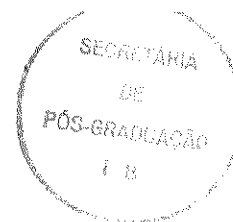


RONILSON AGNALDO MORENO



ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA COMPARADA DE DROGAS
(BIOEQUIVALÊNCIA), APLICAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES
METODOLOGIAS NA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS CIRCULANTES DE
FÁRMACOS.

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia
e Biofísica, Instituto de Biologia, da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Fisiologia e Biofísica

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Campinas - 1998

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Ronilson Agnaldo Moreno
e aprovada pela Comissão Julgadora.
6/9/98

09.30.2321
M815e

35494/RC

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	+UNICAMP
	M815e
V.	Ex.
TOMBO BC/	35494
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/10/98
N.º CPD	

CM-G011746B-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Moreno, Ronilson Agnaldo

M815e Estudos de farmacocinética comparada de drogas
(bioequivalência), aplicação de três diferentes metodologias na
determinação de níveis circulantes de fármacos / Ronilson Agnaldo
Moreno. -- Campinas, SP:
[s.n.], 1998.
143f.:ilus

Orientador: Gilberto de Nucci

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Biologia.

1. Farmacocinética. 2. Biodisponibilidade. 3. Medicamentos. I.
Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros titulares:

1. GILBERTO DE NUCCI _____

2. HEITOR MORENO JÚNIOR _____

3. JOSÉ PEDRAZZOLLI JÚNIOR _____

4. MIGUEL ARCANJO AREAS _____

5. ALEXANDRE PINTO CORRADO _____

Membros suplentes:

1. GUN BIRGITTA BERGSTEN MENDES _____

2. ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO _____

Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

Campinas, 18 de Setembro de 1998

Este trabalho eu dedico, tentando prestar uma justa homenagem, ao Prof. Dr. Ernesto José D'Ottaviano, o primeiro a estender a mão amiga e a mostrar que o homem pode evoluir através da ciência, sem contudo esquecer-se de ajudar aos que necessitam.

Agradeço a meus pais, Antonio e Aparecida, pelo apoio na minha formação.
Aos meus irmãos, Ronaldo, Ronaly e Renata, pela felicidade na infância e juventude.
À Márcia, Patrícia e Guilherme por manterem a chama da alegria acesa.

“O grande alquimista é aquele que consegue transformar uma alma envolta em brumas, a pedra bruta, numa alma iluminada, o verdadeiro ouro”.

AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo carinho e respeito durante os anos de convívio.

Aos docentes e amigos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia – UNICAMP, pela cordialidade e atenção dedicados.

Ao Professor Doutor Gilberto de Nucci, orientador e amigo todo o tempo, mostrando que a cada minuto algo novo pode ser descoberto e ensinado. Responsável maior por este, e tantos outros, trabalhos científicos.

Aos Professores Doutores Edson Antunes e Stephen Hyslop, pela constante colaboração e incentivo.

Ao Heitor Moreno Júnior ao Eduardo Abib Júnior e ao Renato do Rego de Araújo Faro, por serem meus amigos em todos os momentos.

Aos colegas que participaram dos trabalhos que originaram esta tese: Anicleto Poli, Cláudia, Evandro Luis Miranda, Heloisa Helena de Araújo Ferreira, José Luis Donato, Leonardo, Maria Lúcia Martins, Marcelo Nicolas Muscará, Pamela Lillana M. Gonzales e Wellington Ribeiro .

Aos colegas do Departamento, com os quais tenho mantido um relacionamento entremeado de trabalho e alegria: Aldete Zapellini, Cléber E. teixeira, Elen T. Landuci, Flávio R. Araújo Faro, Luciana Piovesan Nathan, Marta V. Medeiros, Soraia K. Pereira Costa, Simone Teixeira e Sisi Marcondes.

Aos funcionários da secretaria: Gislaine Elias Alipio, Maria Rita de Lima e particularmente a Maria da Dores Mangelo Ponciano (Dora) pelos inúmeros préstimos.

Aos funcionários, que de alguma maneira sempre participaram da minha vida acadêmica: Adilson José Thomáz, Antonio Vilson dos Santos, Gildo Bernardo Leite e Miguel Borges da Silva.

Aos voluntários que se apresentaram e confiaram no nosso trabalho, apesar das dificuldades pelas quais temos passado.

À CAPES, pelo apoio financeiro destinado aos nossos projetos.

ÍNDICE

Assunto	Página
Resumo	07
Lista de abreviações	10
1- Introdução Geral	11
2- Estudo de bioequivalência de duas formulações de ciclosporina	17
2.1 - Introdução	21
2.2 - Objetivos	21
2.3 - Materiais e Métodos	24
2.4 - Tabela de randomização	25
2.5 - Resultados	
3- Estudo de bioequivalência de duas formulações de lincomicina	27
3.1 - Introdução	30
3.2 - Objetivos	30
3.3 - Materiais e Métodos	32
3.4 - Tabela de randomização	33
3.5 - Resultados	
4- Estudo de bioequivalência de duas formulações de ambroxol	35
4.1 - Introdução	39
4.2 - Objetivos	39
4.3 - Materiais e Métodos	41
4.4 - Tabela de randomização	42
4.5 - Resultados	
5- Discussão e conclusões	44
6- Referências Bibliográficas	48
7- Summary	58
8- Anexo 1 - Gráficos com os valores individuais obtidos para o estudo de bioequivalência de:	61
- Ciclosporina	73
- Lincomicina	81
- Ambroxol	
9- Anexo 2 - Fichas (modelo) utilizadas durante de um ensaio clínico.	91
10- Trabalhos enviados/publicados	113

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar três ensaios de farmacologia clínica, determinando diversos valores farmacocinéticos e utilizando-os para comparar duas formulações (em cada ensaio) da mesma droga, com origens diferentes. Os parâmetros analisados para elaboração do parecer quanto a bioequivalência foram $AUC_{[0-12 (24) \text{ ou } (48) \text{ h}]}$ e C_{max} .

Foram utilizados três grupos de voluntários sadios para que se obter as informações. Cada estudo foi composto por dois grupos de voluntários que se alternavam passando por dois períodos de internação cada, portanto todos os voluntários receberam as duas formulações da droga em estudo, sempre respeitando um período de, no mínimo, duas semanas de intervalo entre as internações. Este período garantia a total eliminação de uma formulação antes da administração da próxima.

As drogas utilizadas foram: estudo 1- Ciclosporina solução oral a- ciclospor (Biosintética) e b- Sandimmun Neoral (Sandoz); estudo 2- Lincomicina cápsula, a- Lincomicina (abbott) e b- Lincocin (Upjohn) e estudo 3- Ambroxol cápsula, a- Ambril (Merck S.A.) e b- Ambroxol (Euderma SPA).

Cada estudo obedeceu a legislação nacional, seguindo sempre os padrões mundiais estipulados pela OMS e aqueles regulamentados pelo FDA. Os estudos foram realizados utilizando 24, 14 e 18 voluntários para ciclosporina, lincomicina e ambroxol respectivamente.

Todos os protocolos foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa ou ao órgão correspondente e aprovados antes de sua execução. Durante cada período de internação os voluntários receberam uma única dose de cada uma das drogas, obedecendo os seguintes critérios: 5 mg por kilo de peso corporal de cada uma das formulações de ciclosporina diluídas em suco de laranja ou leite achocolatado; uma cápsula contendo 75 mg de ambroxol de cada uma das formulações em estudo acompanhada, por um copo de água fresca; uma cápsula de lincomicina contendo 500 mg de cada uma das formulações em estudo, acompanhada por um copo de água fresca. Os voluntários receberam os medicamentos de forma randomizada e alternada dentro de cada estudo, permanecendo internados por período de 36 horas para avaliação imediatamente anterior e acompanhamento médico após a administração do fármaco em estudo. Foram coletadas amostras de sangue de forma seriada por período de tempo de 12 horas (lincomicina), 24

horas (ciclosporina) e 48 horas (ambroxol). Cada uma das amostras foi processada de forma a ter tal concentração determinada para a droga em estudo.

A metodologia adequada, de acordo com sensibilidade e especificidade, foi estabelecida para cada um dos estudos sendo que para dosagem de ciclosporina utilizamos o método de RIA para sangue total, o kit encontrado comercialmente possui Ac monoclonal altamente específico, necessitando apenas uma extração com etanol e incubação com a solução de trabalho, com posterior contagem em contador de radiação gama. Para a determinação dos níveis de ambroxol foi utilizado o sistema de HPLC. Após centrifugação procedeu-se a uma extração com tampão tetraborato de sódio (pH 9.0), dietil éter e ácido clorídrico e, posteriormente, hidróxido de potássio. em coluna (Nucleosil C18 10 μ 4.6 x 250 mm), com fluxo de 1.4 ml/min, tendo o eluente sido monitorado constantemente em comprimento de onda de 242 nm, o padrão interno foi obtido com bupivacaína. A determinação das concentrações plasmáticas de lincomicina foram obtidas através de ensaio biológico, utilizando meio de cultura BHI contaminado com bactéria (*Sarcina lutea*) até 0.4 AU em comprimento de onda de 550 nm, e posteriormente, diluído em agar para distribuição em placas de Petri. Após o resfriamento total e a formação do gel, foram realizados orifícios no meio e ali aplicadas as amostras de soro, previamente separada do sangue total, de cada paciente. O diâmetro do halo formado após incubação a 37°C por 24h foi medido e comparado com os de referência, obtendo-se assim os valores das concentrações de lincomicina.

A utilização de software adequado para cada ensaio clínico demonstrou claramente que:

- No estudo de farmacocinética comparada de duas formulações de ciclosporina em solução oral, há bioequivalência entre ambas.
- No estudo de farmacocinética comparada de duas formulações de lincomicina em cápsulas, não há bioequivalência entre ambas.
- No estudo de farmacocinética comparada de duas formulações de ambroxol em cápsulas, não há bioequivalência entre ambas.

LISTA DE ABREVIATÖES

- Ac Anticorpo
- Ag Antígeno
- AU Unidade de absorbância
- AUC Área sob a curva
- BHI Brain and Heart Infusion
- C_{max} Concentração máxima atingida por uma droga no plasma/sangue
- FDA Entidade administradora de alimentos e drogas
- Gama GT Gama glutamil transferase
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- HPLC Cromatografia líquida de alta performance
- K_e Constante de eliminação
- OMS Organização Mundial da Saúde
- RIA Radioimunoensaio
- T_{max} Tempo onde ocorre C_{max}
- USA Estados Unidos da América
- UV Ultravioleta

1- Introdução Geral

A necessidade do homem em atenuar o sofrimento decorrente de processos patológicos fez com que se desenvolvessem procedimentos e produtos com tal finalidade. Dentre estes produtos, denominamos medicamento às substâncias que ao serem administradas causarão um benefício maior que seu efeito adverso eventual. Os termos "drogas" ou "fármacos" também são usados para definir medicamentos de forma geral.

As drogas podem ser administradas por diversas vias (intravenosa, intramuscular, oral, retal, tópica, etc...), porém necessitam um período de tempo para que possam passar do local onde foram administrados para o espaço vascular (exceto quando administrada por via intravenosa). Este processo chama-se absorção, sendo fundamental para que o medicamento possa ser transportado ao local onde deverá agir para causar seu efeito. Aos mecanismos envolvidos com o transporte da droga chamamos "distribuição". Quanto mais lipossolúvel uma determinada droga for, mais facilmente atravessará as membranas celulares que se interpõem entre ela e seu local de ação, sobretudo quando fora do espaço vascular. Cabe principalmente ao fígado modificar as moléculas dos medicamentos, tornando-os menos lipossolúveis, rompendo suas moléculas, produzindo metabólitos, ou adicionando novos componentes, impedindo-os de saírem dos vasos e facilitando a sua eliminação do organismo. Ao processo de eliminação das drogas do organismo, damos o nome de excreção.

Farmacocinética é a parte da farmacologia que estuda os fenômenos envolvidos com absorção, biotransformação e excreção de drogas, enquanto a **farmacodinâmica** estuda o efeito de drogas, bem como os mecanismos pelos quais elas atuam.

O desenvolvimento cada vez maior de novas substâncias com potencial terapêutico, bem como a comercialização de produtos similares por diferentes empresas, tem estimulado novos métodos para seu controle de qualidade. Os ensaios clínicos tornaram-se importantes ferramentas para avaliar isolada ou de forma comparativa informações farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

O desenvolvimento e regulamentação de ensaios clínicos tornaram-se reconhecidamente mais importantes a partir da década de 50, quando passaram a ser conduzidos de acordo com os interesses científicos e éticos.

Em 1753 Lind planejou e desenvolveu um dos primeiros ensaios clínicos de que se tem notícia. Em seu trabalho, utilizou 12 pacientes portadores de escorbuto, dividindo-os em grupos e tratamentos diferentes. Louis (1835) executou importante estudo, demonstrando que a terapia de sangria quando efetuada para tratamento de pneumonia (78 casos), erisipela (33 casos) e inflamação de garganta (23 casos), não causa qualquer benefício quando comparado ao grupo controle. Este resultado foi fundamental para o fim de tal prática. Sutton (1865) realizou o primeiro trabalho descrito com o uso de placebo como controle e demonstrou a tendência natural de cura em alguns casos de febre reumática. Holmes (1891) indicou a necessidade de progressos nas pesquisas clínicas dos Estados Unidos para diminuir a incidência de auto medicação num público que 'insiste em ser envenenado'. Em 1915, Greenwood e Yale demonstraram a importância da distribuição dos pacientes em grupos para a validação de resultados. Fergusson e colaboradores em 1927 foram, provavelmente os primeiros a introduzir o conceito de "cego" aos estudos clínicos, fazendo testes com vacinas.

Na década de 30 as principais áreas geradoras de ensaios clínicos eram as sulfonamidas e as drogas anti - maláricas. Colebrook e Perdie (1937) mostraram uma redução de na mortalidade de 22 para 8% com o uso de sulfonamidas na febre pós - parto, quando comparado com o grupo de controle, pelo histórico de pacientes tratados no mesmo hospital.

A descoberta da penicilina pode ser considerada o mais importante avanço terapêutico do século vinte, levando a elaboração de um ensaio clínico com grande número de pacientes e médicos colaboradores, que teve lugar no norte da África, porém com os primeiros resultados, os médicos passaram a utiliza-la em pacientes mais graves do que aqueles propostos, quase prejudicando o resultado final do estudo.

É geralmente aceito que o primeiro ensaio clínico com um grupo de controle aleatório (randomizado) foi realizado para a estreptomicina, em tratamento de tuberculose pulmonar. Este ensaio foi notável pelo grau de cuidado no planejamento, execução e relato, traços desejados nos ensaios

clínicos atuais. Vários centros foram utilizados, bem como a distribuição aleatória para o tratamento, sendo os grupos divididos em tratados com a droga e repouso e apenas repouso, feito com envelopes lacrados, as radiografias avaliadas por três médicos de forma independente e sem conhecimento prévio de outros laudos e do tratamento aplicado ao paciente. Os resultados validaram amplamente o uso de estreptomicina. Outro estudo, por sua vez, demonstrou que o uso de anti histamínicos no tratamento da gripe não apresenta vantagens ao ser comparado com o placebo. Neste estudo foi introduzido o duplo cego, onde nem médico nem paciente tinham conhecimento prévio sobre a formulação administrada.

Sir Austin Bradford Hill foi o principal pesquisador envolvido com ensaios clínicos no "Medical Research Council", tendo organizado vários estudos clínicos e publicado diversos artigos sobre condução destes protocolos, demonstrando a importância da escolha dos pacientes, randomização, avaliação objetiva e análise estatística.

