em protocolos de fenotipagem, o que é pouco conveniente para o indivíduo testado (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2016).

Por esses motivos, o uso de matrizes biológicas alternativas como a saliva pode ser particularmente interessante, uma vez que traz maior facilidade e comodidade, auxiliando na implementação da fenotipagem na prática clínica.

Diversas metodologias analíticas já foram relatadas para a determinação simultânea de DXM e DTF em plasma, soro ou urina (AFSHAR; ROUINI; AMINI, 2004; ANTUNES, et al., 2014; DONATO et al., 2012; EBESHI; OBODOZIE; BOLAJI, 2014; LOOS et al., 2011), porém, até o momento, poucas metodologias foram descritas para a determinação desses analitos em saliva humana. Assim, no presente estudo foi desenvolvida e validada uma metodologia simples e relativamente rápida em CL-EM/EM para a determinação de DXM e DTF em saliva humana, de forma que esta possa ser utilizada como uma alternativa para a fenotipagem de CYP2D6.

Um total de cinco métodos para determinação de DXM e DTF em saliva já foram

descritos, os quais utilizaram as técnicas de HPLC-FL (HOU et al., 1991; HU et al., 1998), CL-EM/EM (AMARATUNGA et al., 2016; LUTZ et al., 2004) ou CG-EM/EM (RODRIGUES et al., 2008). No presente estudo, a técnica utilizada foi a CL-EM/EM assim como dois dos métodos descritos em saliva. A tabela VIII faz um comparativo entre as características dos métodos já descritos em saliva e do presente método.

A escolha do método de processamento das amostras é uma etapa muito importante no desenvolvimento de um método bioanalítico. Uma vantagem do método desenvolvido é o uso da precipitação de proteínas para o processamento das amostras, diferente dos métodos já descritos que utilizaram as técnicas de extração líquido- líquido (HU et al., 1998), extração em fase sólida (AMARATUNGA et al., 2016; HOU et al., 1991; RODRIGUES et al., 2008) ou concentração de amostras (LUTZ et al., 2004).

A técnica de precipitação de proteínas é uma técnica simples e de baixo-custo operacional, que requer poucas etapas de processo quando comparada às outras técnicas de processamento de amostras (SINGLETON, 2012). A extração em fase sólida, por exemplo, utilizada na maioria dos estudos, além de ser um procedimento muito trabalhoso, é relativamente caro, especialmente em função do alto custo dos cartuchos utilizados uma única vez no processo. As técnicas de extração líquido-líquido e concentração de amostras são outras opções para o preparo de amostras contendo os analitos estudados (HU et al., 1998; LUTZ et al., 2004). Embora eficientes, requerem um tempo de processamento maior (respectivamente 1,5 hora e 24 horas) quando comparados com a precipitação de proteínas (30 minutos).

Algumas preocupações que envolvem o uso da precipitação de proteínas são a baixa eficiência na eliminação de interferentes e a diluição das amostras (SINGLETON, 2012). Entretanto, nenhum desses fatores interferiu de forma relevante no desenvolvimento do método, provavelmente devido à alta sensibilidade e seletividade da técnica de CL-EM/EM. Para a análise, o volume de saliva empregado foi de 200 μ l, bastante semelhante aos estudos de Lutz et al. (2004) e Rodrigues et al. (2008) os quais utilizaram alíquotas de 250 μ l, porém muito inferior aos outros três métodos descritos que utilizaram volumes de até 3 ml de saliva.

Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos do presente método e dos métodos já descritos para quantificação em saliva.

Autor, ano	analitos	preparo da amostra	Volume de amostra	coluna	Fase móvel	fluxo (ml/min)	tempo de corrida (min)	técnica
Presente estudo	DXM e DTF	Precipitação de proteínas	200 µl	Zorbax fenil (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão formiato de amônio 10mM +AF: ACN+AF (65:35, v:v)	1	7	CL-EM/EM
Hu et al., 1998	DXM e DTF	Extração líquido-líquido	3ml	Coluna Zorbax fenil (dimensões não especificadas)	Tampão fosfato de potássio 10mM: ACN (1:1) pH=4 (ajuste com ácido fosfórico 8,5%)	1	13	HPLC-FL
Hou et al., 1991	DXM e DTF	Extração em fase sólida	3ml	Zorbax phenyl C ₁₈ (150 x 4,6 mm)	Tampão fosfato de potássio 10 mM (pH= 4):ACN (45:55; v:v)	1,5	não consta	HPLC-UV
Lutz et al., 2004	DXM, DTF, 3-metoxi-morfinano, 3-hidroximorfinae dois metabólitos glucuronidados.	Adição de MeOH seguido de centrifugação.	250 µl	Hypersil 3 C ₈ -BD (100 × 2 mm)	Fase A: H ₂ O + 0,1% AF; Fase B: ACN+0,1% AF; Eluição em gradiente	0,24	8	CL-EM/EM
Amaratunga et al., 2016	DXM e DTF	Extração em fase sólida	400 µl	Zorbax SB-C ₈ RRHD (100 × 2.1 mm, 1.8 mm)	Fase A: H ₂ O + 0,1% AF:ACN (95:5; v:v); Fase B: ACN + 0,1% AF.	0,4	4	UPLC-EM/EM

Legenda: ACN: acetonitrila; AF: ácido fórmico; DAD: detector de arranjo de diodos ;DTF: dextrorfanio; DXM: dextrometorfano; EM/EM: detector de espectrometria de massas triplo quadrupolo; FL= detector de fluorescência; HPLC= cromatografia líquida de alta eficiência; MeOH= metanol; UPLC=cromatografia de ultra performance; UV: detector ultravioleta. Fonte: A autora, 2017.

O sistema cromatográfico escolhido envolveu o uso de coluna de fase reversa do tipo fenil (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) e fase móvel em modo de eluição isocrático, como também descrito em dois dos métodos (HOU et al., 1991; HU et al., 1998). O uso da coluna cromatográfica fenil promoveu uma ótima separação cromatográfica, com boa simetria e resolução entre os picos cromatográficos. Já a eluição no modo isocrático é vantajosa para o método, pois, diferente das eluições em gradiente, não requer um tempo de condicionamento entre as corridas cromatográficas, fator que acaba aumentando o tempo total necessário de corrida. Além disso, a eluição isocrática permite que o método possa ser reproduzido em equipamentos de cromatografia mais simples com bombas isocráticas, por exemplo, o que não é possível com eluições em gradiente. O tempo de corrida do método desenvolvido foi de 7 minutos, relativamente pequeno quando comparado aos outros métodos em cromatografia líquida que apresentaram um tempo de corrida de até 13 minutos (HOU et al., 1991; HU et al., 1998; LUTZ et al., 2004), só sendo maior que o método de Amaratunga et al. (2016) que requer um tempo de corrida de 4 minutos. É importante notar que no estudo de Amaratunga et al. (2016) foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), a qual opera em altas pressões e velocidade permitindo corridas mais rápidas (KUMAR et al., 2012).

O método desenvolvido nesse estudo foi validado segundo os critérios preconizados pela ANVISA, os quais são similares ou, por vezes, mais exigentes que os critérios estabelecidos em outras normas internacionais. Todos os parâmetros testados estavam dentro dos critérios de aceitação, sendo eles: precisão, exatidão, linearidade, LIQ e LD, efeito residual, efeito matriz e estabilidades. Com exceção do método descrito por Hou et al. (1991), todos os métodos já documentados em saliva foram validados, embora alguns tenham empregado um protocolo de validação diferente do utilizado nesse estudo. No estudo de Hou et al. (1991), a metodologia utilizada foi adaptada a partir de outra já descrita para a determinação em urina (PARK; PETER KULLBERG; HINSVARK, 1984), e o autor não fornece dados completos de validação da metodologia em saliva. Os dados descritos incluem apenas resultados do ensaio da precisão inter-ensaio utilizando-se dois níveis de concentração (valores de 7.5% e 8.6% para amostras de 7.5 e 33.3 ng/ml, respectivamente). Já os autores Lutz et al. (2004), Rodrigues et al. (2008) e Hu et al. (1998) descrevem em seus estudos os resultados da validação da metodologia para alguns dos parâmetros testados em nosso método (linearidade, precisão e exatidão, LIQ, LD e estabilidade), para os quais os resultados obedeceram aos critérios de aceitação descritos

no presente estudo.

O método descrito por Amaratunga et al. (2016) foi validado de forma muito similar ao protocolo preconizado pela ANVISA, sendo este o único autor que realizou o ensaio de efeito matriz. Com base nos dados de validação, pode-se dizer que este método apresentou algumas limitações. Inesperadamente, o método apresentou um efeito matriz pronunciado para ambos os analitos, mesmo utilizando-se a extração em fase sólida para o processamento de amostras. O ensaio de efeito matriz para o método de Amaratunga et al. (2016) apresentou valores de CV% fora das especificações para os dois analitos ($\geq 15\%$), com valores de até 29,4% e de até 17,8% para o DXM e DTF, respectivamente. Além disso, a precisão intra-corrída para o DTF em amostras de LIQ (5 ng/ml) foi maior que 20%, valor preconizado pela ANVISA e por outras normas internacionais (CV= 21,2%) (EMA, 2011; FDA, 2013).

O presente método foi validado inicialmente na faixa de concentração de 1 à 100 ng/ml para ambos os analitos (dados não mostrados) com base nas faixas de quantificação já documentadas na literatura. Após a aplicação do método nas amostras de pacientes, constatou-se que a faixa não era adequada para a quantificação de DXM nas amostras. Por esse motivo, uma nova validação completa foi realizada modificando-se as faixas de DXM para 5 à 1000 ng/ml e mantendo-se a faixa de concentração para o DTF. Sendo assim, pode-se dizer que o método é adequado para determinação de DXM em ambas as faixas de concentração validadas.

Ainda com relação à validação, podemos citar algumas limitações do método aqui desenvolvido como a não realização dos ensaios de estabilidade de longa duração, recuperação dos analitos e robustez do método.

Assim como no presente trabalho, as diferentes metodologias descritas foram aplicadas para a determinação de amostras de saliva em alguns estudos. Um total de 53 amostras de saliva foram analisadas nesse estudo. Os níveis obtidos de DTF tiveram mediana de 6,6 ng/ml, variando de < 1 ng/ml a 19,9 ng/ml, similares aos valores encontrados nos estudos de Lutz et al. (2004) e Hou et al. (1996), porém bastante diferente dos valores observados no estudo de Rodrigues et al (2008) (tabela IX). Por outro lado, os níveis observados para o DXM em saliva diferiram consideravelmente, sendo maiores que os valores documentados em outros trabalhos. Enquanto os valores observados nesse estudo para o DXM variaram de 12,3 ng/ml a 3232 ng/ml, o nível mais alto de DXM relatado na literatura foi de 803 ng/ml.

Como mostrado na tabela IX, os estudos apresentaram algumas diferenças quanto à dose de DXM utilizada, bem como quanto ao tempo de coleta de amostras após a administração da dose. Embora a maioria tenha utilizado a mesma dose empregada em nosso estudo, de 30 mg de DXM, nenhum dos autores utilizou o tempo de coleta de 4 horas após dose, sendo as coletas nos tempos de 2 ou 3 horas pós-dose mais comuns. É importante ressaltar que os níveis dos analitos podem variar consideravelmente dependendo do tempo de coleta, dificultando a comparação entre este e outros estudos.