Segundo Bull (1959), os motivos que retardaram o progresso dos ensaios clínicos foram "reverência à autoridade, relacionamento entre médico e paciente, poucos registros, falta de facilidades para investigação e falta de remédios ativos". A razão mais importante para o desenvolvimento de novos estudos foi a crescente preocupação com o tratamento de doenças não transmissíveis.

A indústria farmacêutica sofreu uma enorme expansão nos últimos 40 anos, e com isso novas drogas tem sido descobertas e sintetizadas desde então. Antes da II guerra mundial não havia qualquer controle para que uma droga pudesse ser livremente comercializada. Contudo nos Estados Unidos já existia, desde 1938, legislação para uso de drogas em animais. Foi apenas na década de 60, com a catástrofe da talidomida, que tanto os Estados Unidos como a Inglaterra, intensificaram as regulamentações para execução de ensaios em humanos. A partir de 1963 tem sido obrigatória a aprovação oficial para a droga entrar para um ensaio clínico e posteriormente nova aprovação para ser comercializada no Reino Unido. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration), desenvolveu e aplicou diretrizes a partir da década de 70 para a elaboração de um modelo seguro de pesquisa clínica, seguido por muitos outros países, diferindo do modelo britânico,

principalmente por valorizar sobremaneira a documentação dos dados obtidos.

É, sem dúvida, verdadeira a afirmação de que hoje se faz mais ensaios clínicos do que em outras épocas, sendo em sua grande maioria financiados pela própria indústria farmacêutica. Na última década tem se investido principalmente em três linhas de drogas, as de ação anti infecciosa, as que atuam no sistema nervoso central e as ativas sobre o sistema cardiovascular. Apenas uma em dez mil drogas sintetizadas atinge a fase de ensaio clínico, isso explica por que é gasto mais com ensaios pré clínicos do que com clínicos. Além disso, apenas cerca de 20% destas serão geralmente comercializadas. Todo este processo gasta cerca de 7 a 10 anos para colocar uma droga nova no mercado, com um custo estimado de 54 milhões de dólares (HANSEM, 1976).

No Brasil houve um grande salto tanto qualitativo quanto quantitativo nos trabalhos científicos relacionados à farmacologia clínica com o surgimento da Unidade de Farmacologia Clínica "Miguel Servet", que foi idealizada e montada a partir do início de 1990 e, desde então, vem realizando diversos estudos envolvendo ensaios clínicos inclusive de fase I e toxicológicos.

Os ensaios clínicos são classificados dentro de quatro grupos, chamados fases. Estas quatro fases são uma diretriz geral de como os programas de pesquisa para um novo tratamento poderiam se desenvolver.

Ensaio clínico de fase I

Tem como principal objetivo ter conhecimento sobre toxicidade da droga e não, particularmente, eficácia. Usualmente são utilizados voluntários sadios. O primeiro objetivo é determinar uma dosagem única aceitável da droga, ou seja, o quanto de determinada droga pode ser administrado a um indivíduo sem causar efeitos colaterais severos. Tal informação é geralmente obtida com escalonamento de doses. A fase I envolve também estudos de biodisponibilidade e metabolismo da droga. Posteriormente estudos com múltiplas doses serão empregados para determinar um programa apropriado de doses para a fase II.

Ensaio de fase II

São geralmente em pequena escala, determinando eficácia e segurança de uma droga, requer monitoramento junto a cada paciente. Os ensaios de fase II servem como um processo de separação, para selecionar as drogas com real potencial terapêutico das inativas ou tóxicas.

Ensaio de fase III

Este ensaio envolve a avaliação em escala completa de tratamento após uma droga ter mostrado ser inegavelmente eficaz, sendo essencial a sua comparação com outros eventuais tratamentos. Para alguns pesquisadores o termo ensaio clínico se refere especificamente a fase III, que é mais rigoroso e extenso tipo de investigação clínica científica de um novo tratamento.

Ensaio de fase IV

Após o principal programa de pesquisas para a droga ser aprovada para comercialização, resta ainda investigações referentes a efeitos adversos e adicionais de larga escala, além de efeitos tardios de morbidade e mortalidade. Os ensaios clínicos com objetivo de investigar a bioequivalência entre duas drogas é considerado como fase IV por tratar-se de estudo pós comercialização.

Conceitos e definições

Farmacocinética - Parte da farmacologia encarregada de estudar os fenômenos envolvidos nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um medicamento. O comportamento farmacocinético de uma nova droga é, normalmente, determinado em animais antes de ser utilizado em humanos. Os testes em animais de laboratório seguem até o ponto em que se faz necessário obter resultados em experimentos clínicos envolvendo seres humanos, pois existem variações nos parâmetros farmacocinéticos quando comparamos resultados obtidos em animais e em humanos.

Biodisponibilidade - refere-se à quantidade de determinada droga, encontrada no sangue após sua absorção do local onde foi administrada. Os valores de concentração no sangue para uma droga administrada por via oral quando comparados com os valores da mesma droga administrada por via

intravenosa nos o parâmetro conhecido como biodisponibilidade absoluta, quando a comparação é feita com outra droga, chamada de padrão administrada pela mesma via, chamamos de biodisponibilidade relativa. Diversos fatores relacionados com a droga em teste - meia vida, indução enzimática, sinergismo - ou com o paciente - idade, sexo, jejum, uso de outros medicamentos - podem causar importantes alterações na biodisponibilidade.

C_{max} - Pico de concentração da droga no sangue, referindo-se ao valor máximo atingido pela droga após sua administração.

t_{max} - Tempo no qual ocorre o pico de concentração da droga no sangue após sua administração

AUC - Área sob a curva de concentração numa unidade de tempo. Enquanto C_{max} e t_{max} são obtidos apenas montando-se o gráfico das dosagens da droga, a AUC pode ser determinada utilizando-se a regra da soma dos trapézios.

Bioequivalência - Duas drogas são consideradas equivalentes farmacêuticos quando possuem os mesmos ingredientes ativos e são idênticas quanto a formulação e via de administração. Para que possam ser consideradas bioequivalentes devem apresentar taxa e extensão de absorção do princípio ativo, bem como excreção dentro de limites aceitos por estatística adequada.

Utilizando as informações farmacocinéticas obtidas através de métodos específicos e de acordo com protocolo clínico adequado objetivamos realizar três ensaios clínicos de bioequivalência, para ciclosporina, lincomicina e ambroxol respectivamente.

2- Estudo de bioequivalência de duas formulações de ciclosporina – solução oral - em voluntários sadios.

2.1- Introdução

Os procedimentos envolvendo transplantes de órgãos sempre tiveram como obstáculo para seu sucesso a rejeição que o órgão transplantado poderiam causar ao paciente receptor. Embora, já nas décadas de 50 e 60 existissem métodos para levar o paciente a um estado de imuno supressão, foi com a descoberta da ciclosporina e sua ação mais seletiva que a sobrevida dos pacientes portadores de transplantes foi prolongada, melhorando também sua qualidade (BOREL et al, 1976).

A ciclosporina é um polipeptídeo cíclico obtido primariamente como metabólito em culturas dos fungos: *Tolypocladium inflatum*, *Trichoderma polysporum* e *Cylindrocarpon ilucidivum*, tendo sido posteriormente sintetizada. Composta por onze aminoácidos (R-(R1R-(E)-cíclico-(L-alanil-D-alanil-N-metil-L-leucil-N-metil-L-leucil - N - metil - L - vanil - 3 - hidroxil - N,4 - dimetil - L - 2amino - 6 - octenoil-L- α -aminobutiril-N-metilglicil-N-metil-L-leucil-L-valil-N-metil-L-leucil), com fórmula química $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$, peso molecular de 1202 daltons (TUTSCHKA, 1982a,b). Foi descoberta em 1976 por Borel e colaboradores, tendo como principal característica seu efeito imuno supressor que em animais prolonga a sobrevida após transplante de pele, coração, rim, pâncreas, medula óssea, intestino delgado e pulmão potente (BOREL et al, 1976; BOREL, 1983).

Apenas por razões práticas foi proposto que a estrutura correspondente a Ciclosporina A fosse chamada de Ciclosporina, enquanto que os outros metabólitos fungícos semelhantes. Ciclosporinas B,C,D e E (WENGER, 1983) passaram a ter nomenclatura de acordo com a dos peptídeos

Existe uma grande variação entre indivíduos com relação a biodisponibilidade da ciclosporina, bem como do tempo para se atingir o pico da concentração no sangue, sendo esta, em média, de 3,8 horas. Tais variações se devem a fatores como tempo de esvaziamento gástrico, alteração da motilidade gastro intestinal e quantidade de secreção pancreática (KAHAN, 1989).

Absorção, Metabolismo e excreção - A ciclosporina tem absorção oral variável (35-45%). A média de biodisponibilidade sistêmica é 30% (20-50%) (BEVERIDGE et al, 1981; VON AHSEN et al, 1997), sendo que da plasmática, 33-43% estão ligadas à fração HDL, 21-28% à fração LDL e 12-19% à fração VLDL do colesterol (SGOUTAS et al, 1986). O pico de concentração plasmática é obtido 2-4 horas após administração oral. A depuração plasmática da droga é bifásica com meia vida de eliminação de 1-2 horas (fase α) e 27 horas (fase β). A absorção de preparações orais é extremamente reduzida em pacientes com distúrbios gastrointestinais e sua depuração plasmática pode ser afetada por diversas interações medicamentosas.

Estudos em animais e humanos mostram razões entre tecido e sangue variando de 2-10hs após administração oral e intravenosa. Níveis elevados ocorrem no fígado, rim e glândulas endócrinas (adrenais, pâncreas, timo e tireóide), assim como nos linfonodos, baço e medula óssea. Níveis menores do que o sangüíneo ocorrem somente nos músculos e cérebro (NIEDERBERGER et al, 1983). No sangue, 60% está ligada aos glóbulos vermelhos, 10% aos leucócitos e 30% às lipoproteínas plasmáticas (WOOD et al, 1983). A ciclosporina é excretada no leite materno.

A ciclosporina é convertida pelas isoenzimas da família do citocromo P-450, preferencialmente pela sub-família 3A hepático em metabólitos com maior polaridade e que preservam a estrutura cíclica (BERTAULT-PERES et al, 1987). O primeiro passo na biotransformação da droga é a hidroxilação no aminoácido 1, seguida desmetilação do aminoácido 4 ou formação intramolecular do éter tetrahydrofurano no aminoácido 1. O segundo passo combina reações de desmetilação e hidroxilação (RYFFEL et al, 1988), gerando pelo menos doze metabólitos que são excretados predominantemente pela bile nas fezes (MAURER AND LAMAIRE, 1986). A administração conjunta de drogas que interferem com o sistema do citocromo P-450 podem afetar o metabolismo da ciclosporina (KAHAN and GREVEL, 1988; CHEN et al, 1994). Drogas que inibem o citocromo P-450 como metil prednisona, contraceptivos orais e eritromicina aumentam os níveis circulantes de ciclosporina, enquanto drogas como fenobarbital e carbamazepina, que são indutores do citocromo P-450, diminuem as concentrações de ciclosporina no sangue.

Toxicologia - A ciclosporina A não apresenta potencial teratogênico ou mutagênico quando administrada em doses terapêuticas imunossupressivas em camundongos, ratos e cães. Toxicidade fetal e embrionária foi observada somente com doses muito altas, sendo tóxicas também para mãe destes animais (RYFFEL, 1982) .

Assim, como ocorre com outras drogas imunossupressoras há um aumento da incidência de linfomas em receptores de transplante humano que recebem ciclosporina A exclusivamente, ou em combinação com outras drogas imunossupressoras, quando comparados com uma população não imunossuprimida. Há evidências de que isto seja uma consequência da diminuição da vigilância imune devido a imunossupressão (PENN, 1983) .

Diversos estudos indicam que a ciclosporina inibe o desenvolvimento das reações imuno-celulares. O efeito imuno supressor da ciclosporina resulta da sua ação sobre os linfócitos T (LILLEHOJ et al, 1984), de onde tem origem a resposta imunológica ao tecido transplantado. A ciclosporina atua bloqueando a produção e a resposta a interleucina 2 (IL-2), uma linfocina produzida pelos linfócitos T (LILLEHOJ et al, 1984; ELLIOT et al, 1984). As linfocinas são fatores solúveis secretados por linfócitos e monócitos para estimular outras células, regulando a resposta a órgãos transplantados. IL-2 promove expansão de clones de linfócitos quando ativado pelos antígenos do tecido transplantado. A ciclosporina inibe indiretamente a função dos monócitos suprimindo a produção de interferon e fator quimiotático para macrófago (HELIN et al, 1989; GRANELLI-PIPERNO et al, 1984; REEM et al, 1983). Como resultado, IL-1, produzida pelos monócitos é inibida (PALACIOS, 1982). IL-1 é um co fator para a ativação dos linfócitos T-helper. A ciclosporina pode exercer também seus efeitos interferindo na ligação dos antígenos transplantados com os seus receptores nos linfócitos T (KAUFMANN et al, 1984), bem como por mecanismos importantes e independentes de IL-2 (MAGAE et al, 1996).

Tudo indica que a ciclosporina atue de maneira específica e reversível sobre os linfócitos. Embora ainda não esteja totalmente estabelecido o seu mecanismo de ação, sabe-se que ocorre a ligação com uma proteína intracelular, a ciclofilina (uma imunofilina da família das isomerases), este complexo bloqueia a ação reguladora da enzima calcineurina, havendo fortes indícios de ser este o alvo principal da ciclosporina, bem como de

alguns de seus análogos (SCHREIBER and CRABTREE, 1992). Ao contrário dos citostáticos, o tratamento com ciclosporina não deprime a hematopoiese e não exerce nenhum efeito sobre as funções dos fagócitos. Em geral, pacientes tratados com ciclosporina estão menos suscetíveis a infecções do que aqueles tratados com outros imuno-supressores.

Embora a ciclosporina seja responsável por inegáveis benefícios terapêuticos no que diz respeito a pacientes transplantados (KEOWN et al, 1981; BRITTON and PALACIOS, 1982; WHITE, 1982; MERION et al, 1984), grande número de efeitos adversos tem sido demonstrados (BUSUTTIL, 1986), sendo os mais importantes relacionados a nefro e hepatotoxicidade (HOWS et al, 1983; KAHAN et al, 1985; DURRANT et al, 1982; SCHROEDER et al, 1986; BAUMHEFNER et al, 1984; HAMILTON et al, 1982). A absorção desta droga possui uma grande variação de pessoa para pessoa (KAUFMANN et al, 1984; SCHREIBER and CRABTREE, 1982; BRITTON and PALACIOS, 1982). Praticamente toda a ciclosporina presente no sangue está ligada aos eritrócitos ou a proteínas plasmáticas (YATSCOFF et al, 1984; ANNESLY et al, 1981; ANNESLY et al, 1986. Esta distribuição é afetada pela temperatura e pelo valor do hematócrito (ANNESLY et al, 1986).

Os principais métodos utilizados para determinação dos níveis de ciclosporina circulantes são o radioimunoensaio (RIA), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a técnica de fluorescência (TDx). Estes métodos tem sido comparados nos últimos anos mostrando-se equivalentes em termos de sensibilidade (MCBRIDE et al, 1992; HOLT et al, 1988; TREDGER et al, 1992; WOLF et al, 1989; BERGAN et al, 1993; VOGT and WEISCH, 1988; SANGHVL et al, 1988; LEE et al, 1991).

2.2- Objetivos

Utilizando a metodologia do RIA, determinar os valores de concentração nos tempos pré estabelecidos para comparação da farmacocinética de duas formulações de ciclosporina provenientes de diferentes laboratórios, sendo Sandimmun (Sandoz) a referência e Ciclospor (Biosintética) a droga em teste.

2.3- Material e métodos

Foram selecionados 24 voluntários do sexo masculino, com idade de 18 a 40 anos, que ficaram internados por um período total de 3 dias, divididos em 2 períodos de 36 horas, intercalados por 14 dias. Os voluntários encontravam-se sem uso de qualquer outro medicamento nas 4 semanas anteriores à data de internação e dentro de 90% do ideal de superfície corporal (relação peso/altura). A seleção dos voluntários foi realizada através de consulta médica, incluindo rigorosos anamnese e exame físico, além de realização de eletrocardiograma e exames laboratoriais que corroboraram para a confirmação do estado de higidez:

- Hemograma completo e velocidade de hemossedimentação (VHS)
- Uréia e creatinina séricas
- Transaminases, fosfatase alcalina, gamma-GT e bilirrubinas
- Glicemia de jejum
- Proteína total e albumina
- Sódio/cloro e potássio
- Urina I
- Protoparasitológico
- Sorologias para HIV e hepatites tipos B e C

Uma vez avaliada a higidez, os voluntários tiveram esclarecidas todas as dúvidas restantes, assinando o termo de consentimento (modelo anexo) para participação no estudo.

Os voluntários foram internados na véspera do início do estudo tendo, desde então, assistência e cuidados médicos e de enfermagem especializados. Receberam dieta geral até as 23 horas, permanecendo em jejum para o início do ensaio clínico previsto para as 7 horas do dia. Foram

realizadas coletas de sangue (5 ml) através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, imediatamente antes da administração do volume equivalente a 5mg/kg de uma das preparações de ciclosporina. Outras amostras foram obtidas nos seguintes tempos após a administração da droga:

0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 8.0; 10.0; 12.0; 18.0 e 24.0 horas.

Os voluntários permaneceram em jejum para sólidos até 8 horas após a ingestão da Ciclosporina; a partir de então, receberam dieta geral. No total foram coletadas 28 amostras de sangue (14 em cada período) para dosagem de ciclosporina.

Em cada internação, os voluntários receberam, por via oral, uma das seguintes preparações farmacêuticas de Ciclosporina:

- **Sandimmun Neoral** (ciclosporina) Laboratório **Sandoz**, solução oral com 100 mg por mililitro.

- **Ciclospor®** (ciclosporina) Laboratório **Biosintética** solução oral com 100 mg por mililitro.

A concentração sérica de ciclosporina foi determinada por Radioimunoensaio - CYCLO-Trac® SP-Whole Blood, INCSTAR Corporation - Stillwater, Minnesota, USA.

O método consiste numa extração feita com metanol (metanol para HPLC – MERCK) – 400ul/100ul de sangue total em tubo de vidro, agitação e centrifugação por 15 minutos a 1600g (20-25°C), em seguida foram retirados 50ul do sobrenadante e adicionados 100ul do reativo marcado ¹²⁵I – CYCLO-Trac SP e, finalmente 1,0 ml do reativo Anti-CYCLO –Trac SP ImmunoSep. Os tubos foram imediatamente agitados e colocados para encubar por uma hora à temperatura ambiente, procedeu-se a nova centrifugação por 20 minutos a 1600g (20-25°C), decantando-se imediatamente o sobrenadante e efetuando-se a contagem do precipitado em contador gama.

O reativo ImmunoSep consiste de anticorpo monoclonal anti-ciclosporina de camundongo mais anticorpo-anti camundongo de burro. O reativo radioativo é composto de um derivado de ciclosporina marcado com isótopos de Iodo (¹²⁵I). O método baseia-se na ligação de anticorpo com as moléculas de ciclosporina, ou seja, tendo concentrações conhecidas de ciclosporina marcada com radiação e de anticorpo anti ciclosporina, calcula-

se a concentração de ciclosporina no sangue, sendo que esta é inversamente proporcional a quantidade de radiação do precipitado.

A concentração máxima atingida (C_{max}), o tempo para atingir a concentração máxima (T_{max}) e a área sob a curva durante 24 horas (AUC_{0-24}) foram calculados e testes estatísticos paramétricos (ANOVA) e não-paramétricos (Wilcoxon) foram realizados para avaliação de possíveis diferenças significativas entre as duas preparações estudadas.

Três dias após o final do estudo, os voluntários foram reavaliados clinicamente e pelos mesmos exames subsidiários realizados na fase pré-estudo.

Os voluntários foram ressarcidos pelas suas despesas e pelo tempo despendido no valor de R\$ 240,00 (duzentos e quarenta reais).

Durante um período de 6 meses, a partir da data de início do estudo clínico, os voluntários permaneceram sob cobertura de um seguro de vida em grupo da companhia Vera Cruz, para casos de morte, invalidez permanente e acidentes.

Voluntário	1º Período	2º Período	Peso/kg	Dose/mg
01- FRM	Sandoz	Biosintética	71.5	300
02- EAS	Sandoz	Biosintética	75.6	300
03- MAS	Biosintética	Sandoz	78.7	400
04- GP	Biosintética	Sandoz	84.0	400
05- RCD	Sandoz	Biosintética	51.2	200
06- EBCF	Sandoz	Biosintética	67.5	300
07- CMA	Biosintética	Sandoz	81.2	400
08- RMS	Biosintética	Sandoz	71.6	300
09- JCAG	Biosintética	Sandoz	77.0	300
10- AAR	Sandoz	Biosintética	70.0	300
11- AHR	Sandoz	Biosintética	62.0	300
12- ASS	Sandoz	Biosintética	80.0	300
13- CRM	Biosintética	Sandoz	68.6	300
14- ADSR	Biosintética	Sandoz	70.5	300
15- PRM	Sandoz	Biosintética	72.9	300
16- OBDS	Sandoz	Biosintética	95.0	500
17- CAS	Biosintética	Sandoz	97.0	500
18- SL	Biosintética	Sandoz	69.5	300
19- AS	Biosintética	Sandoz	69.5	300
20- PCM	Sandoz	Biosintética	100	500
21- LAP	Sandoz	Biosintética	77.0	400
22- JMP	Biosintética	Sandoz	76.2	400
23- VBMN	Biosintética	Sandoz	67.7	300
24- LDF	Sandoz	Biosintética	77.3	400

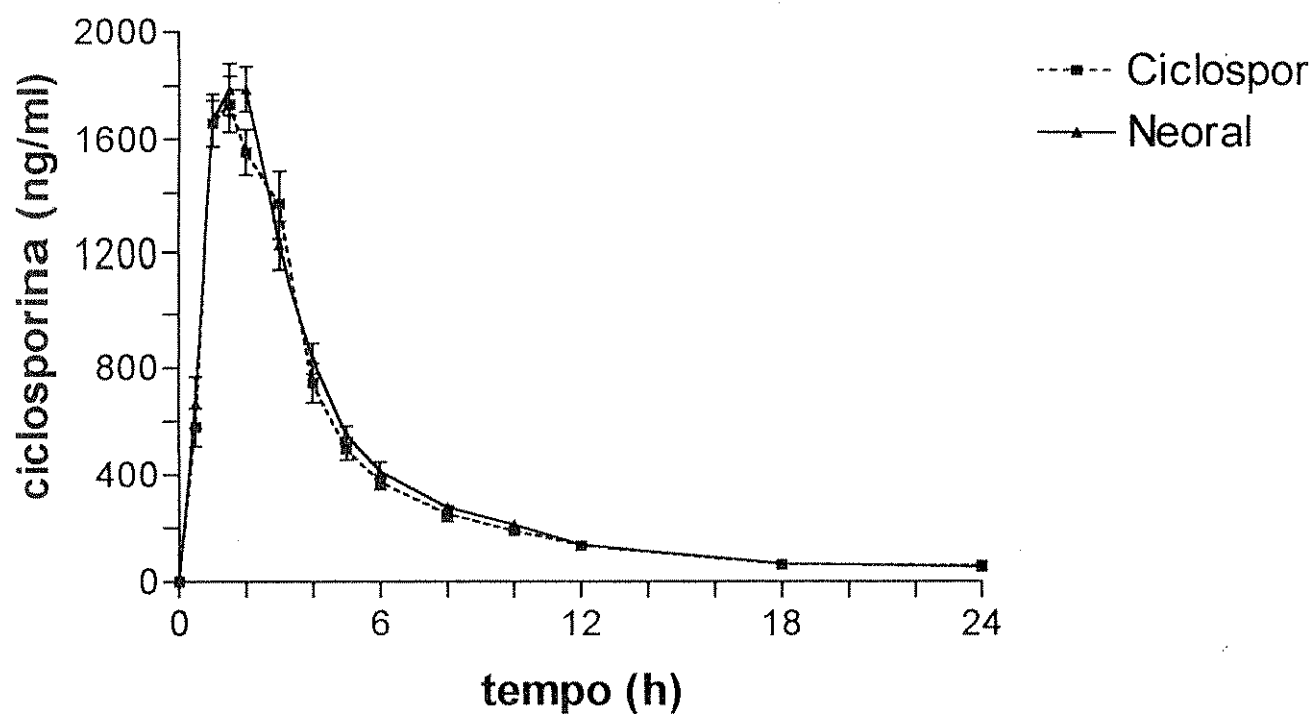
2.4- Tabela de randomização - ciclosporina

2.5- Resultados

	Sandimmun (Sandoz)			Ciclospor (Biosintética)		
Voluntário	AUC _[0-24h] ng/h/ml	Tmax (h)	Cmax (ng/ml)	AUC _[0-24h] ng/h/ml	Tmax (h)	Cmax (ng/ml)
VOL 1	7495	2	1889	6158	1	1692
VOL 2	8282	1	1848	7665	1	2062
VOL 3	12030	1	2429	13300	3	2968
VOL 4	8614	1.5	1825	9607	3	1907
VOL 5	6953	2	1619	6994	1	2070
VOL 6	10840	1.5	2246	11260	1	2310
VOL 7	8599	2	2057	8604	3	1841
VOL 8	11370	1.5	3300	7093	2	1302
VOL 9	5407	1	1756	6894	1	2093
VOL 10	8316	2	1824	6228	1	1751
VOL 11	6118	1	1600	5604	1	1482
VOL 12	7200	1.5	1811	6756	1	2305
VOL 13	8360	2	2262	8474	3	1660
VOL 14	10220	1	3018	8937	1.5	2354
VOL 15	9547	2	2082	8791	2	2062
VOL 16	10900	2	2395	10070	2	1946
VOL 17	8958	3	1897	8009	3	2395
VOL 18	7583	1	1491	7226	1.5	1576
VOL 19	7208	1.5	1759	7076	1	1891
VOL 20	10650	1	1943	10400	1.5	1711
VOL 21	9173	2	2287	8717	1.5	2201
VOL 22	8748	2	2159	8084	1.5	1826
VOL 23	8649	1.5	1722	8102	1.5	2440
VOL 24	7255	2	1610	7503	2	1570
MÉDIA (err. pad.)	8686.45 (343.2)	1.625 (0.105)	2034.54 (88.69)	8231.33 (359.59)	1.708 (0.156)	1975.62 (76.18)

Parâmetros individuais: média e o erro padrão da média para o estudo clínico de bioequivalência entre duas preparações de ciclosporina.

Ciclospor X Neoral concentração/tempo (n=24)



3- Estudo de bioequivalência de duas formulações de lincomicina - cápsula- em voluntários sadios.

3.1- Introdução

A lincomicina (cloridrato de lincomicina mono hidratado) é um antibiótico isolado a partir de cepas do fungo *Streptomyces lincolnensis* (MASON et al, 1962). Sua atividade anti-bacteriana, bem como seu espectro de ação são similares àqueles pertencentes ao grupo dos macrolídeos, ficando a lincomicina classificada neste grupo embora possua características químicas particulares (LEWIS et al, 1963). Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da síntese de proteínas catalisadas pela enzima peptidiltransferase ribossomal, (PESTKA, 1981). Em trabalho recente foi observado que a lincomicina ativa macrófagos estimulando tanto adesão quanto movimentação e liberação de interferon gama (SYNETOS and COUTSOGEORGOPOULOS, 1987).

Do ponto de vista da química, trata-se de metil-6,8-dioxi-6-[(2S4R)-1-metil-4-propil-2-pirrolidinedicarboxamido]-1-tio-alfa-D-eritro-Dgalacto- cloreto de octapiranosídeo, possui peso molecular de 443.5 e 406.5 (base livre) e um pKa de 7,6. A lincomicina possui alta solubilidade em álcool, cerca de 40 vezes maior do que em água. O seu sal de cloreto é obtido por precipitação de cristais puntiformes com acetona, a partir de uma solução aquosa.

Indicação de uso

A lincomicina tem mostrado ser efetiva contra muitos dos patógenos gram positivos, sendo bastante útil indicada no tratamento de patologias como pneumonia por *Pneumococos*, osteomielite, infecções por anaeróbios seguinte a cirurgias abdominais, infecção de ouvido médio em adultos pacientes alérgicos a penicilina ou naqueles onde seu uso é indicado especificamente. Sua atividade, na concentração de 0.5mg/l^{-1} é notável especialmente contra *Streptococcus pyogenes*, *Strptococcus pneumoniae* e *Strptococcus viridans*. A maioria das cepas de *Stafilococcus aureus* também são sensíveis a estas concentrações de lincomicina, embora algumas continuem crescendo mesmo em concentrações superiores a 5.0mg/l^{-1} . Também possui atividade contra *Actinomyces* e *Bacterioides fragilis* e pouca ação sobre *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma*. A lincomicina é, por outro

lado, inativa contra bacilos gram positivos ou negativos, *enterococos* e *Neisseria meningitidis*.

Trabalho realizado com 15 voluntários sadios, injetando-se altas doses de lincomicina (600, 1000 e 1500mg) por via intramuscular, apresentou T_{max} plasmático variando entre 0,9 e 1,5 h, no mesmo estudo foram determinados os níveis de lincomicina na saliva, sendo que neste caso variou entre 3,67 e 4,67h após a administração da droga. Aparentemente a lincomicina é excretada para a saliva através de um processo de difusão passiva dependente do grau de ionização da sua fração livre no plasma. Os níveis de creatina fosfoquinase, um marcador de sofrimento das células musculares, não apresentaram variação estatisticamente importantes entre as diversas injeções (SMITH et al, 1981).

A lincomicina liga-se às proteínas plasmáticas de maneira dependente da sua concentração, sendo que há pelo menos duas proteínas circulantes que ligam o antibiótico, a albumina, com baixa afinidade e alta capacidade e a alfa1 glicoproteína ácida, que possui alta afinidade e pouca capacidade. Há evidências de que a clandemicina, um derivado da lincomicina, também se ligue no mesmo sítio da glicoproteína ácida (GWILT and SMITH, 1986). Há trabalhos mostrando que a alfa1-glicoproteína ácida esta aumentada durante processos infecciosos, isso poderia ser de grande importância para o aspecto terapêutico e farmacocinético (GWILT and SMITH, 1986). Outro fator que interfere com a absorção da lincomicina é a ingestão de alimentos, causando diminuição dos níveis de antibiótico circulante (McGEHEE et al, 1968). Após a administração oral, cerca de 20 a 35% da droga é absorvida, deste total aproximadamente 72% é transportado na forma ligada às proteínas. As concentrações da droga na medula óssea é semelhante àquela encontrada na circulação, no líquido pleural é de aproximadamente 50%. No líquido cefalorraquidiano não são encontrados valores detectáveis de lincomicina, exceto quando ocorre inflamação das meninges, neste caso há passagem (LERNER, 1969). Também ocorre passagem da droga para o leite, se esta for administrada no período de lactação.

Na bile, podem ser detectados níveis 4 a 6 vezes maiores de lincomicina, quando comparado com os níveis séricos, imediatamente após a administração intravenosa do antibiótico. Pela via oral ocorre o mesmo,

iniciando com concentrações baixas e, subindo em seguida e prolongando a meia vida plasmática.