Outro fator que foi alvo de discussões nesse estudo foi o uso da formulação de DXM em forma de xarope. A contaminação da boca e, conseqüentemente, da saliva das pacientes testadas em função da formulação líquida foi levantada como uma possível explicação para os níveis salivares mais elevados de DXM. Apesar disso, essa hipótese é pouco provável, uma vez que as pacientes foram solicitadas a lavar a boca com água imediatamente antes da coleta, além de ter sido adotado um tempo considerável entre a administração e a coleta (4 horas).

As $RM_{DXM/DTF}$ em saliva foram calculadas para cada uma das pacientes, a fim de classificá-las quanto ao perfil de metabolização. No estudo de Lutz et al. (2004), a fenotipagem de CYP2D6 foi feita em 170 voluntários sadios, dos quais 14 foram classificados como MP. O melhor ajuste obtido permitiu a identificação de dois grupos de metabolização, para os quais as RMs tiveram valores, em mediana, de 0,86 para ME e 211 para MP (tabela IX).

Em nosso estudo, o melhor ajuste obtido não permitiu a identificação de diferentes grupos de metabolização, sendo todas as pacientes classificadas como ME. No trabalho de Hou et al. (1996), também não foi possível a identificação de mais de um grupo de metabolização, o que pode ser explicado pela baixa frequência de PM na população chinesa (0 -3%).

Diferente da população chinesa, a população brasileira apresenta maiores valores de prevalência de MP. Um estudo realizado no sul do Brasil (n=97) envolvendo mulheres com câncer de mama em terapia com tamoxifeno mostrou uma incidência de 6,2% de MP (ANTUNES et al., 2012). Logo, era esperado em nosso estudo que, mesmo com o tamanho amostral limitado (n=53 pacientes), fosse possível identificar aproximadamente de uma a três pacientes MP.

Um fato importante a ser discutido é que duas das pacientes testadas nesse estudo apresentaram níveis de DTF em saliva abaixo do LIQ (1 ng/ml), sendo por isso excluídas

da análise. É possível que essas pacientes apresentem níveis não quantificáveis de DTF justamente pelo fato de apresentarem uma metabolização de DXM ineficiente, como ocorre em MP. Quando essas pacientes são incluídas na análise de distribuição de frequência (figura 13 (B)) é possível observar uma separação visual de grupos, onde hipoteticamente as pacientes MP estariam dispostas no lado direito do gráfico, as pacientes ME no centro, e as pacientes MUR ao lado esquerdo do gráfico.

Embora duas das pacientes tenham apresentado concentrações salivares de DTF abaixo do LIQ (1 ng/ml), a faixa de quantificação escolhida para o DTF condiz com àquelas descritas para os outros métodos. Com exceção do método de Lutz et al (2004), que apresentou a maior sensibilidade (LIQ de 0,26 ng/ml para DTF e DXM), os outros métodos apresentaram LIQ de DTF de 1 ng/ml (HOU et al., 1996; HU et al., 1998), 5 ng/ml (AMARATUNGA et al., 2016) ou 10 ng/ml (RODRIGUES et al., 2008), sendo maiores ou iguais ao LIQ do método desenvolvido.

Tabela 9 - Determinação de DTF e DXM em saliva humana em diferentes estudos

Autor, ano	População	N	T coleta	Dose	Conc. DTF* (ng/ml)	Conc. DXM (ng/ml)	RM
Presente estudo	Mulheres com câncer de mama	53	4 h	30 mg	6,6 (< 1 - 19,9)	418,4 (12,3 -3232)	4 - 383
Chen et al., 2017	Voluntários sadios	235	3 h	15 mg	NE	NE	5,24 (0,117 -250)
Rodrigues et al., 2008	Voluntários sadios	3	3 ou 6 h	30 mg	3 h: 2039 (6 - 2918) 6 h: 226 (106 -1073)	3 h: 225 (55 - 701) 6 h: 24 (9,9 -803)	NC
Lutz et al., 2004	Voluntários sadios	170	2 h	30 mg	(<0,26 - 39)	0,28 - 229	(0,03 –780)
Hou et al., 1991	Voluntários sadios	10	2 h	50 mg	média: 18,5	média: 8,1	média: 0,53
Hou et al.,1996	Pacientes com falha renal	100	3 h	30 mg	11 (< 1 - 50)	25 (< 1 -216)	NE

Legenda: Conc.- concentração; N- número amostral; NE- não especificado; NC- não calculado; RM- razão metabólica; T coleta- tempo de coleta pós-dose.

Nota: *Valores em mediana e/ou mínimo e máximo observado.

Fonte: A autora, 2017.

7 CONCLUSÃO

Um método simples e de fácil execução foi desenvolvido em CL-EM/EM para a quantificação de DXM e DTF em saliva humana. Este atendeu a todos os requisitos de validação, mostrando ser um método linear, seletivo, preciso e exato para a determinação dos compostos, além de apresentar resultados de estabilidade e de efeito matriz de acordo com os critérios de aceitação da ANVISA.

O método desenvolvido nesse estudo permitiu a quantificação simultânea de DTF e DXM em amostras de saliva de pacientes, e subsequentemente, a classificação fenotípica individual de CYP2D6, sendo seu uso recomendado em outros estudos similares ou na rotina clínica para a fenotipagem de CYP2D6.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, S. M. et al. Concordance between tramadol and dextromethorphan parent/metabolite ratios: the influence of CYP2D6 and non-CYP2D6 pathways on biotransformation. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 42, n. 1, p. 24–29, jan. 2002.
- AFSHAR, M.; ROUINI, M.-R.; AMINI, M. Simple chromatography method for simultaneous determination of dextromethorphan and its main metabolites in human plasma with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 802, n. 2, p. 317–322, 2004.
- AMARATUNGA, P. et al. Determination of Dextromethorphan in Oral Fluid by LC–MS–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 40, n. 5, p. 360–366, jun. 2016.
- ANTUNES, M. V. et al. Endoxifen levels and its association with CYP2D6 genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. *Therapeutic drug monitoring*, v. 34, n. 4, p. 422–431, ago. 2012.
- ANTUNES, M. V. et al. Development, validation and clinical application of a HPLC–FL method for CYP2D6 phenotyping in South Brazilian breast cancer patients. *Clinical biochemistry*, v. 47, n. 12, p. 1084–1090, ago. 2014.
- BERTILSSON, L. et al. Pharmacogenetic covariation of defective N-oxidation of sparteine and 4-hydroxylation of debrisoquine. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 17, n. 2, p. 153–155, fev. 1980.
- BERTILSSON, L. et al. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Molecular genetics of CYP2D6. British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 53, n. 2, p. 111–122, fev. 2002.
- BEVERAGE, J. N. et al. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 9, p. 2224–2231, set. 2007.
- BISOLTUSSIN®: bromidrato de dextrometorfano. Brasil: Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda., 2014. Bula de remédio.
- BORGES, S. et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clinical pharmacology and therapeutics*, v. 80, n. 1, jul. 2006.
- BRADFORD, L. DiAnne. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*, v. 3, n. 2, p. 229–243, mar. 2002.
- BRASIL. RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos. Agência Nacional de vigilância Sanitária, Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>
- BROUSSEAU, D. C. et al. The effect of CYP2D6 polymorphisms on the response to pain treatment for pediatric sickle cell pain crisis. *The Journal of Pediatrics*, v. 150, n. 6, p.

623–626, jun. 2007.

CAPON, D. A. et al. The influence of CYP2D6 polymorphism and quinidine on the disposition and antitussive effect of dextromethorphan in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 60, n. 3, p. 295–307, set. 1996.

CARACO, Y.; SHELLER, J.; WOOD, A. J. Pharmacogenetic determination of the effects of codeine and prediction of drug interactions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 278, n. 3, p. 1165–1174, set. 1996.

CHEN, R.; ZHENG, X.; HU, P. CYP2D6 Phenotyping Using Urine, Plasma, and Saliva Metabolic Ratios to Assess the Impact of CYP2D6*10 on Interindividual Variation in a Chinese Population. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, maio 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00239/full>>. Acesso em: 1 jul. 2017.

CHEN, S. et al. The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 60, n. 5, p. 522–534, nov. 1996.

CHOU, W. H. et al. Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 20, n. 2, p. 246–251, abr. 2000.

DAHL, Marja-Liisa. Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, n. 7, p. 453–470, jun. 2002.

DE KESEL, P. M. M.; LAMBERT, W. E.; STOVE, C. P. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 55, n. 2, p. 169–184, fev. 2016.

DE LEON, Jose. The crucial role of the therapeutic window in understanding the clinical relevance of the poor versus the ultrarapid metabolizer phenotypes in subjects taking drugs metabolized by CYP2D6 or CYP2C19. *Journal of clinical psychopharmacology*, v. 27, n. 3, p. 241–245, jun. 2007.

DONATO, J. L. et al. Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrorphan and doxylamine in human plasma by HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v. 899, p. 46–56, jun. 2012.

EBESHI, B. U.; OBODOZIE, O. O.; BOLAJI, O. O. Sensitive and selective reversed-phase high performance liquid chromatographic-UV spectrophotometric determination of dextromethorphan and its CYP2D6 mediated metabolite, dextrorphan in human urine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 2, p. 281–286, 2014.

EICHELBAUM, M. et al. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 16, n. 3, p. 183–187, set. 1979.

EICHELBAUM, M. et al. The genetic polymorphism of sparteine metabolism. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, v. 16, n. 5, p. 465–481, maio 1986.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY– EMA. Guideline on bioanalytical method validation. Londres, Reino Unido. Jul. 2011. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>

FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *European journal of clinical pharmacology*, v. 63, n. 4, p. 321–333, abr. 2007.

GAEDIGK, A. et al. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical pharmacology and therapeutics*, v. 83, n. 2, p. 234–242, fev. 2008.

GAEDIGK, Andrea. Complexities of *CYP2D6* gene analysis and interpretation. *International Review of Psychiatry*, v. 25, n. 5, p. 534–553, out. 2013.

GIESSMANN, T. et al. CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 75, n. 3, p. 213–222, mar. 2004.

GOETZ, M. et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 23, n. 36, p. 9312–9318, dez. 2005.

GOETZ, M. P.; AMES, M. M.; KAMAL, A. Tamoxifen Pharmacogenomics: The Role of CYP2D6 as a Predictor of Drug Response. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 83, n. 1, p. 160–166, jan. 2008.

GOGTAY, N. J. et al. Evaluation of cytochrome P450 2D6 phenotyping in healthy adult Western Indians. *Indian journal of pharmacology*, v. 46, n. 3, p. 266–269, jun. 2014.

HICKS, J. K. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Tricyclic Antidepressants. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 93, n. 5, p. 402–408, maio 2013.

HICKS, J. K.; SWEN, J. J.; GAEDIGK, A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Current drug metabolism*, v. 15, n. 2, p. 218–232, fev. 2014.

HOU, Z.-Y. et al. Determination of dextromethorphan metabolic phenotype by salivary analysis with a reference to genotype in Chinese patients receiving renal hemodialysis. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 59, n. 4, p. 411–417, abr. 1996.

HOU, Z.-Y. et al. Salivary analysis for determination of dextromethorphan metabolic phenotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 49, n. 4, p. 410–419, 1991.