A excreção da lincomicina, a maior parte como droga não metabolizada, se dá pelos rins, até 50% 24h após uma injeção intramuscular e até 73% após uma intravenosa. A excreção de lincomicina pelas fezes após uma administração oral é de até 40% em 72h, sendo possível detectá-la mesmo depois de uma semana, e de até 15% após uma dose parenteral. Embora a lincomicina seja pouco metabolizada, esta se dá por via hepática, havendo evidências de que ocorra reabsorção duodenal da droga. (McCALL et al, 1967; BARTLETT, 1982).

Efeitos colaterais

Apesar de sua segurança quanto aos efeitos colaterais, existem trabalhos demonstrando que os fenômenos indesejáveis mais freqüentes como diarreia e colite pseudo membranosa podem ocorrer preferencialmente quando a droga é ingerida por adultos, sobretudo pessoas idosas e do sexo feminino, atingindo 49% dos tratados com quadro de diarreia e até 10% com quadro de colite pseudomembranosa (SAMRT et al, 1976; LEIGH DA and SIMMONS, 1978). Trabalho realizado com 265 crianças, administrando-se 100mg/k de lincomicina por dia dividido em quatro tomadas diárias para tratamento de diversas patologias como osteomielite, celulite, artrite séptica e pneumonia apresentou poucos efeitos colaterais. As crianças foram tratadas com injeções intravenosas (52%) ou via intramuscular (25,7%) ou ambos os tratamentos, não havendo tratamento por via oral neste protocolo. Apenas oito crianças apresentaram quadro de diarreia e, mesmo com a continuação do tratamento nenhum caso se estendeu por mais de três dias.

A presença de eosinofilia em 34,6% dos pacientes pode ser associada ao uso de lincomicina, níveis séricos de transaminases e bilirrubinas foram monitorados e não apresentaram alterações significativas (SPEER ME et al, 1981). Embora existam autores citando efeito hepatotóxico, na dose utilizada e em crianças este fenômeno não foi detectado.

3.2- Objetivos

Este trabalho teve como objetivos: **a-** determinar os níveis plasmáticos de duas formulações de lincomicina após a administração em voluntários saudáveis, determinando seus valores através de metodologia específica, ensaio biológico e **b-** Utilizar os resultados para avaliar as formulações quanto a bioequivalência entre ambas, sendo a formulação teste (Abbott) e a de referência (Upjohn).

3.3- Material e métodos

Foram selecionados catorze voluntários do sexo masculino e hígidos segundo avaliação de parâmetros clínicos, laboratoriais, psiquiátricos e eletrocardiográficos (anexo 2).

Cada voluntário recebeu apenas uma dose de cada formulação (Abbott – 500mg, comprimido - droga teste e Upjohn 500mg cápsula, como droga de referência) separadas por duas semanas cada administração e respeitando o critério de randomização (tabela 3.4).

Os critérios de exclusão para os voluntários seguiram os seguintes parâmetros:

- Participação do voluntário em qualquer ensaio clínico no período de três meses previamente a este ensaio.
- Utilização de qualquer medicamento, com ou sem indicação médica, pelo período de quatro semanas anteriores ao ensaio.
- História prévia de alcoolismo ou utilização de drogas de abuso.
- Uso regular de bebida alcoólica superior a 4 unidades de álcool por dia (uma unidade corresponde a um copo de vinho, ½ garrafa de cerveja ou 1 medida de cachaça).
- Peso superior a 100k ou fora do limite de 15% do ideal para a relação peso/altura, de acordo com a lista divulgada pela "Metropolitan Life Insurance Tables".
- Fumante que consuma 15 ou mais cigarros por dia.

Todos os voluntários foram recebidos na enfermaria cedida à Unidade de Farmacologia Clínica às 20:00 da noite anterior ao início do ensaio, pernando no hospital. Doze horas após a administração da droga os voluntários receberam alta hospitalar. Durante o período de internação foram

coletadas amostras de sangue nos seguintes tempos: tempo zero, ou seja, imediatamente antes da ingestão de lincomicina e: 1,2,3,4,5,6,8,10 e 12 horas após. A coleta foi realizada através de scalp heparinizado e colocado em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante.

Determinação dos níveis de lincomicina

As amostras de sangue, imediatamente após sua coleta, foram centrifugadas a 4000g por 5 minutos e o plasma transferido para outro tubo para ser armazenado a -20°C até o momento de sua análise.

O método para determinação de níveis de lincomicina foi baseado na capacidade do antibiótico em inibir o crescimento bacteriano (*Sarcina lutea*) em meio de cultura apropriado.

Ao meio de cultura BHI (brain and heart infusion - infusão de cérebro e coração) foi adicionada *Sarcina lutea* (ATCC 9341) até que sua concentração atingisse 0.4 AU (unidade de absorbância) em comprimento de onda de 550 nm, nesta fase adicionava-se agar (agar agar, 1:300) a 50°C e, imediatamente, o volume total era distribuído em placas de Petri com 20ml cada e com o resfriamento foi observada a formação de gel. Seis orifícios (com 7mm de diâmetro e localizados a igual distância entre eles) foram feitos pela remoção do agar em cada placa.

Três orifícios eram preenchidos com 90 μl de cada amostra, e os outros três com soluções de lincomicina preparadas em "pool" de plasma, com concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. As placas eram, então, incubadas a 37°C por 24h e o diâmetro das áreas de inibição do crescimento bacteriano foram medidas e comparadas com as de referência.

Voluntário	Lincomicina - 500mg	
01- JRM	Abbott	Upjohn
02- EM	Abbott	Upjohn
03- LMP	Upjohn	Abbott
04- AFP	Upjohn	Abbott
05- VPS	Abbott	Upjohn
06- EB	Upjohn	Abbott
07- ELM	Abbott	Upjohn
08- OLA	Abbott	Upjohn
09- JDB	Upjohn	Abbott
10- JFP	Upjohn	Abbott
11- ORJ	Abbott	Upjohn
12- MG	Abbott	Upjohn
13- AR	Upjohn	Abbott
14- RSQ	Upjohn	Abbott

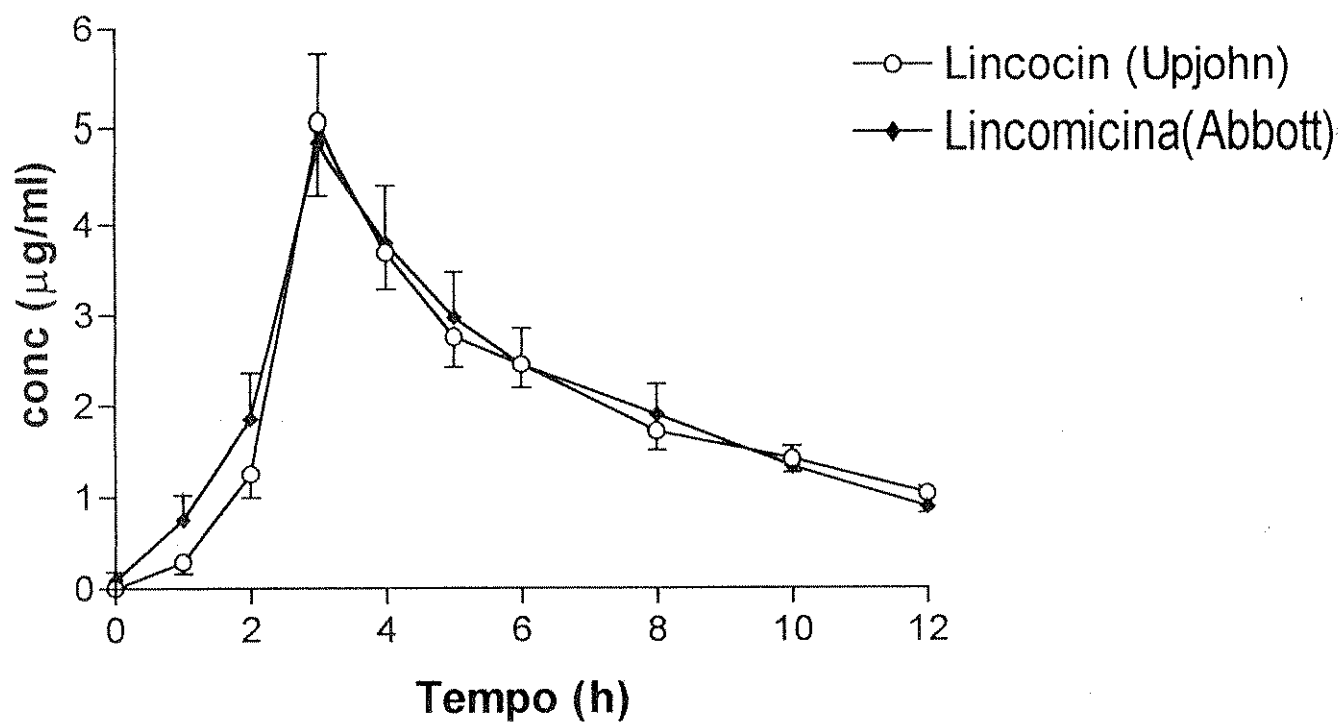
3.4- Tabela de randomização da lincomicina

3.5- Resultados

Voluntário	Lincomicina (Abbott)			Lincocin (Upjohn)		
	AUC _[0-12h] ug/h/ml	Tmax (h)	Cmax (ug/ml)	AUC _[0-12h] ug/h/ml	Tmax (h)	Cmax (ug/ml)
VOL 1	32.65	3	5.6	28.35	3	9.1
VOL 2	37.15	3	7.3	33.25	3	6.6
VOL 3	19.25	3	3.0	28.65	3	5.9
VOL 4	26.85	2	6.0	27.4	4	6.2
VOL 5	40.4	3	9.1	13.05	2	1.8
VOL 6	15.15	3	4	29.7	3	6.1
VOL 7	22.3	3	4.1	11.45	6	1.5
VOL 8	9.2	3	1.6	24.25	3	8.0
VOL 9	2.7	10	0.9	10.8	3	1.3
VOL 10	53.95	3	11.5	43.1	3	7.6
VOL 11	21.95	3	5.4	28.15	3	8.0
VOL 12	10.05	4	1.3	19.95	3	4.3
VOL 13	46.15	3	8.4	29.5	4	5.5
VOL 14	18.85	3	4.7	10.65	4	2.8
MÉDIA (erro pad.)	25.47 (3.98)	3.50 (0.51)	5.20 (0.82)	24.16 (2.59)	3.35 (0.24)	5.33 (0.69)

Parâmetros individuais: média e o erro padrão da média para o estudo clínico de bioequivalência entre duas preparações de lincomicina. Tmax representado pela média e os valores mínimo e máximo.

Lincocin X Lincomicina concentração/tempo (n=14)



4- Estudo de bioequivalência de duas formulações de ambroxol - cápsula de liberação lenta - em voluntários sadios.

4.1-Introdução

As patologias obstrutivas do trato respiratório como asma, bronquite e enfisema, não apenas dominam a pneumologia, como também representam um grande problema social. Nos países onde existe uma estatística há uma clara demonstração da importância no tratamento de doenças associadas às vias respiratórias, por exemplo: na Grã-Bretanha 10% do total de gastos com doenças e 7% do total de internações são atribuídas às doenças das vias aéreas. Na Alemanha (informações referentes à antiga Alemanha Ocidental) 30 milhões de dias de trabalho são perdidos por ano, devido a doenças de origem respiratória.

O líquido surfactante, formado pelas grandes células epiteliais alveolares (pneumócito tipo II) é importante não apenas como um fator anti atelectasia, impedindo o colapso dos alvéolos, mas exerce importante função de limpeza, atuando como um mecanismo de lavagem. Nas doenças inflamatórias dos brônquios, a função regulatória do surfactante no mecanismo de auto limpeza do pulmão é crucial, formando um filme que separa a fase sol da fase gel, garantindo e facilitando a ação dos cílios. O surfactante também é importante na defesa contra processos infecciosos, agindo de maneira não específica ao eliminar partículas estranhas através do fluxo respiratório em direção às vias aéreas superiores, além disso o surfactante reduz a adesão de germes e aumenta a atividade dos fagócitos. Sabidamente, qualquer prejuízo no sistema de produção de surfactante pode levar a consequências ruins para o mecanismo de limpeza dos brônquios e portanto no sistema respiratório como um todo.

Os processos inflamatórios das vias aéreas constituem importante fator na patogênese de diversas doenças, como asma brônquica, fibrose pulmonar, sarcoidose, bronquite crônica, enfisema, stress respiratório no adulto e pulmonite induzida por bleomicina (BARNES PJ, 1987; BARNEVELD et al, 1984; BRUNE K, 1989; KONIG and ULMER, 1990; MICHEL et al, 1989; STRAZS et al, 1990; WEILAND et al, 1986). Tanto estímulos endógenos, como exógenos (alergenos, bactéria, vírus, ozônio, etc.) induzem, durante o processo flogístico um recrutamento e uma ativação das células

inflamatórias, dentre elas os fagócitos alveolares, células do epitélio, basófilos e granulócitos circulantes. Este mecanismo primário de defesa constitui principalmente em colocar as células em contato com o agente patogênico, produzindo uma série de mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos, PAF Acether, prostaglandinas, proteoglicanos, serotonina e tromboxano, que são a causa direta da inflamação e, efetivamente, da instauração de um sistema secundário constituído por eosinófilos, basófilos, monócitos, plaquetas, neutrófilos e fibroblastos. Estas células amplificam o processo inflamatório e geram praticamente os mesmos produtos aos produzidos pelo sistema primário (MENCIA-HUERTA JM et al, 1990; RAPHAEL GD and METCALFE DD, 1986).

A enzima fosfolipase A2 (PLA2), que quebra a ligação éster do glicerolfosfato 2, no fosfolipídio da membrana celular, participa de maneira relevante na reação inflamatória do tecido (CHANG J et al, 1987; O'FLAHERTY JT, 1987). A PLA2 ligada à membrana celular regula a liberação do ácido aracdônico de fosfolipídios da como o fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina e fosfatidil serina. O ácido aracdônico liberado sofre a ação da enzima ciclooxygenase e da lipooxygenase (ambas citoplasmáticas), esta ação leva à síntese de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos; estes produtos de transformação do ácido aracdônico possuem notável influência sobre os processos inflamatórios pulmonares (ENDERSON WR, 1987). Particularmente tem sido notada a participação de leucotrieno C4, D4 e E4 com propriedades bronco constritiva e inflamatória (BRAY MA, 1986) enquanto o leucotrieno B4, graças a sua atividade quimiotática para neutrófilo, tem participação chave em processos inflamatórios no pulmão, bem como em outros tecidos (FORD-HUTCHINSON AW, 1990; GRUBER et al, 1989; MacMILLAN RM et al, 1988; WARDLAW AJ et al, 1989).

Recentemente particular atenção tem sido dada à função da PLA2 extracelular no processo inflamatório; esta provavelmente agindo como mediador tanto local, quanto sistêmico (PRYZANSKI W and VADAS P, 1991).

O ambroxol, quimicamente o [2-amino3,5-dibromo-N(trans-4hidroxíciclohexil)benzilamina], foi sintetizado por a partir da década de 60, tendo inicialmente sido identificado como um dos metabólitos da bromexina (met. VIII), posteriormente verificou-se que sua eficácia, em termos de propriedades bronco-secretolíticas, é superior àquela da substância que lhe

havia dado origem, com total ausência de efeitos tóxicos (KECK J, 1967; RENOVANZ KD, 1975).

O cloreto de bromexina, por sua vez, é um derivado sintético da vasicina, o princípio ativo da *Adhatoda vasica*, um expectorante mucolítico largamente usado em bronquite e outras enfermidades respiratórias, como um auxiliar na expectoração

O ambroxol marcado com carbono 14 foi incorporado à molécula de ambroxol para estudos farmacocinéticos. Pode se notar uma rápida e completa absorção após administração por via oral, a meia vida de eliminação do sangue foi calculada em 20-25h em rato, cachorro e em humano, e apenas 02h em coelho. No homem e no coelho a excreção ocorre preferencialmente pela urina, enquanto que em rato e cachorro também ocorre eliminação biliar (HAMMER R and FINNILA MJ, 1978). O metabolismo ocorre em duas fases, sendo que a primeira leva à formação do ácido dibromoantranílico, a seguir as reações ocorrem para originar glicuronídeos, principalmente em humanos e coelhos. Em porcos foi notado o acúmulo máximo do ambroxol em fígado e pulmões 90 minutos após administração oral.

As principais características físico-químicas do ambroxol são: cristais brancos, com peso molecular igual a 377,96d e ponto de fusão entre 233 e 234.5°C, fórmula – $C_{13}H_{18}Br_2N_2O$ (THOMAE K, 1979).

Ação mucolítica e estimulante da secreção do pneumócito tipo II.

A fibrose cística é uma patologia congênita que causa aumento na viscosidade da secreção das vias aéreas (entre outras), resultando na obstrução da luz dos ductos respiratórios. Na evolução da doença ocorre obstrução total de bronquíolos, fibrose pulmonar e insuficiência respiratória progressiva e irreversível. Por esta razão, o tratamento deve ser voltado particularmente para as complicações broncopulmonares. Terapia com substâncias mucolíticas são fundamentais para o sucesso do tratamento.

Em experimentos realizados com ratos, utilizando modelo experimental para indução de fibrose cística, foi observado que em animais portadores da patologia ocorre aumento nos valores absolutos de fosfolipídios dosados no lavado broncopulmonar, apresentando principalmente fosfolipídios poli insaturados. Este fato foi atribuído à ruptura do mecanismo de secreção de

fosfolípidios na síntese do surfactante. Após tratamento com ambroxol foi observado aumento de fosfolípidios no lavado, com aumento proporcional nos saturados (SENDA M, HIROSHI K, 1981). Também no caso da síndrome do stress respiratório do prematuro, uma doença causada pela deficiência de surfactante, que retarda a maturação do pulmão, os estudos demonstraram que o aumento na síntese e secreção de surfactante pelo pneumócito II trás importante benefício ao paciente (MAEDA H, 1981; NAGAOKA S, KASE Y, 1981).

Nas infecções de vias aéreas, a eliminação das bactérias resulta do movimento ciliar entre outros fatores. Um destes fatores é a redução da tensão superficial causada pelo líquido surfactante (ERNE AM, 1984). Em outros experimentos observou-se melhora no fluxo respiratório, indicando aumento do espaço das vias respiratórias (GRASSI C, 1983), melhora nos sintomas, dispnéia, tosse e expectoração, quando comparado com placebo (BONZI et al, 1984; BARATTINI et al, 1989)

Ambroxol – ação antiinflamatória

Têm sido estudados os efeitos do ambroxol como inibidor de PLA (HEATH MF and JACOBSON W, 1985), sendo inclusive proposto que esta inibição está relacionada, ao menos em parte, com o aumento na produção do surfactante (HEATH MF and JACOBSON W, 1985). Outro estudo demonstrou que a ação do ambroxol se dá, preferencialmente, sobre a PLA das células fagocíticas (GRABNER R, 1987). Paralelamente foi comprovado que ocorre inibição na produção de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), entretanto o seu mecanismo de ação ainda não se encontra estabelecido (BIANCHI M et al, 1990; KE4RN JA et al, 1988; KUNKEL SL, 1985). Também na migração de leucócitos humanos induzida por Zimosan, o ambroxol potente inibidor (CAPSONI F et al, 1985).

Outro efeito anti inflamatório importante do ambroxol está relacionado com sua alta atividade anti-oxidante, reduzindo danos celulares mediados por radicais livres que podem participar da gênese de patologias como enfisema e câncer (GUYATT GH et al, 1987; BIANCHI M et al, 1990). O ambroxol não apenas inibe a geração de oxigênio reativo pelos fagócitos, mas também parece impedir a atividade dos seus metabólitos ativos (LAPENNA et al, 1994; NOWAK D et al, 1994 a b; GILLISSEN et al, 1997).

4.2- Objetivos

Este estudo clínico teve como objetivo comparar parâmetros farmacocinéticos entre duas formulações de ambroxol em cápsulas (liberação lenta), obtidos através de dosagens com metodologia de HPLC acoplado ao detector de UV, sendo que resultados obtidos para a administração de Ambril SR75mg (Merck - teste) foram comparados com aqueles obtidos para a administração de Ambroxol 75mg (Euderma SPA - referência).

4.3- Material e métodos

A seleção de dezoito voluntários realizou-se de acordo com o descrito nas páginas referentes aos outros ensaios, observando-se que neste estudo os voluntários retornaram à unidade de farmacologia clínica 24 horas após a alta para coleta da amostra de 48h. Em cada período de internação foi administrado um comprimido com concentração de 75 mg em dose única e as amostras de sangue obtidas nos seguintes tempos: 0 (antes da administração) e 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 24 e 48 horas após a administração.

Em cada horário de coleta foram retirados 10ml de sangue através de scalp heparinizado e colocados em tubo de vidro contendo heparina. Imediatamente as amostras foram centrifugadas em rotação equivalente a 2000g, por 10 minutos, o plasma foi removido e estocado em freezer com temperatura igual a -20°C até o momento da dosagem do ambroxol.

A cada 1 ml de plasma (curva padrão e amostras) foi adicionado 100 μl de padrão interno (solução aquosa de cloreto de bupivacaína a 6.7 $\mu\text{g/ml}$) e 1.0 ml de tampão tetraborato de sódio 0.025 M (pH 9.0). A mistura passava por agitação em vortex por 10 segundos e imediatamente adicionava-se 5.0 ml de dietil éter e nova agitação por 1.0 minuto era realizada para obtenção de uma fase orgânica que era transferida para um tubo limpo e re extraída com 700 μl de ácido clorídrico 0.01 M, agitando-se a solução por 1 minuto. Nova centrifugação era então processada (2000 g por 5 minutos) e a fase aquosa transferida para um tubo de ensaio contendo 50 μl de solução de hidróxido de potássio 0.2 M. A mistura foi colocada em banho-maria a 30°C e o restante do éter dissolvido foi evaporado com fluxo de nitrogênio, o volume total foi injetado no cromatógrafo.

Condições cromatográficas: A fase móvel, composta de tampão KH_2PO_4 0.01 M , pH 6.8, acetonitrila e metanol, na proporção 40/50/10 (v/v) foi aplicada a uma coluna, Nucleosil C_{18} 10 μ , 4.6 x 250 mm, num fluxo constante de 1.4 ml/min, e o eluente foi continuamente monitorado a 242 nm. Sob estas condições, os tempos de retenção para ambroxol e bupivacaína foram aproximadamente 4.8 e 6.3 minutos respectivamente.

Os valores obtidos pela razão entre os picos de ambroxol e os das curvas de calibração foram comparados com as concentrações do padrão interno e o resultado calculado por regressão. As análises farmacocinéticas foram realizadas através do software "Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies – Version 3.4" produzido por Herman P Wijnand, para obtenção dos valores de $\text{AUC}_{[0-24\text{h}]}$ e $\text{AUC}_{[0-48\text{h}]}$ enquanto que C_{max} e T_{max} foram obtidos de forma direta.

Voluntário	Ambroxol - 75mg	
01- AQC	Ambril	Ambroxol
02- AVS	Ambril	Ambroxol
03- EPS	Ambroxol	Ambril
04- JMP	Ambroxol	Ambril
05- JCNLN	Ambroxol	Ambril
06- VC	Ambril	Ambroxol
07- RLS	Ambroxol	Ambril
08- SRC	Ambroxol	Ambril
09- VPS	Ambroxol	Ambril
10- DRC	Ambroxol	Ambril
11- VL	Ambril	Ambroxol
12- EM	Ambril	Ambroxol
13- EB	Ambril	Ambroxol
14- JDM	Ambroxol	Ambril
15- JMM	Ambril	Ambroxol
16- JRM	Ambroxol	Ambril
17- RRC	Ambril	Ambroxol
18- MCM	Ambril	Ambroxol

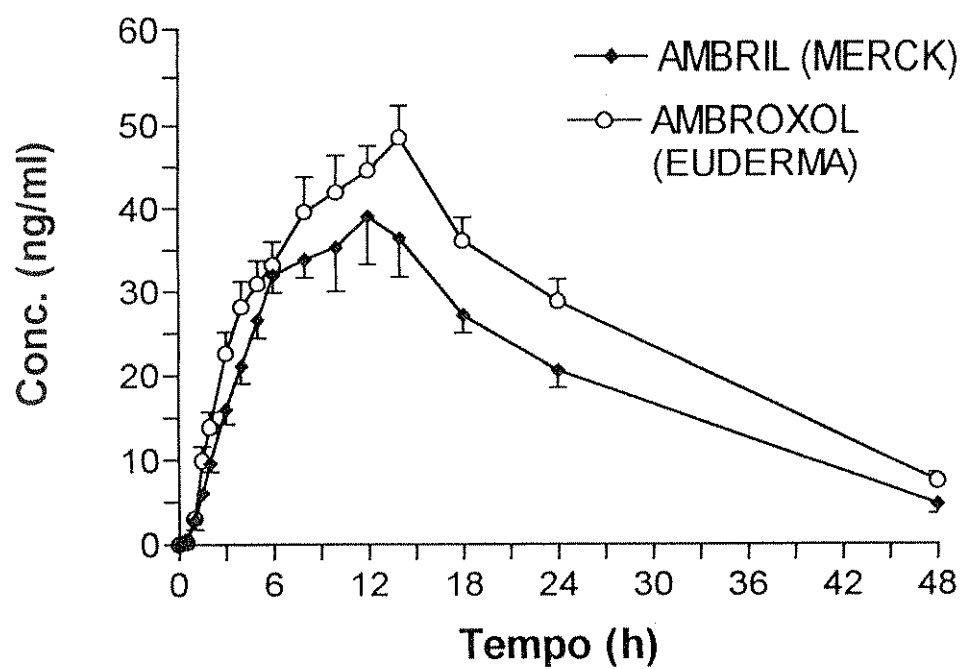
4.4- tabela de randomização para o ambroxol.

4.5- Resultados

Voluntário	Ambril (Merck)				Ambroxol (Euderma)			
	AUC _[0-24h] (ng/ml/h)	AUC _[0-48h] (ng/ml/h)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUC _[0-24h] (ng/ml/h)	AUC _[0-48h] (ng/ml/h)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)
VOL 1	740	1268	46	6	810	1450	44	8
VOL 2	734	1075	46	5	1093	1498	73	8
VOL 3	578	964	40	6	712	1259	46	12
VOL 4	526	623	41	6	726	983	42	5
VOL 5	437	776	27	10	1112	1628	62	12
VOL 6	530	780	41	4	456	n.d.	28	12
VOL 7	593	857	36	10	644	1168	48	10
VOL 8	413	470	33	8	480	732	32	12
VOL 9	242	322	22	8	535	658	32	12
VOL 10	1190	1540	116	10	1210	1743	83	10
VOL 11	783	1365	49	12	974	1348	60	8
VOL 12	874	1228	107	12	914	1494	51	18
VOL 13	558	912	31	14	826	1133	50	14
VOL 14	819	1132	56	12	1237	1888	84	14
VOL 15	391	498	23	12	667	799	57	12
VOL 16	784	1143	51	10	711	1042	44	14
VOL 17	809	1145	48	10	855	1299	56	12
VOL 18	548	890	34	12	763	1214	51	14
MÉDIA (erro pad.)	642 (222)	944 (328)	47 (25)	10 (4-14)	818 (235)	1255 (347)	52 (16)	12 (5-18)

Parâmetros individuais: média e erro padrão da média para o estudo clínico de bioequivalência entre duas preparações de ambroxol. Tmax representado pela média e os valores mínimo e máximo.

**Ambroxol X Ambril
concentração/tempo (n=18)**



5- Discussão e conclusões

O desenvolvimento de um ensaio clínico está baseado em três momentos principais, o primeiro é a elaboração de um protocolo clínico que seja abrangente quanto aos tempos de coleta de amostras, de maneira a cobrir todo o perfil farmacocinético, isso fica prejudicado nos ensaios de fase I; viável para os voluntários, que normalmente possuem outras atividades e colaboram com os projetos nos períodos livres; o protocolo deve ser sobretudo ético, mostrando claramente os objetivos e os riscos aos quais os voluntários serão expostos. O segundo aspecto abrange a fase na qual o voluntário permanece internado ou sob os cuidados da equipe. Nesta fase são coletadas as amostras e também é onde os eventuais efeitos indesejáveis aparecem, tornando o acompanhamento do profissional (enfermeiro/médico) fundamental, sem omissão de qualquer informação, por menos relevante que possa parecer. Na última etapa, são obtidos os valores de concentração e os dados estatísticos demonstrando a bioequivalência (quando for o caso) ou não das formulações, portanto envolve a preparação das amostras e a determinação dos valores das drogas em estudo. A correta escolha da metodologia é fundamental, quanto mais sensível e específica, menor será a dose necessária a ser administrada ao voluntário e os resultados mais confiáveis.

Nos últimos anos, as maiores mudanças têm ocorrido na terceira fase, onde são estabelecidos novos critérios estatísticos e novos processos para dosagem de drogas. Já nas fases iniciais, estão estabelecidos protocolos aceitos pela comunidade científica e pelos comitês de ética mais rigorosos, apesar disso, as principais alterações nos protocolos dizem respeito ao número de voluntários para a realização de um ensaio clínico, atualmente de vinte e quatro. Com estes valores fica fortalecida a estatística, pois aumentando-se o número de indivíduos no protocolo, diminui-se o erro estatisticamente mensurável.

O desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis e específicos para a dosagem de fármacos e seus metabólitos têm contribuído significativamente para a realização de estudos clínicos envolvendo

comparações de aspectos farmacocinéticos entre formulações provenientes de diferentes indústrias e distintos lotes.

O radioimunoensaio, desenvolvido no final dos anos 50 (YALOW RS and BENSON AS, 1959), primeiramente para dosagem de insulina é muito útil e específico, sua principal característica é a utilização de substâncias radioativas (marcadas) num processo de competição, que inicialmente se baseava apenas na reação Ag-Ac, ou seja, apenas as moléculas capazes de gerar produção de anticorpos eram passíveis de terem seus níveis detectados por este método. Embora o método de radioimunoensaio tenha uso científico, sua principal utilização é no apoio diagnóstico, em dosagens hormonais e de outras substâncias, sendo que o surgimento de novos métodos, especialmente fluorimétricos, como quimioluminescência (EISMAN et al, 1976) e enzimáticos, diminuíram sensivelmente seu mercado. Os novos métodos para determinação de substâncias são considerados de menor risco por não utilizarem material radioativo, além disso, uma vez marcado com radiação, o kit para determinação de qualquer molécula tem um prazo para sua utilização (eventualmente curto), após o que, sua emissão radioativa cai, podendo comprometer os resultados. No caso da ciclosporina, é possível a dosagem até aproximadamente seis semanas depois da marcação. A melhor reprodução dos resultados em RIA foi obtida com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, pois a produção de anticorpos de vários clones (policlonal), provenientes de vários tecidos, diminui a especificidade, mostrando muitas vezes resultados superiores ao esperado, por se ligarem a diferentes porções da molécula e, portanto, levando a maior número de possíveis metabólitos detectáveis. O anticorpo monoclonal, produzido por um único tipo celular, diminui muito a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com metabólitos (HOLT et al, 1988).