HU, O. Y. et al. Novel single-point plasma or saliva dextromethorphan method for determining CYP2D6 activity. *The Journal of pharmacology and experimental*

therapeutics, v. 285, n. 3, p. 955–960, jun. 1998.

INGELMAN-SUNDBERG, Magnus. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal*, v. 5, n. 1, p. 6–13, 2005.

JOHNSON, J. A.; BURLEW, B. S. Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, v. 24, n. 3, p. 350–355, mar. 1996.

JONES, D. R. et al. Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 60, n. 4, p. 374–384, out. 1996.

JURICA, J. et al. Serum dextromethorphan/dextrorphan metabolic ratio for CYP2D6 phenotyping in clinical practice. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, v. 37, n. 4, p. 486–490, ago. 2012.

KELLER, G. A. et al. In vivo Phenotyping Methods: Cytochrome P450 Probes with Emphasis on the Cocktail Approach. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 14, maio 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/149836/article>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

KELLY, L. E. et al. More codeine fatalities after tonsillectomy in North American children. *Pediatrics*, v. 129, n. 5, p. e1343-1347, maio 2012.

KÉVORKIAN, J. P. et al. Assessment of individual CYP2D6 activity in extensive metabolizers with renal failure: comparison of sparteine and dextromethorphan. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 59, n. 5, p. 583–592, maio 1996.

KIRCHHEINER, J. et al. Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 28, n. 1, p. 78–83, fev. 2008.

KOREN, G. et al. Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet (London, England)*, v. 368, n. 9536, p. 704, 19 ago. 2006.

KUMAR, A. et al. UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v. 69, n. 3, p. 371–380, jun. 2012.

LENNARD, M. S. et al. Debrisoquine polymorphism and the metabolism and action of metoprolol, timolol, propranolol and atenolol. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, v. 16, n. 5, p. 435–447, maio 1986.

LOOS, W. J. et al. Simultaneous quantification of dextromethorphan and its metabolites dextrorphan, 3-methoxymorphinan and 3-hydroxymorphinan in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, n. 2, p. 387–394, jan. 2011.

LUTZ, U. et al. LC-MS/MS analysis of dextromethorphan metabolism in human saliva and urine to determine CYP2D6 phenotype and individual variability in N-demethylation and

glucuronidation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 813, n. 1–2, p. 217–225, 2004.

MADADI, P. et al. Pharmacogenetics of neonatal opioid toxicity following maternal use of codeine during breastfeeding: a case-control study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 85, n. 1, p. 31–35, jan. 2009.

MADADI, P. et al. Safety of codeine during breastfeeding: fatal morphine poisoning in the breastfed neonate of a mother prescribed codeine. *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien*, v. 53, n. 1, p. 33–35, jan. 2007.

MAHGOUB, A. et al. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet (London, England)*, v. 2, n. 8038, p. 584–586, set. 1977.

MASIMIREMBWA, C. et al. Phenotype and genotype analysis of debrisoquine hydroxylase (CYP2D6) in a black Zimbabwean population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 51, n. 2, p. 117–122, out. 1996.

MULLER, S. et al. Dextromethorphan abuse in adolescents: what can the pharmacists do?. *Medizinische Monatsschrift fur Pharmazeuten*, v. 37, n. 3, p. 95–100, mar. 2014.

NGUYEN, L. et al. Dextromethorphan: An update on its utility for neurological and neuropsychiatric disorders. *Pharmacology & therapeutics*, v. 159, p. 1–22, mar. 2016.

OPDAM, F. L. et al. Further characterization of a (1)(3)C-dextromethorphan breath test for CYP2D6 phenotyping in breast cancer patients on tamoxifen therapy. *Journal of breath research*, v. 9, n. 2, jun. 2015.

OZDEMIR, M. et al. Assessment of In Vivo CYP2D6 Activity: Differential Sensitivity of Commonly Used Probes to Urine pH. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 44, n. 12, p. 1398–1404, dez. 2004.

PAAR, W. D.; FRANKUS, P.; DENGLER, H. J. The metabolism of tramadol by human liver microsomes. *The Clinical Investigator*, v. 70, n. 8, p. 708–710, ago. 1992.

PARK, Y. H.; PETER KULLBERG, M.; HINSVARK, O. N. Quantitative Determination of Dextromethorphan and Three Metabolites in Urine by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 73, n. 1, p. 24–29, jan. 1984.

PEDERSEN, R.; DAMKIER, P.; BROSEN, K. Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: A population study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 77, n. 6, p. 458–467, jun. 2005.

POPE, L. E. et al. Pharmacokinetics of dextromethorphan after single or multiple dosing in combination with quinidine in extensive and poor metabolizers. *Journal of clinical pharmacology*, v. 44, n. 10, p. 1132–1142, out. 2004.

POULSEN, L. et al. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 60, n. 6, p. 636–644, dez. 1996.

PUBCHEM, Open chemistry database. US National Library of Medicine, 2017. Disponível

em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5360696#section=Top>> Acessado em 25 de julho de 2017.

PUNGLIA, R. S. et al. Pharmacogenomic variation of CYP2D6 and the choice of optimal adjuvant endocrine therapy for postmenopausal breast cancer: a modeling analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 100, n. 9, p. 642–648, maio 2008.

RODRIGUES, W. C. et al. Development and validation of ELISA and GC-MS procedures for the quantification of dextromethorphan and its main metabolite dextrorphan in urine and oral fluid. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 32, n. 3, p. 220–226, abr. 2008.

ROMANELLI, F.; SMITH, K. M. Dextromethorphan abuse: clinical effects and management. *Journal of the American Pharmacists Association : JAPhA*, v. 49, n. 2, p. e20- 5; quiz e26-27, abr. 2009.

SAMER, C. F. et al. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting. *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 17, n. 3, p. 165–184, jun. 2013.

SAMER, C. F. et al. The effects of CYP2D6 and CYP3A activities on the pharmacokinetics of immediate release oxycodone. *British Journal of Pharmacology*, v. 160, n. 4, p. 907–918, jun. 2010.

SCHROTH, W. et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA*, v. 302, n. 13, p. 1429–1436, 7 out. 2009.

SIDDOWAY, L. A. et al. Polymorphism of propafenone metabolism and disposition in man: clinical and pharmacokinetic consequences. *Circulation*, v. 75, n. 4, p. 785–791, abr. 1987.

SINGLETON, Christopher. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC–MS analysis. *Bioanalysis*, v. 4, n. 9, p. 1123–1140, maio 2012.

SLOAN, T. P. et al. Genetically determined oxidation capacity and the disposition of debrisoquine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 15, n. 4, p. 443–450, abr. 1983.

SOHN, D. R. et al. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 14, n. 3, p. 184–189, jun. 1992.

SPINA, E. et al. Relationship between plasma desipramine levels, CYP2D6 phenotype and clinical response to desipramine: a prospective study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 51, n. 5, p. 395–398, 1997.

STAMER, U. M. et al. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain*, v. 105, n. 1–2, p. 231–238, set. 2003.

STAMER, U. M.; STÜBER, F. Codeine induced respiratory depression in a child. *Paediatric Anaesthesia*, v. 18, n. 3, p. 272- 273; author reply 275-276, mar. 2008.

STREETMAN, D. et al. Dose dependency of dextromethorphan for cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) phenotyping. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 66, n. 5, p. 535–541,

nov. 1999.

STREETMAN, D. S.; BERTINO, J. S.; NAFZIGER, A. N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, v. 10, n. 3, p. 187–216, abr. 2000.

TAMMINGA, W. J. et al. An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP2D6 and CYP2C19. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57, n. 2, p. 143–146, maio 2001.

TAYLOR, C. P. et al. Pharmacology of dextromethorphan: Relevance to dextromethorphan/quinidine (Nuedexta(R)) clinical use. *Pharmacology & therapeutics*, v. 164, p. 170–182, ago. 2016.

TEH, L. K.; BERTILSSON, L. Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular Genetics, Interethnic Differences and Clinical Importance. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 27, n. 1, p. 55–67, 2012.

THE HUMAM METABOLOME DATABASE, HMDB 3.2, 2017. Disponível em <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB60552>> Acessado em 22 de agosto de 2017.

TOXICOLOGY DATA NETWORK – TOXNET. US National Library of Medicine, 2017. Disponível em <<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/125-71-3>> Acessado em 25 de julho de 2017.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Maio, 2001. Disponível em : <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>>

VINKS, A. et al. Sparteine metabolism in Canadian Caucasians. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 31, n. 1, p. 23–29, jan. 1982.

VORONOV, P.; PRZYBYLO, H. J.; JAGANNATHAN, N. Apnea in a child after oral codeine: a genetic variant - an ultra-rapid metabolizer. *Paediatric Anaesthesia*, v. 17, n. 7, p. 684–687, jul. 2007.

WILKINSON, Grant. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England journal of medicine*, v. 352, n. 21, p. 2211–2221, maio 2005.

WUTTKE, H. et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 72, n. 4, p. 429–437, out. 2002.

YANG, Y. et al. Sequencing the *CYP2D6* gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. *Pharmacogenomics*, v. 18, n. 7, p. 673–685, maio 2017.

YEH, G.-C. et al. Analysis of pharmacokinetic parameters for assessment of dextromethorphan metabolic phenotypes. *Journal of Biomedical Science*, v. 10, n. 5, p. 552–564, out. 2003.

YU, A.; HAINING, R. L. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both

CTP2D6 and CYP3A activities? *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, v. 29, n. 11, p. 1514–1520, nov. 2001.

ZANGER, U. M.; RAIMUNDO, S.; EICHELBAUM, M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 369, n. 1, p. 23–37, jan. 2004.

APÊNDICE A – CONCENTRAÇÕES DE DXM E DTF EM AMOSTRAS DE SALIVA

Pacientes	[] Dextrofano	[] Dextrometorfano	Razão metabólica
Amostra_ TMX_001	12,8	297	23,20
Amostra_ TMX_003	5,23	622	118,93
Amostra_ TMX_004	4,45	163	36,63
Amostra_ TMX_005	4,5	232	51,56
Amostra_ TMX_006	9,64	712	73,86
Amostra_ TMX_007	5,75	159	27,65
Amostra_ TMX_009	0,25	211	844,00
Amostra_ TMX_010	2,81	87,6	31,17
Amostra_ TMX_011	7,47	545	72,96
Amostra_ TMX_012	19,9	834	41,91
Amostra_ TMX_013	1,79	373	208,38
Amostra_ TMX_014	9,88	303,2	30,69
Amostra_ TMX_016	5,28	127	24,05
Amostra_ TMX_018	0,158	239	1512,66
Amostra_ TMX_019	10,16	1648	162,20
Amostra_ TMX_021	3,16	149	47,15
Amostra_ TMX_022	9,84	533	54,17
Amostra_ TMX_024	7,33	106	14,46
Amostra_ TMX_025	11,3	431	38,14
Amostra_ TMX_026	11,1	779	70,18
Amostra_ TMX_027	9,7	213	21,96
Amostra_ TMX_028	7,67	277	36,11
Amostra_ TMX_029	4,81	25,9	5,38
Amostra_ TMX_030	4,1	177,6	43,32
Amostra_ TMX_033	3,83	1200	313,32
Amostra_ TMX_035	7,32	31	4,23
Amostra_ TMX_036	1,99	25,1	12,61
Amostra_ TMX_037	5,99	458	76,46
Amostra_ TMX_038	18	265	14,72
Amostra_ TMX_039	5,86	743	126,79
Amostra_ TMX_040	9,76	888	90,98
Amostra_ TMX_041	5,88	379	64,46
Amostra_ TMX_042	2,9	236	81,38
Amostra_ TMX_043	1,8	133	73,89
Amostra_ TMX_044	3,08	12,3	3,99
Amostra_ TMX_045	16,8	632	37,62
Amostra_ TMX_046	3,62	137	37,85

Pacientes	[] Dextrofanano	[] Dextrometorfano	Razão metabólica
Amostra_ TMX_047	4,19	377	89,98
Amostra_ TMX_048	2,93	17	5,80
Amostra_ TMX_049	2,47	62,67	25,41
Amostra_ TMX_050	3,08	456	148,05
Amostra_ TMX_051	13	306	23,54
Amostra_ TMX_052	4,3	24,8	5,77
Amostra_ TMX_053	8,44	3232	382,94
Amostra_ TMX_055	4,33	198	45,73
Amostra_ TMX_057	5,46	76,7	14,05
Amostra_ TMX_058	9,59	125	13,03
Amostra_ TMX_059	2,52	320	126,98
Amostra_ TMX_064	3,53	57,8	16,37
Amostra_ TMX_066	5,27	421	79,89
Amostra_ TMX_067	2,18	105	48,17
Amostra_ TMX_070	4,79	979	204,38
Amostra_ TMX_073	7,53	648	86,06

APÊNDICE B- ARTIGO CIENTÍFICO PARA PUBLICAÇÃO

Determination of dextromethorphan and dextrorphan by LC-MS/MS in oral fluid for CYP2D6 phenotyping

Karine Souza Seba¹, Vitória Berg Catanni², José Carlos Saraiva Gonçalves³

Rosane Vianna-Jorge^{1,4,5}, Rita de Cássia Elias Estrela^{1,2,3}

1 National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2 Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ.;3 Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.; 4 Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 5 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Correspondence

R. C. E. Estrela

Adress

Email: ritaestrelamarins@yahoo.com.br

KEYWORDS: CYP2D6 phenotyping, Dextromethorphan, Probe drug, LC-MS/MS.

ABSTRACT

CYP2D6 is a metabolic enzyme and its activity varies according to factors like environment, genetic, drug interactions and disease determinants. CYP2D6 phenotyping with dextromethorphan is a useful approach to determine an individual metabolic activity and its procedure involves the use of an appropriate analytical method. The use of alternative matrices such as saliva can make phenotyping simpler, and favor its application in the clinical routine. The aim of this study was to develop and validate an analytical method in LC-MS/MS for dextromethorphan and dextrorphan quantification in human saliva. An aliquot of 200 μ l of saliva was required for analysis and samples were processed using protein precipitation with methanol. The method used a C18 phenyl column and mobile phase consisting of 10 mM ammonium formate buffer and acetonitrile, both acidified with 0.1% formic acid, in the proportions of 65:35 (v: v) and flow of 1 ml / min . The compounds were eluted using an isocratic system, and the retention times were 2.6 min , 3.6 min and 5min for DX, internal standard and DXM, respectively. The method was precise ($CV\% \leq 7.5$), accurate (EPR%: -13.6 to +8.8), and linear ($r \geq 0.997$) in the concentration ranges of 1-100 ng / ml for DX and 5-1000 ng / ml for DXM. In addition, the method presents good results for stability and matrix effect .The application of the method was demonstrated by the determination of DX and DXM in 53 saliva samples from women with breast cancer under treatment with tamoxifen. A dose of 30mg of DXM was administered and saliva samples were collected 3 h after dose. Salivary concentrations ranged from 12.3 to 3232 ng / ml for DXM and from <1 to 19.9 ng / ml for DX. The $MR_{DXM/DX}$ values were individually calculated for phenotype classification and ranged from 4 to 383. No patient with a poor metabolizer profile was identified in this study, all of which were classified as extensive metabolizers. The present method is suitable for the quantification of DTF and DXM in saliva and has demonstrated its viability in clinical routine for CYP2D6 phenotyping.

1. INTRODUCTION

Differences in drug response among patients are common, and factors like environment, genetic, drug interactions and disease determinants may play an important role on such variability(1). CYP2D6 is a cytochrome P-450 enzyme involved in the metabolism of many commonly used drugs (i.e. tricyclic antidepressants, neuroleptics, antiarrhythmics, β -blockers and others). It is already well established that CYP2D6 metabolic activity varies among individuals, mostly due to genetic differences (1), and that such metabolic variability correlates with drug concentrations, impacting on therapeutic efficacy and/or toxic events (2,3).

Assessing CYP2D6 phenotype has been a valuable strategy for therapeutic individualization since it helps to identify individuals that may benefit from drug change or dose optimization (2). Normally, individuals may be classified into four groups according to their CYP2D6 phenotype: poor metabolizers, intermediate metabolizers, extensive metabolizers and ultra-rapid metabolizers (1). However, inferring an individual CYP2D6 phenotype based on genotype data is challenging, in view of the huge number of genetic variants (4).

An alternative approach for assessing CYP2D6 phenotype is the direct measure of the metabolic ratio, by using a probe drug. This has proven to be a reliable strategy as it takes into account other influencing factors than just genetic (i.e. environmental and co-inducers or co-inhibitors) (5). A probe drug is administered to the individual and, subsequently, the metabolic ratio is calculated by dividing the concentration of the parent drug for the main metabolite in urine, plasma or oral fluid (5,6).

Dextromethorphan (DXM), an antitussive agent commonly used in clinical practice, is also a substrate for the polymorphic CYP2D6 enzyme and due to its safety and easy acquisition; it has been widely applied as a probe drug for CYP2D6 phenotyping. In humans, DXM is mainly metabolized by CYP2D6 through O-demethylation to its main metabolite dextropropranolol (DT) (7).

Most methods described in the literature for determination of DXM and DT use either human plasma (8–13) and/or urine (9,14–18) as the matrix of choice. Interestingly, alternative matrices as dried blood spot (19) or exhaled air in breath test (20) have been also reported. In addition, a few methods using oral fluid as matrix are also in use (12,16,17,21,22). However, most of them require either greater amounts of samples (up to 3ml) and/or longer and high-cost process of sample pretreatment. The aim of the present

study was to develop and validate an easy and rapid method for DXM determination in oral fluid that may be applied as a tool for CYP2D6 phenotyping.

2. EXPERIMENTALS

2.1 Chemicals and reagents

Dextromethorphan (d-3-Methoxy-N-methylmorphinan hydrobromide), Dextrorphan tartrate and Levalorphan reference standards were purchased from Sigma Aldrich® (St Louis, MO, USA). Acetonitrile, methanol, formic acid and ammonium formate were obtained from Tedia® Company Inc, USA. Water was purified and deionized using Elga USFilter system (Garden Grove, California, USA). Drug-free human oral fluid was obtained from volunteers and total volume was pooled and used for validation purposes.

2.2 Preparation of calibration standards and quality controls

Stock solutions for each analyte (1 mg/ml) and internal standard (1mg/ml) were prepared. Approximately 10 mg were accurately weighed and dissolved in 10 ml methanol. Analytes working solution (0.1 - 10 ug/ml) and internal standard working solution (0.25 ug/ml) were obtained by dilutions using methanol: water (50:50; v:v).

Calibration standards were prepared by adding to human oral fluid increasing amounts of dextromethorphan and dextrorphan. Standard curves were obtained in the concentration range of 5-1000 ng/ml for dextromethorphan and 1-100 ng/ml for dextrorphan. Three replicates of each concentration of the spiked oral fluid specimens were analyzed in the same run.

Quality control samples (QC) were prepared at four concentrations levels. Oral fluid blank samples were spiked to give concentrations of lower limit of quantification (LLOQ) (DXM 5ng/ml and DXT 1ng/ml), low (DXM 10ng/ml and DXT 2ng/ml), mid (DXM 450ng/ml and DXT 45 ng/ml) and high (DXM 800ng/ml and DXT 80ng/ml) concentration levels. All QC samples were prepared in one batch and stored at -20°C up to analysis.

The ability to dilute samples originally above the upper limit of quantification (ULOQ) was demonstrated by analyzing QC samples containing 3 times the concentration of the higher calibration sample. These samples were analyzed after a 4-fold dilution in blank human oral fluid.

2.3 Sample preparation

Oral fluid aliquots (200 ul) were spiked with a volume of 50 ul LVF working solution (250 ng/ml) and vortexed for 5s. Proteins were precipitated by adding 500 ul methanol to the samples and vortexed for plus 5 seconds. Samples were centrifuged for 20

minutes at 15000 x g, 4°C and 200 ul of supernatant were placed in microvials. Volumes of 20ul were injected for analysis.

2.4 Liquid chromatography mass-spectrometry

An Agilent HPLC system 1200 series was used, which was composed of quaternary pump, column oven, on-line degasser and autosampler (Agilent Technologies, CA, USA). Mobile phase, consisted of 10mM ammonium formate solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 0.1% formic acid, was pumped through a Zorbax Phenyl column (150 mm x 4.6mm; 5µm; Agilent technologies, CA, USA) using isocratic elution (65:35; v:v; solvent A: solvent B), at a flow rate of 1ml/min. The separation was performed at 20°C and the autosampler was thermostatted at 4°C. Total run time was 7 min. Autosampler needle was flushed for 40 seconds with a washing solution containing methanol: water: isopropanol (40:30:30; v:v:v), plus 0.1% triethylamine before each injection.

A triple-quadrupole mass spectrometry system from Applied Biosystems (AB MDS Sciex, Concord, Canada) API 3200 operating in the positive mode was used as a detector. For quantification, multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms were acquired and processed using Analyst® software (AB Sciex). APCI-MS/MS operating parameters and mass transitions are listed in table I.

2.5 Validation procedures

A full validation of the assay was performed according to Brazilian Health Surveillance Agency, RDC n° 27/2012 and FDA guidelines (24,25). The following parameters were evaluated: selectivity, linearity, precision, accuracy, carry over, matrix effect and stabilities (solution and matrix stabilities).

Selectivity was determined by analyzing blank oral fluid samples from eight different human donors to check for peaks that might interfere with the detection of the analytes or IS.

Linearity was determined by injection of samples at seven calibrations levels in triplicate (1, 5, 10, 25, 50, 75 and 100 ng/ml for DX and 5, 15, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml for DXM). Calibration curves were constructed by calculating the peak area ratios of the analytes and IS and plotting them with nominal concentrations. Curves were fitted by least-squares linear regression (weighting factor: $1/x^2$).

Intra- and inter-assay precisions and accuracies were assessed by analyzing five replicates of each of the QC samples at LLOQ, ULOQ, low, mid and high concentration level in three different days. Results for precisions were expressed in terms of coefficient of variation (CV%). Accuracies were calculated by comparing the nominal and obtained concentration, and results were expressed in terms of Relative Standard Error (RSE%).