O tempo reduzido para a obtenção de resultados quando comparado com HPLC, onde o tempo de retenção é superior a 45 minutos, e o baixo custo por amostra dosada, aproximadamente US\$ 4,2 contra aprox. US\$ 7,3 do TDX, foram importantes na escolha do método, já que há uma correlação superior a 98%, quando comparamos os resultados obtidos por RIA e os do HPLC (McBRIDE et al, 1992). Mesmo com as melhorias propostas por Wang e colaboradores em 1990, o TDX permanece produzindo importantes reações cruzadas com vários metabólitos da ciclosporina (WANG et al, 1990;

GREVEL et al, 1990). O maior limitador para a aplicação desta técnica é o fato de que há a necessidade de compra de kits, pois desenvolver a metodologia para uma droga específica pode demandar muito tempo e dinheiro, além disso a maioria dos kits de boa qualidade são importados, e o procedimento para sua importação consome tempo, causando perda nos níveis de emissão de radiação e comprometendo a qualidade das dosagens.

Ensaio utilizando-se HPLC têm sido utilizados há décadas, fazendo parte da rotina de trabalho em laboratórios de farmacologia clínica ou ainda como prestação de serviços, pois seu custo a médio prazo, dependendo do número de amostras dosadas, pode ser muito baixo. Este aspecto tem sido importante para seguimento de níveis terapêuticos em pacientes ambulatoriais, ou mesmo naqueles internados, que estejam fazendo uso de drogas como teofilina e anticonvulsivantes por exemplo. A versatilidade é uma das principais características deste sistema, permitindo que seja acoplado a detectores de UV, espectrômetros de massa e outros equipamentos de detecção. Outras características que favorecem sua utilização são o fácil acesso à maioria das drogas usadas para preparação de amostras e a evolução das colunas, tornando-se cada vez mais específicas para as diversas classes de substâncias. O sistema de HPLC tem sido utilizado tradicionalmente para determinação de ambroxol, demonstrando boa sensibilidade e reprodutibilidade, com tempo de retenção ao redor de 4,3 minutos (BOTTERBLOM et al. 1987; SCHMID 1987; NOBILIS et al. 1992). A molécula de ambroxol pode ser determinada também por GLC específico, sem que haja, entretanto, ganho quanto a sensibilidade apesar do maior volume de amostra necessário para esta técnica. A aceitação do HPLC por parte de revistas especializadas e as condições laboratoriais disponíveis à época foram fatores importantes na escolha da metodologia adequada ao ensaio clínico.

O ensaio biológico possui particularidades interessantes, a principal é que de fato o resultado obtido é fruto de uma avaliação farmacodinâmica, que passa a ser aplicada do ponto de vista farmacocinético, pois todos os ensaios biológicos envolvem a ação de uma determinada droga sobre tecidos ou células. Na sua maioria estes ensaios se prestam a determinar a presença de receptores característicos em determinados tecidos, tornando-se experimentos clássicos e extremamente didáticos. É especialmente indicado

pela OMS para determinação de uma séria de antibióticos, dentre eles a lincomicina, por Ter uma boa correlação entre sua concentração e seu efeito sobre o microorganismo testado.

Apesar de serem de grande importância para determinar níveis de diversas moléculas, os ensaios biológicos estão sujeitos a possibilidades de terem o efeito dos metabólitos, que normalmente possuem atividade, somados aos da droga que lhes deu origem. A determinação dos metabólitos farmacologicamente ativos pode ser de importância para avaliação dos parâmetros terapêuticos, contudo numa observação mais objetiva, não se trata da droga em estudo. A maioria dos estudos com lincomicina têm sido realizados em animais (BROWN et al 1975; HORNISH et al 1987; LUO et al 1996), porém nos trabalhos envolvendo humanos encontrados na literatura encontramos resultados muito semelhantes àqueles de nosso trabalho (McCALL et al 1967; GWILT and SMITH 1986; FLAHERTY et al 1988; GATTI et al 1993)

Atualmente o método mais comum para a detecção de drogas encontrado em revistas especializadas é o HPLC, sendo relativamente mais seguro, por não fazer uso de microorganismos ou material radioativo, e muito sensível para a maioria das drogas conhecidas.

Neste trabalho pudemos utilizar diferentes métodos para determinação de níveis circulantes de drogas, tendo como maior preocupação encontrar as metodologiasx adequadas para determinação dos níveis circulantes de três diferentes drogas, a partir destes valores e utilizando estatística adequada pudemos concluir que: nos ensaios clínicos realizados para lincomicina (lincocin - Upjohn e lincomicina - abbott) e ambroxol (ambril - Merck e ambroxol - Euderma), utilizando respectivamente ensaio biológico e HPLC não houve bioequivalência. No ensaio clínico realizado para ciclosporina (ciclospor - Biosintética e sandimmun - Sandoz), com dosagens por RIA, houve bioequivalência.

Bibliografia

- ANNESLY T, MATZ K, GIACHERIO DA, FELDKAMP C. The concentration related distribution of cyclosporine in blood. *J. of Immunoassay*; **2**(1), 19-32, 1981.
- ANNESLY T, MATZ K, GIACHERIO DA, FELDKAMP C. Cyclosporine distribution in Blood: concomitant effect of hematocrit, concentration, metabolites and temperature. *J. of Immunoassay*; **9**(1), 1986.
- BARATTINI DF, DANIOTTI S, PIERFEDERICI P. Prevention of chronic bronchitis exacerbations with ambroxol (Mucosolvan retard) in a open, long term multicenter study in 5.635 patients. *Respiration* **55**, Suppl. 1, 84-96, 1989.
- BARNES PJ. A new approach to the treatment of asthma. *New Engl. J. Med.* **321**:1517-27, 1989.
- BARNEVELD PWC, MARK TW, SLEIJFER DT, MULDER NH, SCHRAFFORDT KH, SLUITER HJ, PESET R. Predicative factors for bleomycin-induced pneumonitis. *Am. Ver. Resp. Dis.* **130**:1078-81, 1984.
- BARTLETT JG. Anti-anaerobic antibacterial agents. *The Lancet* **2**(8296):478-81, 1982.
- BAUMHEFNER RW, MYERS, LW, ELISON, GW. Huge cyclosporin overdose with favourable outcome. *Lancet* **2**:332.
- BERGAN S, RUGSTAD HE, STOKKE O, BENTDAL Ø, FRØYSAKER & BERGAN, A cyclosporine A monitoring in patients with renal, cardiac, and liver transplants: a comparison between fluorescence polarization immunoassay and two different RIA methods. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **53**:471-477, 1993.
- BERTAULT-PERES P, BONFILS C, JUST S, CANO JP, MAUREL, P. Metabolism of Cyclosporine A .II. Implication of the macrolide antibiotic inducible cytochrome P-450 3c from rabbit liver microsomes. *Drug. Met. Dispos.* **15**:391-8, 1987.
- BEVERIDGE T, GRATWOHL A, MICHO F. Cyclosporin A: Phamacokinetics after a single dose in man and serum levels after multiple dosing in recipients of allogenic marrow grafts. *Curr. Ther. Res.* **30**:5-16, 1981.

- BIANCHI M, MANTOVANI A, ERROI A, DINARELLO CA, GHEZZI P.
Ambroxol inhibits interleukin 1 and tumor necrosis factor production in human mononuclear cells. *Agents Actions*. **6**:468, 1976.
- BONZI G, REGUZZONI G and NEGRI L. Clinical evaluation of ambroxol in the treatment of acute and chronic bronchopneumopathies. *Minerva Pneumol*. **23**:61-65, 1984.
- BOREL JF, FEURER C, GUBLER HU & STAHELIN H. Biological effects of Cyclosporin A: a new antilymphocyte agent. *Agents Actions*, **6**: 468, 1976.
- BOREL JF, Cyclosporine: Historical Perspectives, Transplantation Proceedings, Vol. XV, N° 4, Suppl. 1 (December), 1983.
- BOTTERRBLOM MHA, JANSSEN TJ, GUELEN PJM. Rapid and sensitive determination of ambroxol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*. **421**:211-215, 1987.
- BRAY MA. Leucotrienes in inflammation. *Agents Actions*. **19**:87-99, 1986.
- BRITTON S, PALACIOS R. "Cyclosporin A-Usefulness, Risks and Mechanism of action". *Immunological Review*; **65**:5, 1982.
- BROWN RB, BARZA M, BRUSCH JL, HASHIMOTO Y, WEINSTEIN L. Pharmacokinetics of lincomycin and clindamycin phosphate in a canine model. *J. Infect. Dis*. **131**(3):252-60, 1975.
- BRUNE K. Ten years research on inflammation revisited. *Agents Actions* **26**:4-7, 1989.
- BULL JP. The historical development of clinical therapeutics trials. *J. Chron. Dis*. **10**:218-48, 1959.
- BUSUTTIL RW, GOLDSTEIN LI, DANOVICH GM, AMENT ME, MENSIC LD. "Transplantation Today", *Annals of Internal Medicine*: **104** (3), 337-389, 1986.
- CAPSONI F, ONGARI AM, MINONZIO F, LAZZARIN A, ZAVATTINI G. Effects of ambroxol on human phagocytic cell function. *Boll. Ist. Siroreter. Milan* **64**:236-9, 1985.
- CHANG J, MUSSER JH, MCGREGOR H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol*. **36**:2429-36, 1987.
- CHEN YL, LE VRAUX V, LEVENEU A, DREYFUS F, STHENEUR A, FLORENTIN I, DE SOUSA M, GIROUD JP, FLOUVAT B, CHAUVELOT-MOACHON L. Acute phase response, interleukin 6, and alteration of cyclosporin pharmacokinetics. *Clin. Pharm. & Ther*. **55** (6) 649-60, 1994.

- COLEBROOK L and PURDIE AW. Treatment of 106 cases of puerperal fever by sulphonilamide. *Lancet* ii, 1237-42 and 1291-94, 1937.
- DURRANT S, SHIPPING PM, PALMER S, GORDON-SMITH EC, Cyclosporin A methylprednisolone and convulsions. *Lancet* 2:829, 1982.
- EISMAN JA, HAMSTRA AJ, KREAN BE. A sensitive, precise, and convenient method for determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**:235-43, 1976.
- ELLIOT JF, LIN Y, MIXEL SG, BLEACKLEY RC, HARNISH DG, PAETKAU V. Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. *Science* **226**:1439-41, 1984.
- ERNE AM. Surfactant in bacterial clearance. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**:205-9, 1984.
- FERGUSON FR, DAVEY AF, TOPLEY WWC. The value of mixed vaccines in the prevention of the common cold. *J. Hyg.* **26**:98-109, 1927.
- FLHERTY JF, RODONDI LC, GUGLIELMO BJ, FLEISHAKER JC, TOWNSEND RJ, GAMBERTOGLIO JG. Comparative pharmacokinetics and serum inhibitory activity of clindamycin in different dosing regimens. *Antimicrob. Agents CHEMOTHER.* **32**(12):1825-29, 1988.
- FORD-HUTCHINSON AW. Leucotriene B₄ in inflammation. *Crit. Rev. Immunol.* **10**:1-12, 1990.
- GATTI G, FLAHERTY J, BUBB J, WHITE J, BORIN M, GAMBERTOGLIO J. Comparative study of bioavailabilities and pharmacokinetics of clindamycin in healthy volunteers and patients with AIDS. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(5): 1137-43, 1993.
- GILLISSEN A, SCHARLING B, JAWORSKA M, BARTLING A, RASCHE K, WENINGHAUS GS. Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine. *Res. Exp. Med.* **196**:389-98, 1997.
- GRABNER R. Influence of cationic amphiphilic drugs on the phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase A₂. *Biochem. Pharmacol.* **36**:1063-67, 1987.
- GRANELLI-PIPERNO, A., INABA, K., STEINMAN, R.M., Stimulation of lymphokine release from T-lymphoblast. *J. Exp. Med.* **160**:1792-1802, 1984.

- GRASSI C. Biomedical and functional changes in bronchoalveolar parameters induced by ambroxol treatment of chronic bronchitis. Elsevier Science Publishers B.V. Pulmonary Surfactant System. E.E. Cosmi and E.M. Scarpelli eds.
- GREENWOOD M and YULE GU. The statistics of anti-typhoid and anti-cholera inoculations and the interpretation of such statistics in general. **Proc. R. Soc. Med.** 8:113-94, 1915.
- GREVEL J, NAPOLI KL, GIBBONA S, KAHAN BD. Area under the curve monitoring of cyclosporine therapy: performance of different assay methods and their target concentrations. *Ther. Drug Monit.* 12:8-15, 1990.
- GRUBER DF, D'ALESSANDRO MM, WALDEN Jr TL. In vitro effects of leucotriene B₄ (LTB₄) on canine PMN effector function(s). *Agents Actions* 28:256-63, 1989.
- GUYATT GH, TOWSAND M, KASIN F, NEWHOUSE MT. A controlled trial of ambroxol in chronic bronchitis. *Chest* 92:618-21, 1987.
- GWILT PR and SMITH RB. Protein binding and pharmacokinetics of lincomycin followed intravenous administration of high doses. *J. Clin. Pharmacol.* 26:87-90, 1986.
- HAMMER R and FINNILA MJ. Speziesvergleich und metabolismus von NA-872-Cl (ambroxol) bei ratte, kaninchen, hund und mensch. *Arzeim. Forsch.* 28:899-903, 1978.
- HAMILTON DV, EVANS DB, THIRU S. Toxicity of cyclosporin A in organ grafting. In: White D (ed) *Cyclosporin A*. Elsevier Biomedical, ch 35, pp 393-412, 1982.
- HEATH MF, JACOBSON W. The inhibition of lysosomal phospholipase A from rabbit lung by ambroxol and its consequences for pulmonary surfactant. *Lung* 163:337-44, 1985.
- HELIN HJ, EDGINGTON TS. Cyclosporin A reguletes monocyte/macrophage effector functions by affecting instructor T cells: inhibition of monocyte procoagulant response to allogenic stimulation. *J. Immunol.* 132:1074-76.
- HENDERSON WR. Eicosanoids and lung inflammation. *Am. Ver. Respir. Dis.* 135: 1176-85, 1987.
- HOLMES OW. Currents and counter currents in medical science. In *Works*, vol 9, p. 185, 1891.

- HOLT DW, JOHNSTON A, MARSDEN JT, VERNILLET L., KEOWN PA, ROSANO TG, SHAW LM and ROSENTHALER J. Monoclonal Antibodies for Radioimmunoassay of Cyclosporine: a Multicenter Comparison of Their Performance with the Sandoz Polyclonal Radioimmunoassay Kit. *Clin. Chem.* **34**:6, 1091-1096 (1988).
- HORNISH RE, GOSLINE RE, NAPIER JM. Comparative metabolism of lincomycin in swine, chicken, and rat. *Drug Metab. Ver.* **18**(2-3):177-214, 1987.
- HOWS JM, CHIPPING PM, FAIRHEAD S, BAUGHAN A, GORDON-SMITH EC. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients treated with cyclosporin A *British J. of Haematology* **54**:69-74, 1983.
- KAHAN BD, BUREN CT, LORBER MI, FLECHNER S.M, WIDEMAN CA., KERMAN, R.H. Optimisation of Cyclosporine immunosuppression for renal transplantation. *Transplantation Proceedings XVII (suppl.2)*:35-44, 1985.
- KAHAN BD, GREVEL J. Optimization of Cyclosporine therapy in renal transplantin by a pharmacokinetic strategy. *Transplantation* **46**:631-44, 1988.
- KAHAN, BD. Cyclosporine, *N. Engl. J. Med.* vol. 321 N° **25**, Dec. 21, 1989.
- KAUFMANN Y, CHANG AE, ROBB RJ, ROSEMBERG SA . Mechanism of action of Cyclosporin A: Inhibition of lymphokine secretion studied with antigen-stimulated T-cells hibridomas. *J. Immunol.* **133**:3107-11, 1984.
- KECK J. Synthese der meteboliten von Bisolvon. *Liebs. Ann. Chem.* **707**:107-11, 1967.
- KEOWN PA, ESSERY GL, STILLER CR, SINCLAIR NR, MULLEN R, ULAN RA. "Mechanisms of immunosuppression by Cyclosporin". *Transplantation Proceedings*; **13**(1):386, 1981.
- KERN JA, LAMB RJ, REED JC, DANIELE RP, NOWELL PC. Desamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *J. Clin. Invest.* **91**:237-44, 1988.
- KONIG W, ULMER WT. Atemweg-sobstruktion und Entzündung. *Internist.* **31**:1-6, 1990.