Matrix effects were evaluated by analyzing six blank oral fluid samples obtained from individual donors. Blank samples were first processed and further spiked with DX, DXM and IS to reach the low and high QC levels. Peak areas of DX and DXM were compared to those obtained with solutions at each concentration levels by calculating the IS-normalized matrix factor for each sample. Results were expressed in terms of coefficient of variation (CV%).

Carry-over was investigated by the injection of three blank oral fluid samples, one before and two after the highest calibration standard. Peak area response in the blank sample at each expected retention time was compared to the peak area of the corresponding analyte at the LLOQ.

For each stability assay (apart from stock solution stability) we used for analysis low and high QC samples in five replicates. The stability of processed sample was evaluated by analyzing processed QC samples after leaving them in the autosampler for 13h at 4°C. Bench-top stability was determined by analyzing QC samples kept at room temperature for 3 hours before being processed for analysis. For evaluation of freeze and thaw stability, QC samples were analyzed immediately after preparation and by the end of three freeze-thaw cycles. For each freeze-thaw cycle, samples were frozen at -20°C for 24h, thawed and kept at room temperature for 1h until be taken to freeze again. On the third cycle, samples were thawed and processed for analyses.

Analytes and IS stabilities in stock solution were analyzed on T₀ (day 01) and after stored at 4°C for 13 days. Dilutions of freshly prepared stock (1mg/ml for DXM, DXT and IS) and working solutions (0,1ug/ml for DXM and DXT, 0,25ug/ml for IS) were made in methanol:water (1:1; v:v) prior to analysis for each day, to give concentrations of 50 and 10 ng/ml, respectively. Each level was analyzed in five replicates and results were obtained by comparing the mean of peak areas obtained on T₀ (day 01) and day 13 for DX, DXM or IS.

2.6 Study protocol for CYP2D6 phenotyping in saliva

A total of 53 patients on adjuvant hormonal treatment with tamoxifen were enrolled on the study. This study was approved by the Research Ethics Committees at the National Institute of Cancer (INCA) (hearing number: 126/09) and National School of Public Health (hearing number: 5240). Exclusion Criteria included the use of concomitant medication known to be moderate or strong inducers or inhibitors of CYP2D6 and/or have diabetes, liver or kidney diseases.

Each volunteer received a 30mg oral dose of dextromethorphan as a probe-drug for CYP2D6 phenotyping and four hours later a 1ml oral fluid sample was collected. The samples were centrifuged at 1000 g x min, 4°C for 20 min, frozen and stored at -20°C up to analysis. Volunteers were oriented to wash up the mouth with water immediately before collection.

2.7 Statistics

R (version 3.3.2) was used for statistical analyses. The logarithms of MR was analyzed using model-based clustering. Normal mixtures with one, two or three groups with unequal variances were fitted using maximum likelihood and EM algorithm. Bayesian information criteria (BIC) was used to compare the three fits.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chromatography and sample preparation

The present study attempted to develop a simple and alternative method for determining DXM and DXT in oral fluid samples using LC-MS/MS.

In our method, samples were processed using protein precipitation with methanol, which is simpler and more rapid when compared to liquid-liquid or solid phase extraction as described in other studies. Concerns regarding the use of protein precipitation include the low efficiency in the elimination of interferents and the dilution of the samples (23). However, none of these factors significantly interfered in the development of the method, probably due to the high sensitivity and selectivity of the LC-MS/MS technique. Volumes of 200 µl oral fluid were required for analysis, quite similar to those required in the studies of Lutz et al. (2004) and Rodrigues et al. (2008) (250 µl aliquots) (16,17), but much lower than other three methods described which require volumes up to 3 ml oral fluid (12,21,22).

The chromatographic separation was performed in C₁₈ phenyl column (150 mm x 4.6 mm x 5 µm) and mobile phase in isocratic elution mode, as also described in two other

methods (12,22). A baseline separation was observed for DT, DXM and IS, with good symmetry and resolution between the chromatographic peaks (figure 1).

In our method, the total run time was 7 minutes, lower than most methods documented for which run time was up to 13 minutes (12,16,22), but greater than the time required in the method of Amaratunga et al (2016) (4 minutes), which used Ultra High Performance Liquid Chromatography technique (UHPLC) (21).

3.2 Method validation

3.2.1. Selectivity, LLOQ and LOD

No peaks from endogenous compounds were observed at the drugs retention times in any blank oral fluids tested (n=8). All channels were simultaneously monitored and no selectivity issues were detected across the acquisition channels. The limit of detection (LoD) was determined by estimating the signal to noise ratios (S/N) of diluted LIQ samples. S/N values should be greater than 3. The LoD was 0,25ng/ml (S/R:4.5) and 0,5ng/ml (S/R: 6.5) for DX and DXM, respectively.

The lower limit of quantification was set by us at 1ng/ml for DX (S/N: 20) and 5ng/ml for DXM (S/N: 36).

3.2.2 Linearity

The calibration curves were linear in the concentration range of 1- 100ng/ml for DX and 5-1000ng/ml for DXM. The coefficient of determination among the four calibration curves were higher than 0,998 and 0,997 for DX and DXM, respectively. For both analytes, the CVs were all less than 8.3% and the accuracy ranged from 92.8% to 107.7%.

3.2.3 Precision and accuracy

The intra- and inter-assay accuracy and precision results are summarized in table II. The assay was both accurate and precise between runs and within runs for each level. The intra-assay and inter-assay deviation from the nominal concentration of QCs ranged between -13.6 to +8.8% and -9.6 to +5.7%, respectively (%RSE). The intra-assay precisions for QCs were all less than 7.5% on each three days of validation. The inter-day precision (%CV) for QCs ranged between 2.1 and 6.4%. The accuracy of measuring DXM and DXT in diluted samples was assessed and the deviation from the nominal values for

1:4 diluted samples were -6.1 and +5.4%, within the acceptance criteria ($\leq 15\%$), suggesting that samples exceeding the ULOQ may be diluted up to 4-fold and reanalyzed to fit within the concentration range.

3.2.4. Matrix effect and carry over

Results for matrix effect were within acceptance criteria for both analytes. The %CV between the area ratios for CQ low and CQ high were 10.2% and 7.1% for DX and 3.7% and 11.8% for DXM, respectively. No carry over was observed for either the analytes nor IS.

3.2.5. Stability in oral fluid and solution

Results of stability assays ranged from -3,3 to -14,3%-for processed sample, from: -11,9 to 1,3% for bench-top and from -12,5 to 2,1% for freeze and thaw cycles. All assayed concentration were within acceptance criteria ($\pm 15\%$ deviation from the nominal concentration), thus, DXM, DX and LVF were stable in all conditions tested for oral fluid stability. Analytes and PI were stable in stock solutions (methanol) and working solutions (methanol:water) for at least 13 days at 4°C, for which values ranged from -8,5 a 7,4%, within the acceptance criteria ($\pm 10\%$ deviation from the nominal concentration). Results of stability assays are summarized in table III.

3.3. Method application

The applicability of the assay was demonstrated by measuring the concentrations of DX and DXM in 53 oral fluid samples of patients on adjuvant hormonal therapy with tamoxifen (figure II). The mean values of concentration in oral fluid were 418.4 ng/ml (ranged from 12.3 to 3232 ng/ml) for dextromethorphan and 6.6 ng/ml (ranged < 1 to 19.9 ng/ml) for dextrorphan. Two patients had dextrorphan levels under the LIQ (1 ng/ml). Three patients had DXM concentration greater than the ULOQ (1000ng/ml), and had their samples reanalyzed after a 4-fold dilution.

MR_(DXM/DXT) values obtained ranged from 4 to 383. The distribution of the salivary metabolic ratios in a log scale is shown in Figure II. We failed to distinguish the groups of metabolization, probably due to a limited sample size.

4. CONCLUSION

Our validated assay is suitable for the simultaneous determination of DXM and DXM in oral fluid. The present method is linear, accurate, precise, selective and may be a good alternative for CYP2D6 phenotyping.

5. REFERENCES

1. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*. 2005 May 26;352(21):2211–21.
2. Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen Pharmacogenomics: The Role of CYP2D6 as a Predictor of Drug Response. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Jan;83(1):160–6.
3. Haufroid V, Hantson P. CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants. *Clin Toxicol Phila Pa*. 2015 Jul;53(6):501–10.
4. Hicks JK, Swen JJ, Gaedigk A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr Drug Metab*. 2014 Feb;15(2):218–32.
5. De Kesel PMM, Lambert WE, Stove CP. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping. *Clin Pharmacokinet*. 2016 Feb;55(2):169–84.
6. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007 Apr;63(4):321–33.
7. de Graan A-JM, Teunissen SF, de Vos FYFL, Loos WJ, van Schaik RHN, de Jongh FE, et al. Dextromethorphan As a Phenotyping Test to Predict Endoxifen Exposure in Patients on Tamoxifen Treatment. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 20;29(24):3240–6.
8. Antunes MV, Staudt DE, Raymundo S, de Oliveira V, Gossling G, Pirolli R, et al. Development, validation and clinical application of a HPLC-FL method for CYP2D6 phenotyping in South Brazilian breast cancer patients. *Clin Biochem*. 2014 Aug;47(12):1084–90.
9. Chen ZR, Somogyi AA, Bochner F. Simultaneous determination of dextromethorphan and three metabolites in plasma and urine using high-performance liquid chromatography with application to their disposition in man. *Ther Drug Monit*. 1990;12(1):97–104.
10. Eichhold TH, Greenfield LJ, Hoke II SH, Wehmeyer KR. Determination of dextromethorphan and dextropropranolol in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1997;32(11):1205–11.
11. Härtter S, Baier D, Dingemans J, Ziegler G, Hiemke C. Automated determination of dextromethorphan and its main metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and column switching. *Ther Drug Monit*. 1996;18(3):297–303.

12. Hu OY, Tang HS, Lane HY, Chang WH, Hu TM. Novel single-point plasma or saliva dextromethorphan method for determining CYP2D6 activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Jun;285(3):955–60.
13. Liu Y-J, Wu H-L, Nie J-F, Wang J-Y, Ouyang L-Q, Yu R-Q. Simultaneous determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in plasma samples using second-order calibration coupled with excitation-emission matrix fluorescence. *Anal Sci.* 2011;27(6):663–6.
14. Constanzer ML, Chavez-Eng CM, Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK. Determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human urine using high performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: A study of selectivity of a tandem mass spectrometric assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;816(1–2):297–308.
15. Ebeshi BU, Obodozie OO, Bolaji OO. Sensitive and selective reversed-phase high performance liquid chromatographic-UV spectrophotometric determination of dextromethorphan and its CYP2D6 mediated metabolite, dextrorphan in human urine. *Trop J Pharm Res.* 2014;13(2):281–6.
16. Lutz U, Völkel W, Lutz RW, Lutz WK. LC-MS/MS analysis of dextromethorphan metabolism in human saliva and urine to determine CYP2D6 phenotype and individual variability in N-demethylation and glucuronidation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;813(1–2):217–25.
17. Rodrigues WC, Wang G, Moore C, Agrawal A, Vincent MJ, Soares JR. Development and validation of ELISA and GC-MS procedures for the quantification of dextromethorphan and its main metabolite dextrorphan in urine and oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2008 Apr;32(3):220–6.
18. Zhang H, Fang Y, Li Y. RP-HPLC in determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine :Phenotype analysis of CYP2D6. *Acad J Second Mil Med Univ.* 2010;31(3):310–2.
19. Bosilkovska M, Déglon J, Samer C, Walder B, Desmeules J, Staub C, et al. Simultaneous LC–MS/MS quantification of P-glycoprotein and cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in DBS and plasma. *Bioanalysis.* 2014 Jan;6(2):151–64.
20. Opdam FL, Dezentje VO, den Hartigh J, Modak AS, Vree R, Batman E, et al. The use of the ¹³C-dextromethorphan breath test for phenotyping CYP2D6 in breast cancer patients using tamoxifen: association with CYP2D6 genotype and serum endoxifen levels. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Mar;71(3):593–601.
21. Amaratunga P, Clothier M, Lorenz Lemberg B, Lemberg D. Determination of Dextromethorphan in Oral Fluid by LC–MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2016 Jun;40(5):360–6.
22. Hou Z-Y, Pickle LW, Meyer PS, Woosley RL. Salivary analysis for determination of dextromethorphan metabolic phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 1991;49(4):410–9.
23. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC–MS analysis. *Bioanalysis.* 2012 May;4(9):1123–40.

24. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 27/05/2012: Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, 2012. Diário Oficial da União. <http://portal.anvisa.gov.br>

25. U.S. Food and Drug Administration – Centre for Drug Evaluation and Research – Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001, <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>>

Table I: LC-MS/MS operating parameters

Compound	Transition (m/z)	DP (V)	CE(V)
Dextromethorphan	272→147	46	39
Dextrorphan	258→157	51	47
Levalorphan	284→157	51	47

Subtitles: DP: Declustering potential; CE: Collision energy

Table II: Results of Intra- and Inter-assay accuracy and precision.

Analyte	Concentration (ng/ml)	Accuracy (RSE%)				Precision (CV%)			
		Intra-assay			Inter-assay	Intra-assay			Inter-assay
		Run 1	Run 2	Run 3		Run 1	Run 2	Run 3	
DXM	5	1,3	-1,9	-7,7	-2,6	2,3	2,3	4,7	4,9
	10	-6,5	-8,7	-13,6	-9,6	4,3	1,9	1,1	4,3
	450	8,4	5,8	2,9	5,7	0,8	2,0	1,2	2,5
	800	-1,4	-3,7	-6,3	-3,8	4,3	2,4	2,6	3,7
DX	1	-2,3	-6,0	-10,8	-6,9	7,5	4,1	3,3	6,4
	2	-3,3	-2,1	-4,1	-3,2	3,2	1,9	5,6	4,5
	45	-6,0	-5,5	-9,2	-6,9	0,9	1,1	1,5	2,1
	80	8,8	6,1	2,3	5,7	3,3	2,3	2,2	3,6

Subtitles: RSE: Relative standard error; CV: Coefficient of variation.

Table III: Results of stability assays

Assay	Condition	Compound	Nominal concentration (ng/ml)	Dev (%)		
Stability in solution	4°C, 13 days	DXM	10	-2,3		
			50	2,1		
		DTF	10	7,4		
			50	-3,7		
		LVF	10	1,5		
			50	-8,5		
Processed sample stability	4°C, 13h	DXM	10	-14,4		
			800	-8,8		
		DTF	2	-9,7		
			80	-3,3		
		Bench-top stability	25-30°C, 3h	DXM	10	-11,9
					800	-8,9
DTF	2			-1,3		
	80			1,3		
Freeze and thaw stability	3 freeze (-20°C) /thaw cycles	DXM	10	-12,5		
			800	-6,8		
		DTF	2	-3,2		
			80	2,1		

Subtitles: Dev: Deviation from nominal concentration.

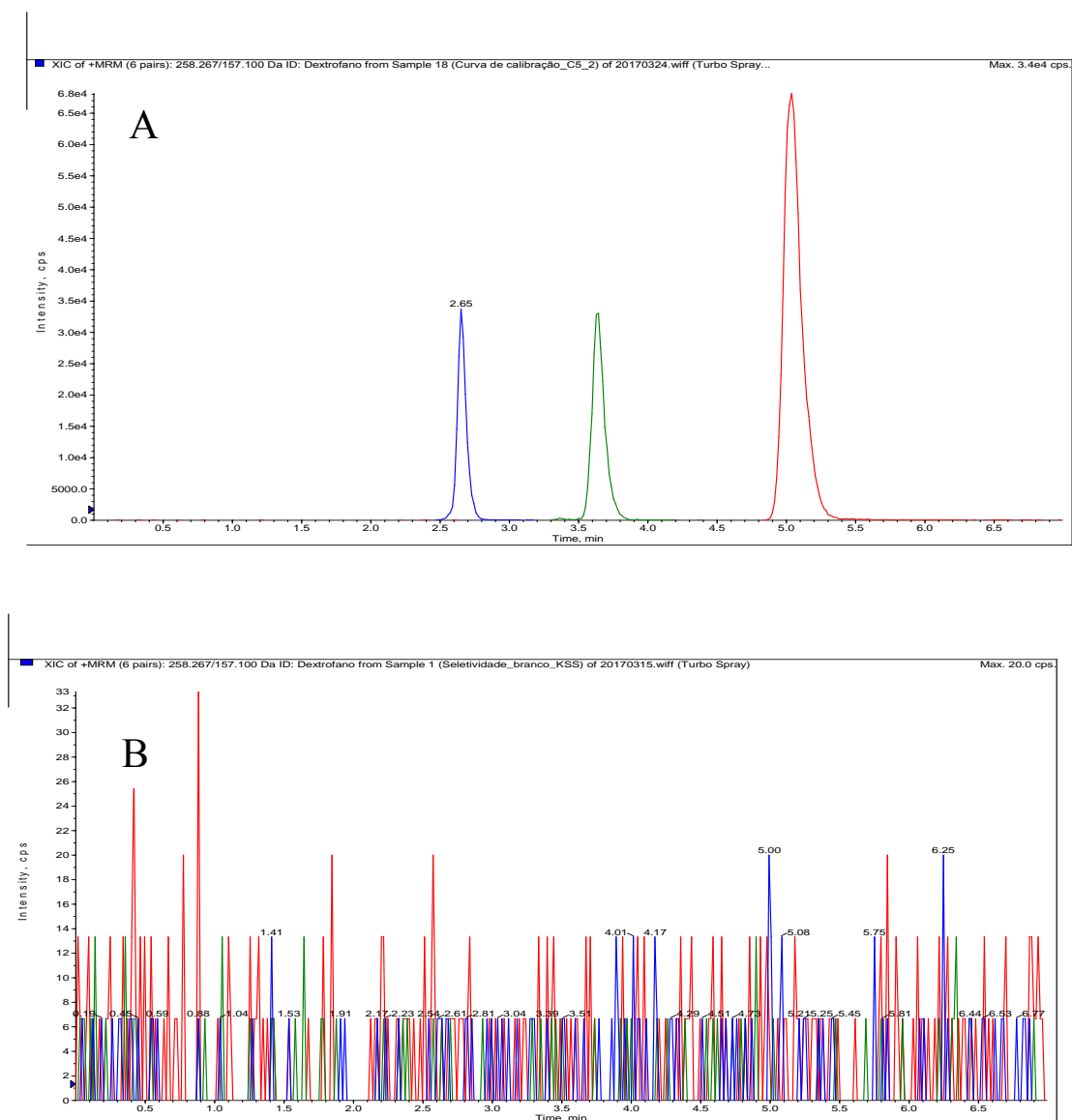


Figure I: (A) Chromatograms of a calibration sample (C5), showing the peaks corresponding to 50 ng/ml DX (RT: 2.6 min), IS (RT:3.6min) and 250 ng/ml DXM (RT: 5.0 min).(B): Blank oral fluid sample.

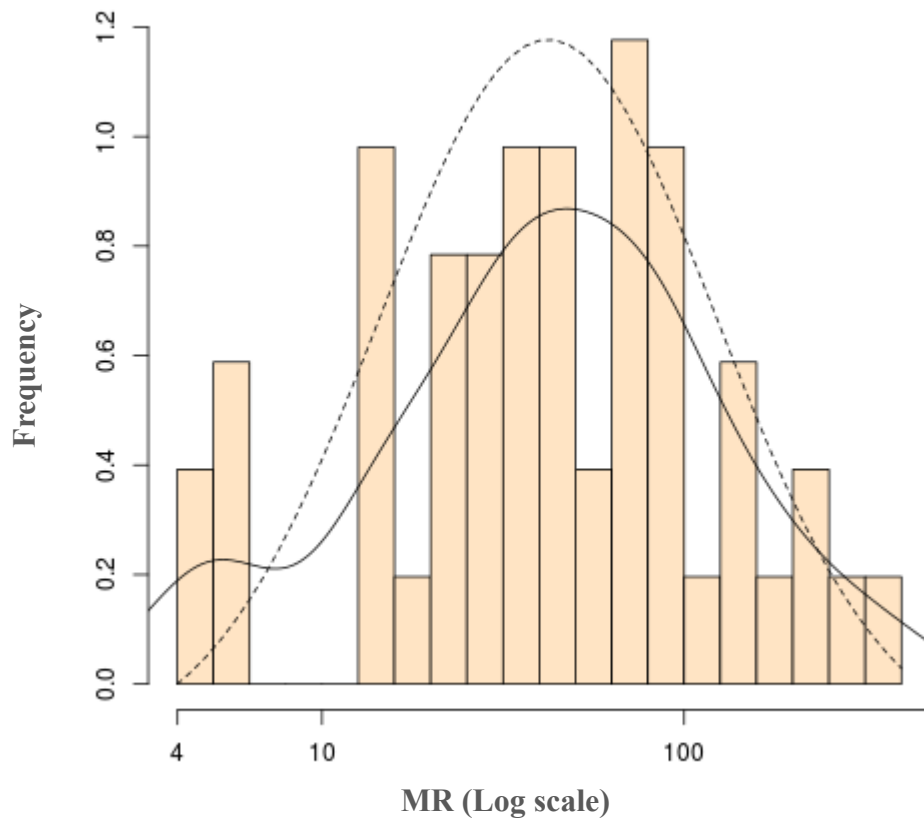


Figure II: Frequency distribution of metabolic ratios in log scale

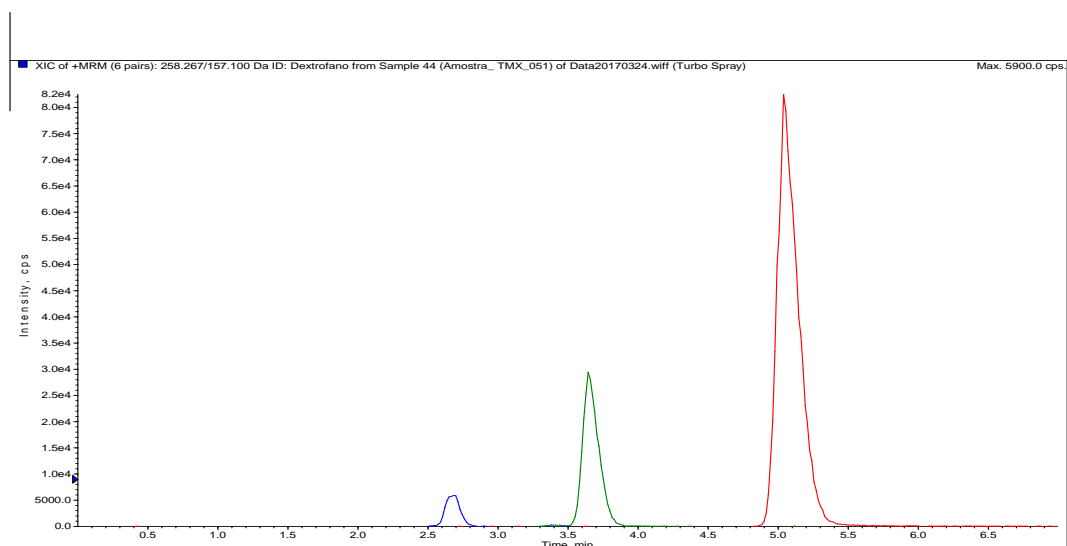


Figure III: Representative chromatogram of an extensive metabolizer patient showing chromatographic peaks of DX (13 ng/ml), LVF and DXM (306 ng/ml), respectively.