- KUNKEL SL, CHENSUE SW, SPENGLER M. Effect of arachidonic acid metabolites and their inhibitors on interleukin 1 production. In: Kluger MJ et al (eds): The physiologic metabolic and immunologic actions of interleukin-1. Liss, New York, 297-307, 1985.
- LAPENNA D, DE GIOIA S, CIOFANI G, CUCCURULLO F. Ambroxol is a scavenger of hypochlorous and monochloramine. *Pharmacology* **49**:132-35, 1994.
- LEE S, YANG W, SHANN T, LUI W AND WANG, R. Comparison of nonspecific Radioimmunoassay, High-Performance Liquid Chromatography, and Fluorescence Polarization Immunoassay for Cyclosporine monitoring in renal transplantation. *Ther. Drug Monit.* **13**:152-156, 1991.
- LEIGH DA and SIMMONS K. Effect of clindamycin and lincomycin therapy on faecal flora. *J. Clin. Pathol.* **31**:439-44, 1978.
- LERNER PI. Penetration of cephalotin and lincomycin into the cerebrospinal fluid. *Am. J. Med. Sci.* **257**:125-31, 1969.
- LEWIS C, CLAPP HW and GRADY JE. Chemistry of lincomycin, a new antibiotic drug. *Antimicrob. Agents Chem.* **570**, 1963.
- LILLEHOJ HE, MALEK TR, SHEVACH EM, Differential effect of Cyclosporin A on the expression of T and B lymphocyte activation antigens. *J. Immunol.* **133**:244-50, 1984.
- LIND J. A treatise of the scurvy. Edinburgh: Sands Murray & Cochran (eds) , 1753.
- LOUIS PCA. Essay on clinical instruction. London: S. Highley (ed), 1834.
- LUO WH, YIN BZ, ANG CYW, RUSHING L, THOMPSON HC. Determination of lincomycin residues in salmon tissues by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr.* **687**(2):405-11, 1996.
- MAEDA H. The effects of mucosolvan on the lung-thorax compliance of prematurely delivered rabbit neonates. *Jap. Pharm. Ther.* **9**(2), 41-4, 1981.
- McCALL CE, STEIGBIGEL NH and FINLAND M. Lincomycin: activity in vitro and absorption and excretion in normal young man. *Am. J. Med. Sc.* **47**:151-55, 1967.

- McGEHEE RF Jr, SMITH CB, WILCOX C, FINLAND M. Comparative studies of antibacterial activity in vitro, and absorption and excretion of lincomycin and clindemycin. *Am. J. Med. Sc.* **256**:279-92, 1968.
- McMILLAN RM, FOSTER SJ. Leucotriene B4 and inflammatory disease. *Agents Actions* **24**:114-19, 1989.
- MAGAE J, MATSUBARA H, AOTSUKA N, KUBASAWA K, SHEARER GM. Interleukin-2 does not overcome suppression of graft rejection by cyclosporin A: effect of cyclosporin A on properties in vivo. *Cell. Immunol.* **173**:276-81, 1996.
- MANSON DJ, DIETZ A, DE BOER C. Lincomycin, a new antibiotic agent. *Antimicrob. Agents Chem.* **554**, 1962.
- MAURER G & LAMAIRE M. Biotransformation and Distribution in Blood of Cyclosporine and its Metabolites. *Transplant. Proc. Vol XVIII, No 6, Suppl 5*, dec. 25-34, 1986.
- MCBRIDE JH, KIM SS, RODGERSTON DO, REYES AF, OTA MK. Measurement of Cyclosporine by Liquid Chromatography and Three Immunoassays in Blood from Liver, Cardiac, and Renal Transplant Recipients. *Clin. Chem.* **38**:11, 2300-2306 (1992).
- MENCIA-HUERTA JM, DOUGLAS B, BRAQUET P. Immunologic reactions in asthma. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **10**:337-53, 1990.
- MERION RM, WHITE DJ, THIRU S, EVANS DB, CALNE RY. "Cyclosporine: Five Year's Experience in Cadaveric Renal Transplantation", *New Engl. J. Med.* **310** (3), 148-54, 1984.
- MICHEL FB, GODARD PH, BOUSQUET J. Usefulness of bronchioalveolar lavage in asthmatics. The right clinical practice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **88**:101-07, 1989.
- NAGAOKA S & KASE Y. Pharmacological study of ambroxol (NA 872). *Jap. Pharm. Ther.* **9**(5):127-36, 1981.
- NIEDERBERGER W, LEMAIRE G, MAURER G, NUSSBAUMER K, WAGNER O. Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. *Transpl. Proc. XV (suppl 1)* 2419-22, 1983.
- NOBILIS M, PASTERA J, SVOBODA D, KVETINA J. High-performance liquid chromatographic determination of ambroxol in human plasma. *J. Chromatogr.* **581**:251-255, 1992.

- NOWAK D. ANTCZAC A, PIETRAS T, BIALASIEVIWICZ P, KROL M.
Protective effect of ambroxol against heat and hydrogen peroxide-induced damage to lung lipids in mice. *Eur. Resp. J.* **7**:1629-34, 1994
- NOWAK D. ANTCZAC A, PIETRAS T, BIALASIEVIWICZ P, KROL M.
Antioxidant properties of ambroxol. *Free Rad. Biol. Med.* **16**:517-22, 1994b.
- O'FLAHERTY JT. Phospholipid metabolism and stimulus-response coupling. *Bioch. Pharmacol.* **36**:407-12, 1987.
- PALACIOS, R. Concanavalin A triggers T-lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J. Immunol.* **128**:337-42, 1982.
- PENN I. Lymphoma complicating organ transplantation. *Transpl. Proc.* **XV** (suppl 2):2790-98, 1983.
- PESTKA S. Studies on transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. Effects of antibiotic on peptidyl puromycin synthesis on polyribosomes from *E coli*. *J. Biol. Chem.* **247**:4669-78, 1972.
- PRYZANSKI W, VADAS P. Phospholipase A2 – a mediator between proximal and distal effectors on inflammation. *Immunol. Today.* **12**:143-6, 1991.
- RAPHAEL GD, METCALFE DD. Mediators of airways inflammation. *Eur. Resp. Dis.* **69**(suppl 147) 44-56, 1986.
- REEM GH, COOK LA, VILECK J. Interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by cyclosporine A. *Science* **221**:63-65, 1983.
- RENOVANZ KD. Ergebnisse einiger klinisch-pharmakologischer Untersuchungen mit ambroxol (NA-872). *Arzneim-Forsch* **25**:646-52, 1975.
- RYFFEL B. Experimental toxicological studies with cyclosporin A. in: Whirte D (ed) *Cyclosporin A*. Elsevier Biomedical, ch **5**, pp 45-75, 1982.
- RYFFEL, B., FOXWELL, B.M., MIHATSCH, M.J., DONATSCH, P., MAURER, G. Biologic significance of cyclosporine metabolites. *Transplant. Proc.* **29**, suppl 2:575-84, 1988.
- SANGHVL A, DIVEN W, SOLTMAN H AND STARZ T. Abbot fluorescence polarization immunoassay for Cyclosporine and metabolites compared with Sandoz "Sandimmune"RIA. *Clin. Chem.* **34**:9.1904-1906 (1988).
- SCHREIBER SL and CRABTREE GR The mechanism of action of Cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* vol **13** No.4 1992.

- SCHMID J. Assay of ambroxol in biological fluids by capillary gas-liquid chromatograph. *J. Chromatogr.* **414**:65-75, 1987.
- SCHROEDER TJ, WADHWA NK, PESCE AJ. First, M.R. Na acute overdose of Cyclosporine. *Transplantation* **41**:406-409.
- SENDA M, HIROSHI K. Mucosolvan in cystic fibrosis. *Jap. Pharm. Ther.* **9**(2):37-40, 1981.
- SGOUTAS D, MACMAHON W, LOVE A, JERKUNICA I. Interaction of cyclosporin A with human lipoproteins. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**:583-8, 1986.
- SMART RJ, RAMSDEN A, GEAR MWL. Severe pseudo-membranous colitis after lincomycin and clindamycin. *Br. J. Surg.* **63**:25-9, 1976.
- SMITH RB, LUMMIS WL, MONOVICH MS, DeSANTE KA. Lincomycin serum and saliva concentrations after intramuscular injections of high doses. *J. Clin. Pharmacol.* **21**:411-17, 1981.
- SPEER ME, MASON EO, SCHAMBERG JT. Cerebrospinal fluid concentrations of aqueous procaine penicillin G in neonates. *Pediatrics* **67**:387-91, 1981.
- STRAUSZ J, MULLER-QUERNHEIN J, STEPPLING H, FERLINZ R. Oxygen radical production by alveolar inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Ver. Resp. Dis.* **141**:124-8, 1990.
- SUTTON HG. Cases of rheumatic fever treated for the most part by mint water. *Guy's Hosp. Rep.* **2**:392, 1865.
- SYNETOS D, COUTSOGEOGROPOULOS. Studies on the catalytic rate constant of ribosomal peptidyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta.* **923**:275-85, 1987.
- THOMAE K. Ambroxol. *Drugs Today.* **15**(12):523-31, 1979.
- TREDGER JM, GONDE CE and WILLIAMS R. Monitoring Cyclosporine in Liver-Transplant Recipients: Effects of Clinical Status on the Performance of Two Monoclonal Antibody-Based Methods. *Clin. Chem.* **38**:1, 108-113 (1992).
- TUTSCHKA PJ. "Cyclosporin A as a Tool for experimental and Clinical Transplantation", *Biomedicine*; **36**:341, 1982a.
- TUTSCHKA PJ. "Cyclosporin A - Immunobiological Aspects", *Hepatology*; **2**(5):645, 1982b.

- WARDLAW AJ, HAY G, CROMWELL O, COLLINS JV, KAY AB. Leukotrienes, LTC₄ and LTB₄ in bronchial asthma and other diseases. *J. Allerg. Clin. Immunol.* **84**:19-26, 1989.
- WENGER R. Synthesis of Cyclosporine and analogues: Structure, Activity, Relationships of New Cyclosporine Derivatives, Transplantation Proceedings, Vol. XV, N° 4, Suppl. 1 (December), 1983.
- WEILAND JE, DAVIS WB, HOLTER JF, MOHAMMED JR, DORINSK PM, GADEK JE. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. *Am. Ver. Resp Dis.* **133**:218-22-5, 1986.
- WHITE DJG. "Cyclosporin A Clinical Pharmacology and therapeutic Potential", *Drugs*; **24**:332, 1982.
- WOLF BA, DAFT MC, KOENING JW, FLYE MW, TURK JW and SCOTT MG. Measurement of Cyclosporine in Whole Blood: HPLC and Radioimmunoassay with Specific Monoclonal Antibody and ³H- or ¹²⁵I-Labeled Ligand Compared. *Clin. Chem.* **35**:1, 120-124(1989).
- VOGT W and WEISCH I. Modified TDx® assay for Cyclosporine and metabolites, for use with whole blood samples. *Clin. Chem.* **34**:7, 1459-1461, 1988.
- VON AHSEN N, HELMHOLD M, SCHULTZ E, EISENHAUER T, ARMSTRONG VW, OELLERICH M. Cyclosporin A trough levels correlate with serum lipoproteins and apolipoproteins: implications for therapeutic drug monitoring of cyclosporine A. *Ther. Drug Monit.* **19**:140-5, 1997.
- WANG P, MEUCCI V, SIMSON E, MORRISON M, LUNETTA S, ZAJAC M, BOECKX RA. A monoclonal antibody fluorescent polarization immunoassay for cyclosporine. *Transplant Proc.* **22**:1186-8, 1990.
- WOOD AJ, MAURER G, NIEDERBERGER W, BEVERIDGE T. Cyclosporine: Pharmacokinetics, metabolism and drug interactions. *Transpl. Proc. XV* (suppl 2):2409-13, 1993.
- YALOW RS & BENSON AS. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184**:1648-49, 1959.
- YATSCOFF RW, RUSH DN, JEFFERY JR Effects of cyclosporin A Measured in plasma. *Clin Chem.* **30**(11):1812, 1984.

SUMMARY

The aim of this thesis was to perform three different studies on clinical pharmacology (clinical assays). The determination of pharmacokinetic values were used in order to compare two formulations (each assay) of the same drug, from different sources. We used $AUC_{[0-12(24) \text{ or } (48)h]}$, t_{max} and C_{max} to refer if the drugs are bioequivalent or not. All the clinical protocols were approved by the Ethics Committee of the UNICAMP University Hospital and all the subjects gave written informed consent.

Three groups of healthy, male volunteers were used in order to obtain the information. Each group was composed for two sub-groups for the respective study.

The drugs studied were: 1- cyclosporine oral solution (ciclospor from Biosintética versus sandimmun from Sandoz) 5mg/kg; 2- lincomycin capsules (lincomicina from Abbott versus lincocin from Upjohn) 500mg, and 3- ambroxol capsule - slow release (ambriel from Merck versus ambroxol from Euderma SPA) 75mg.