ANEXO - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

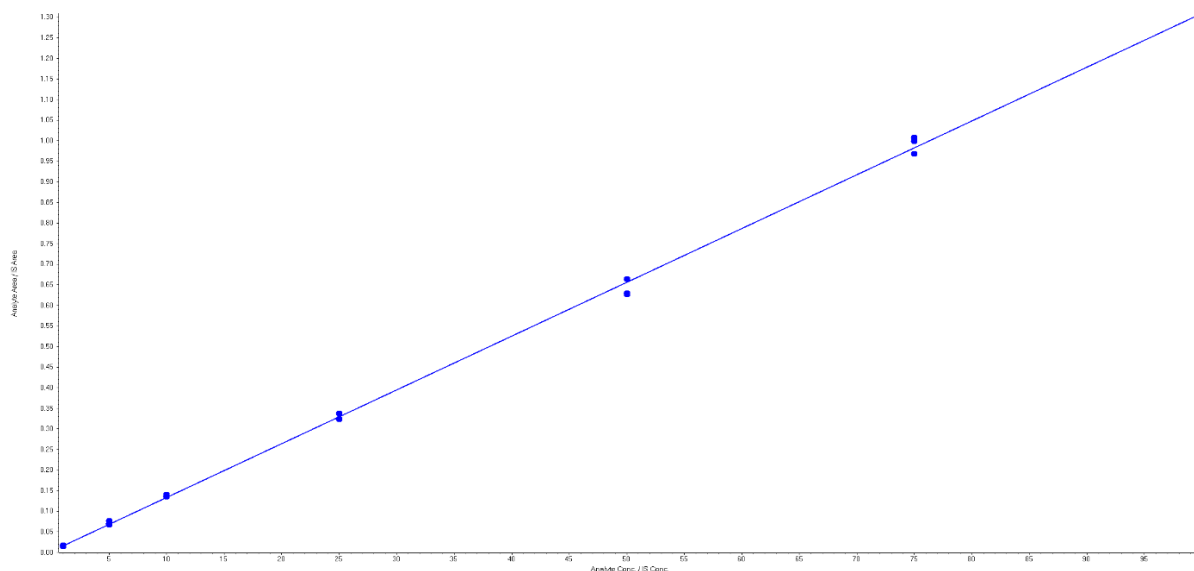
Analyte Name: Dextrorfano

Internal Standard: Levalorfano

Data File	20170319.wiff	Result Table	Dia01_revalidação_método saliva_19_03_2017.rdb
Acquisition Date	3/19/2017 4:07:27 PM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0131x + 0.00292$ ($r = 0.9984$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
1	3	0.99	98.7	0.08	8.1
5	3	5.27	105.4	0.33	6.2
10	3	10.34	103.4	0.18	1.7
25	3	24.92	99.7	0.60	2.4
50	3	48.76	97.5	1.59	3.3
75	3	75.70	100.9	1.57	2.1
100	3	94.41	94.4	1.29	1.4

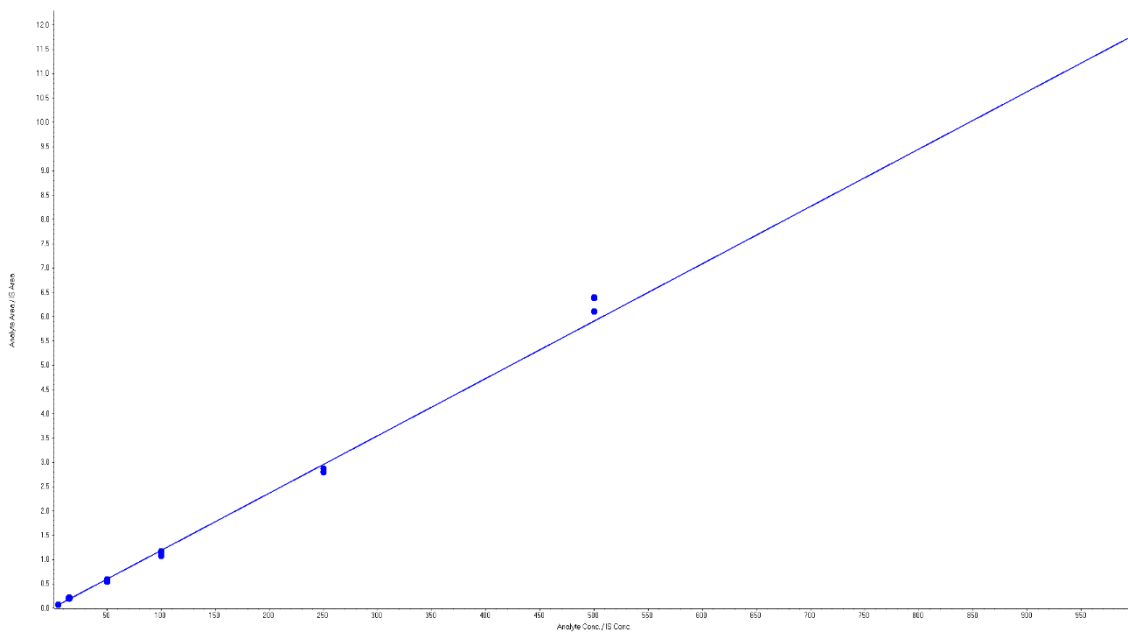


Analyte Name: Dextrometorfano **Internal Standard:** Levalorfano

Data File	20170319.wiff	Result Table	Dia01_revalidação_método saliva_19_03_2017.rdb
Acquisition Date	3/19/2017 4:07:27 PM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0118x + 0.00707$ ($r = 0.9978$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
5	3	4.96	99.2	0.14	2.9
15	2	16.08	107.2	0.03	0.2
50	3	47.46	94.9	2.28	4.8
100	3	94.30	94.3	3.82	4.0
250	3	238.42	95.4	3.14	1.3
500	3	532.79	106.6	13.62	2.6
1000	3	1048.66	104.9	6.76	0.6

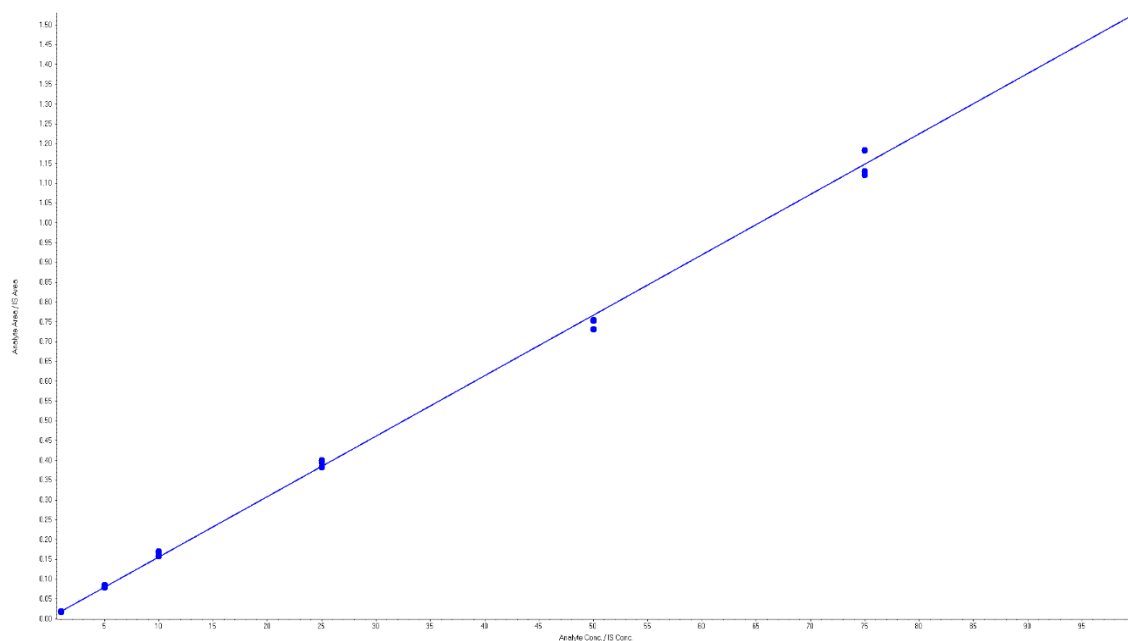


Analyte Name: Dextrorfanano**Internal Standard:** Levalorfanano

Data File	20170321.wiff	Result Table	Dia02_revalidação_métodosaliva_21_03_2017_esse.rdb
Acquisition Date	3/21/2017 3:29:25 PM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0153x + 0.00349$ ($r = 0.9986$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
1	3	0.99	99.0	0.06	6.2
5	3	5.10	102.1	0.20	4.0
10	3	10.60	106.0	0.39	3.7
25	3	25.46	101.8	0.55	2.2
50	3	48.66	97.3	0.84	1.7
75	3	74.75	99.7	2.18	2.9
100	3	94.07	94.1	3.08	3.3

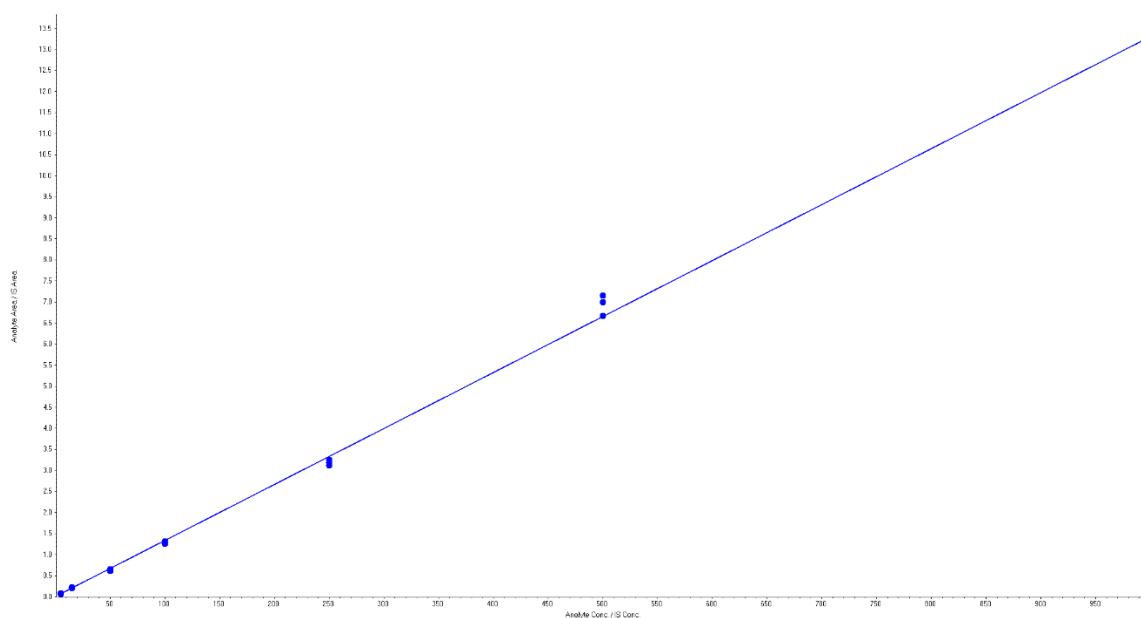


Analyte Name: Dextrometorfano**Internal Standard:** Levalorfano

Data File	20170321.wiff	Result Table	Dia02_revalidação_métodosaliva_21_03_2017_esse.rdb
Acquisition Date	3/21/2017 3:29:25 PM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0133 x + 0.00629$ ($r = 0.9979$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
5	3	4.95	99.0	0.38	7.7
15	3	15.76	105.1	0.62	3.9
50	3	47.38	94.8	1.60	3.4
100	3	96.81	96.8	1.97	2.0
250	3	238.92	95.6	4.94	2.1
500	3	521.42	104.3	18.16	3.5
1000	3	1044.77	104.5	39.81	3.8

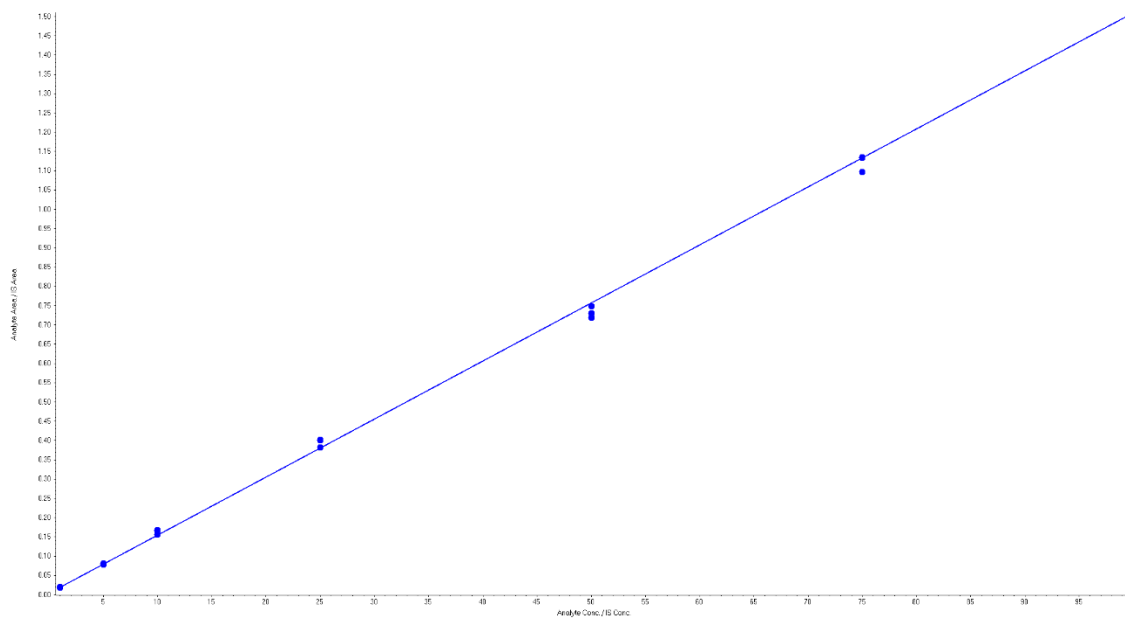


Analyte Name: Dextrorfano**Internal Standard:**Levalorfano

Data File	20170322.wiff	Result Table	Dia03_revalidação_métodosaliva_22_03_2017.rdb
Acquisition Date	3/22/2017 3:12:48 PM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0151x + 0.00412$ ($r = 0.9985$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
1	3	0.99	99.4	0.08	8.3
5	3	5.01	100.2	0.08	1.6
10	3	10.56	105.6	0.41	3.9
25	3	25.94	103.7	0.76	2.9
50	3	48.37	96.7	0.98	2.0
75	3	74.24	99.0	1.43	1.9
100	3	95.38	95.4	2.76	2.9

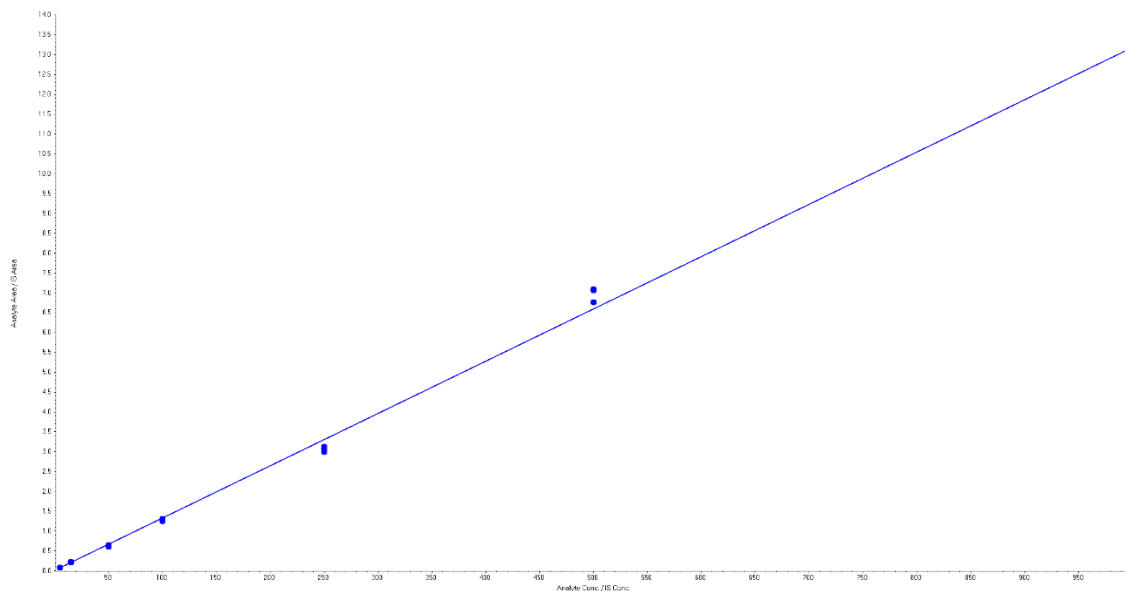


Analyte Name: Dextrometorfano**Internal Standard:** Levalorfano

Data File	20170322.wiff	Result Table	Dia03_revalidação_métodosaliva_22_03_2017.rdb
Acquisition Date	3/22/2017 3:12:48 PM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0132x + 0.0105$ ($r = 0.9976$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
5	3	4.95	99.1	0.10	2.0
15	3	15.82	105.5	0.16	1.0
50	3	46.62	93.2	1.12	2.4
100	3	96.78	96.8	1.97	2.0
250	3	232.02	92.8	4.91	2.1
500	3	528.61	105.7	13.62	2.6
1000	3	1069.09	106.9	31.38	2.9

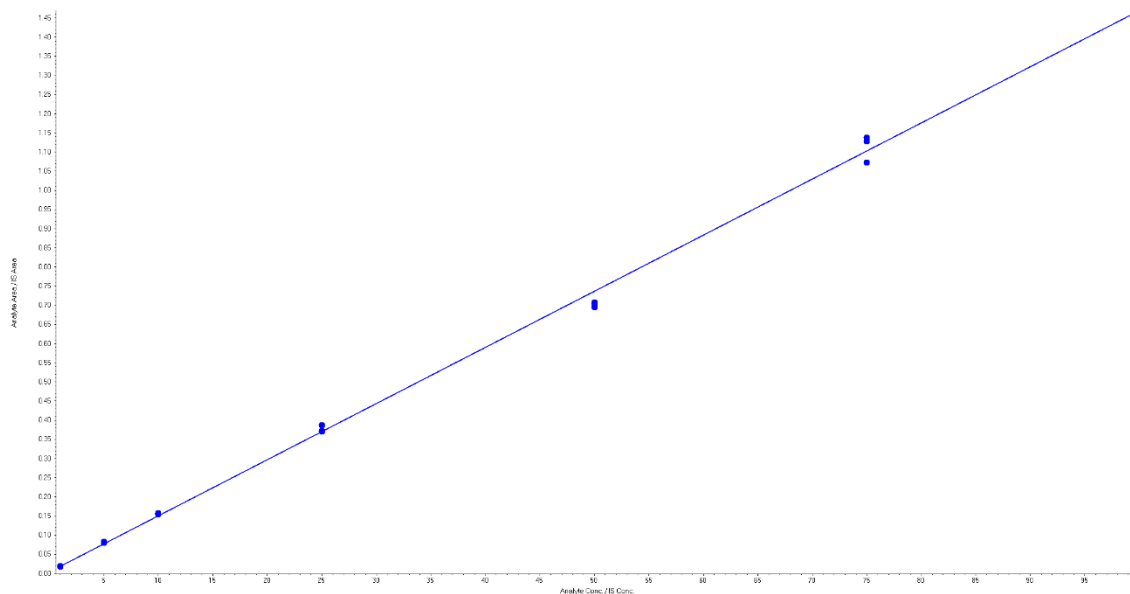


Analyte Name: Dextrorfan**Internal Standard:** Levalorfan

Data File	20170324.wiff	Result Table	Amostras_pacientes_saliva_24_03_2017.rdb
Acquisition Date	3/24/2017 10:47:18 AM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0147x + 0.00412$ ($r = 0.9985$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
1	3	0.98	98.4	0.03	3.2
5	3	5.33	106.7	0.11	2.0
10	3	10.39	103.9	0.11	1.1
25	3	25.40	101.6	0.62	2.4
50	3	47.69	95.4	0.46	1.0
75	3	75.68	100.9	2.40	3.2
100	3	93.18	93.2	1.64	1.8



Analyte Name: Dextrometorfano**Internal Standard:** Levalorfano

Data File	20170324.wiff	Result Table	Amostras_pacientes_saliva_24_03_2017.rdb
Acquisition Date	3/24/2017 10:47:18 AM	Algorithm Used	MQL
Acquisition Method	Método_DXT_DXM_saliva.dam	Instrument Name	API 3200
Project	FENOTIPAGEM TAMOXIFENO\2016_05_11		

Regression Equation: $y = 0.0121x + 0.00726$ ($r = 0.9973$)

Expected Concentration	Number of Values	Mean Calculated Concentration	% Accuracy	Std. Deviation	%CV
5	3	4.93	98.5	0.37	7.6
15	3	16.05	107.0	0.48	3.0
50	3	46.92	93.8	0.30	0.6
100	3	95.42	95.4	2.58	2.7
250	3	236.21	94.5	8.78	3.7
500	3	538.42	107.7	11.30	2.1
1000	3	1030.26	103.0	7.87	0.8