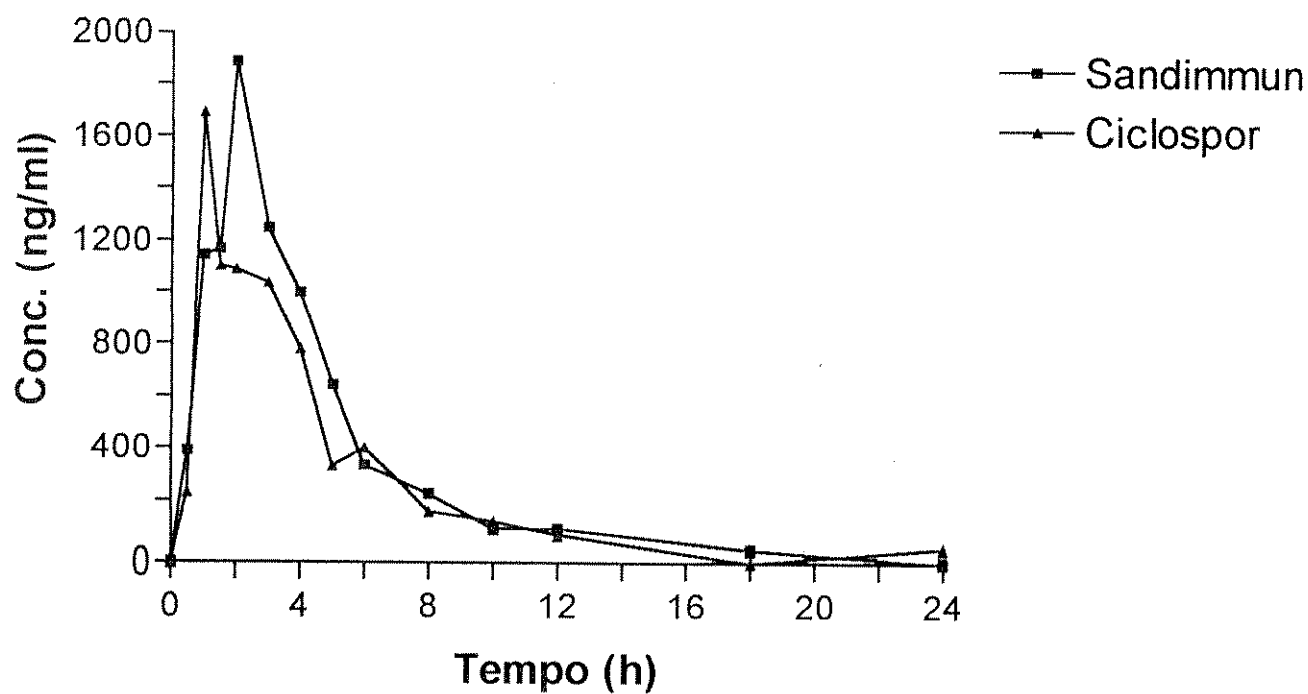
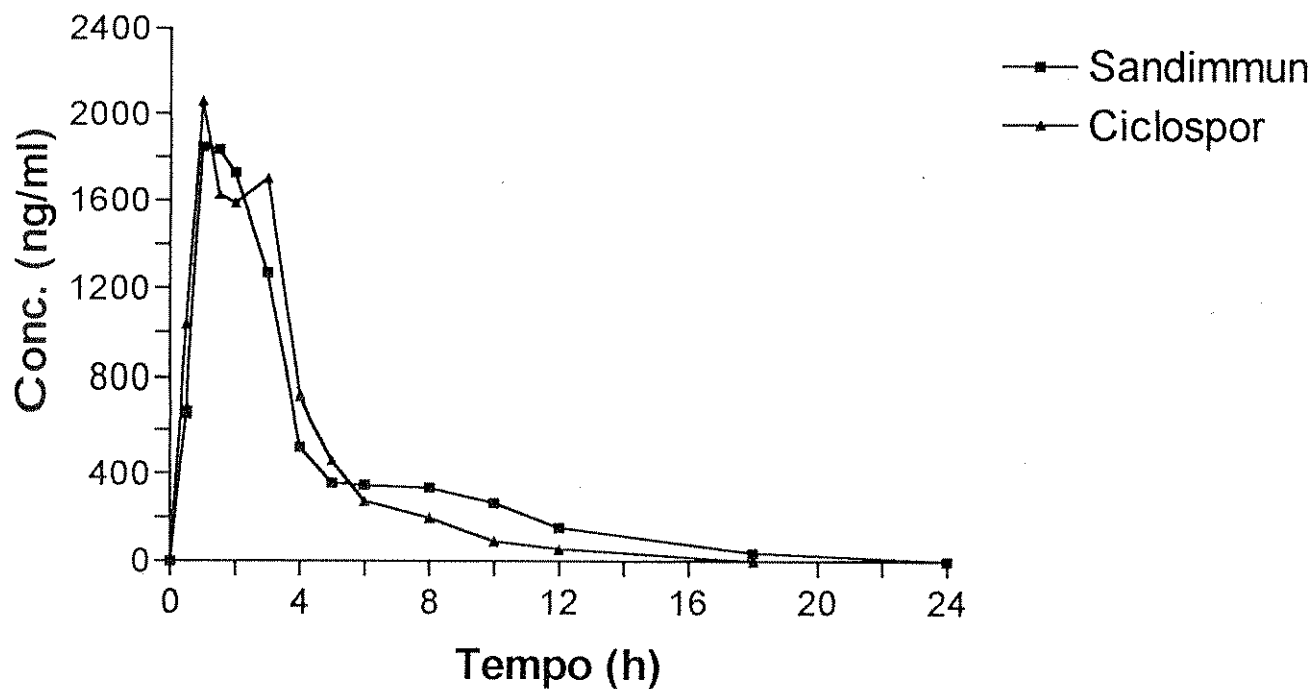
The studies were conducted in an open randomized two period crossover fashion with fourteen days washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 8:00 p.m. having already had a normal evening meal, and after an overnight fast they received at 7:00 a.m. a single dose equivalent to the correct study and according to the appropriated randomization code. After the capsule administration the volunteers were asked to drink 200ml of tap water.

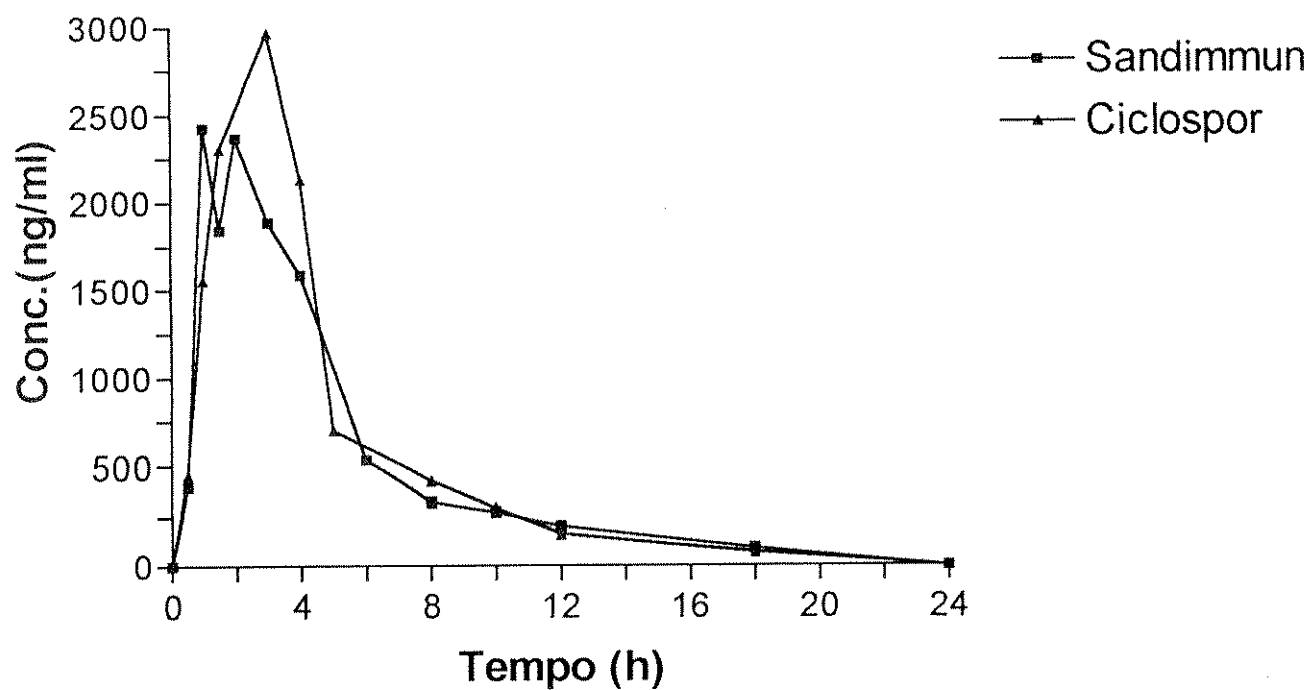
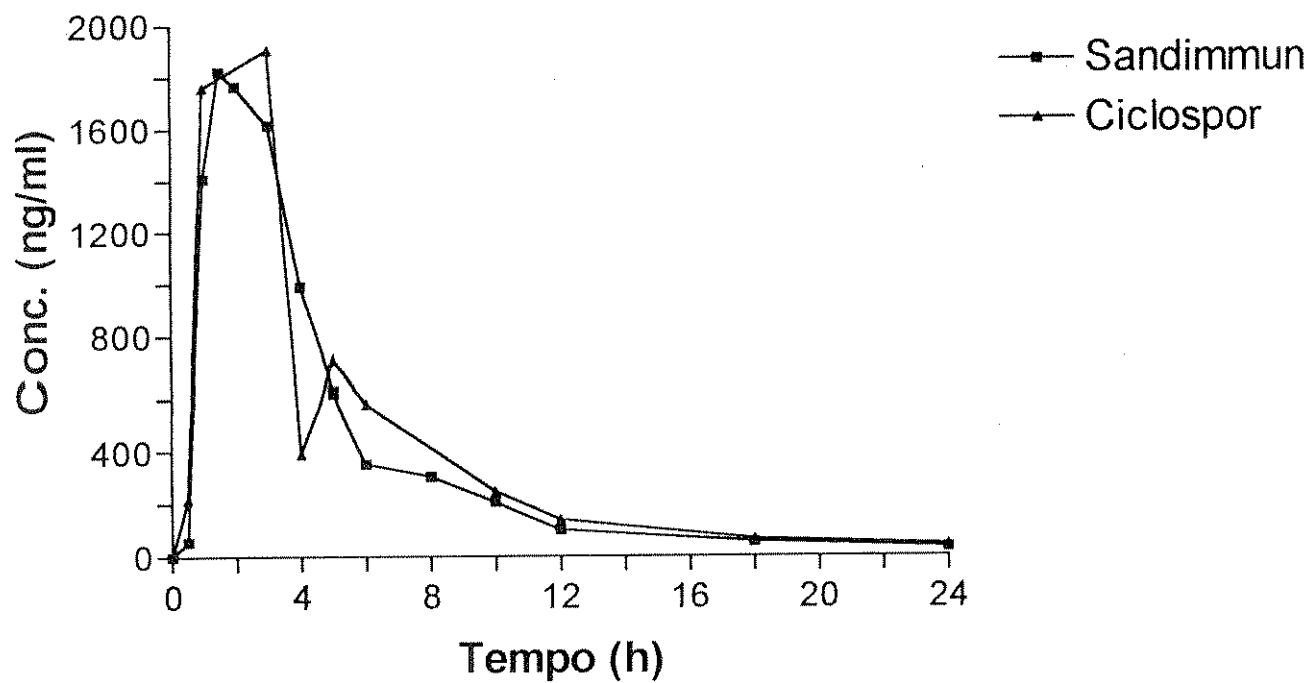
Blood samples were taken from suitable forearm vein before and at different intervals until 12h for lincomycin; 24h for cyclosporine and 48h for ambroxol. Each sample was treated according the specific methodology.

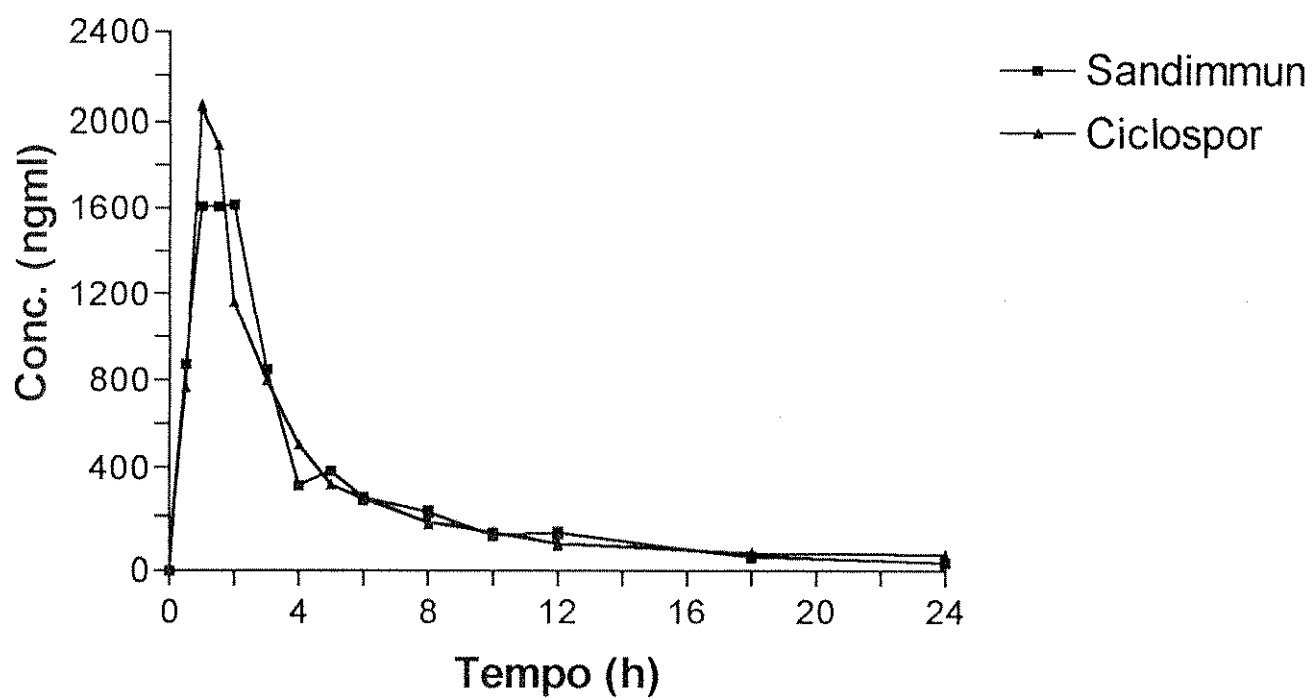
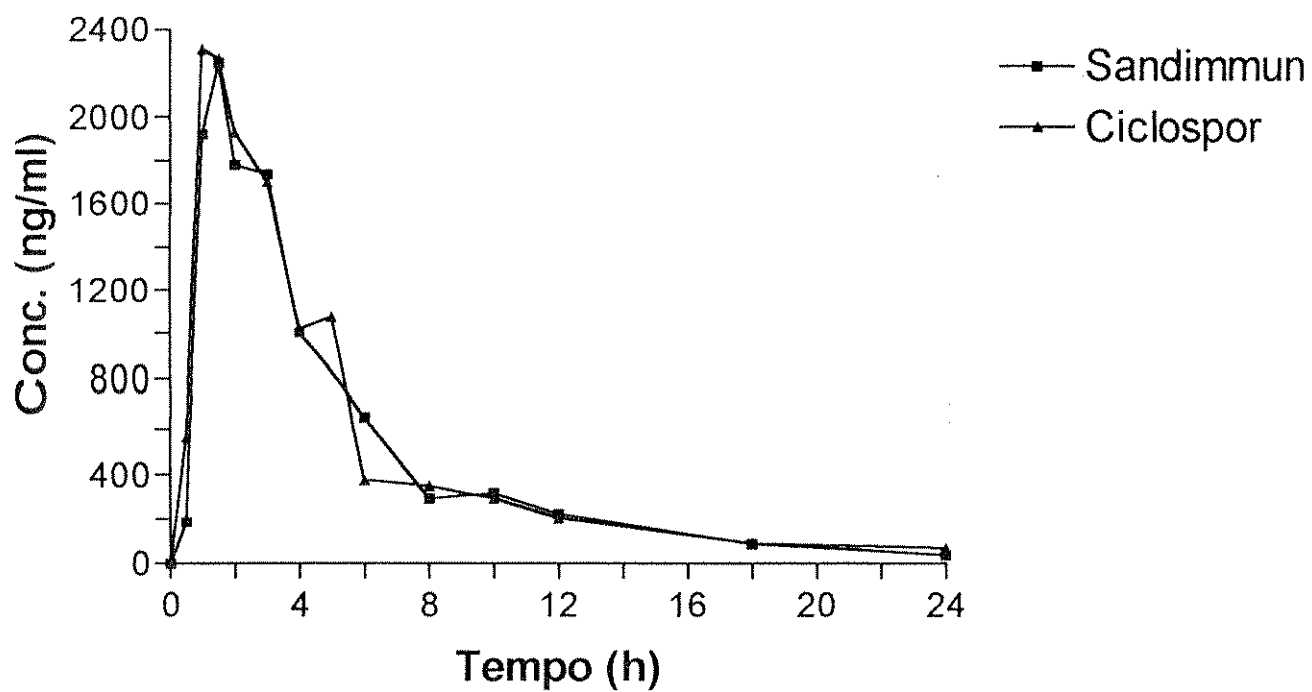
Radioimmunoassay (RIA) was the method choused for the cyclosporine whole blood determination

Estudo de bioequivalência entre duas formulações de ciclosporina (ciclospor- Biosintética e Sandimmun - Sandoz)

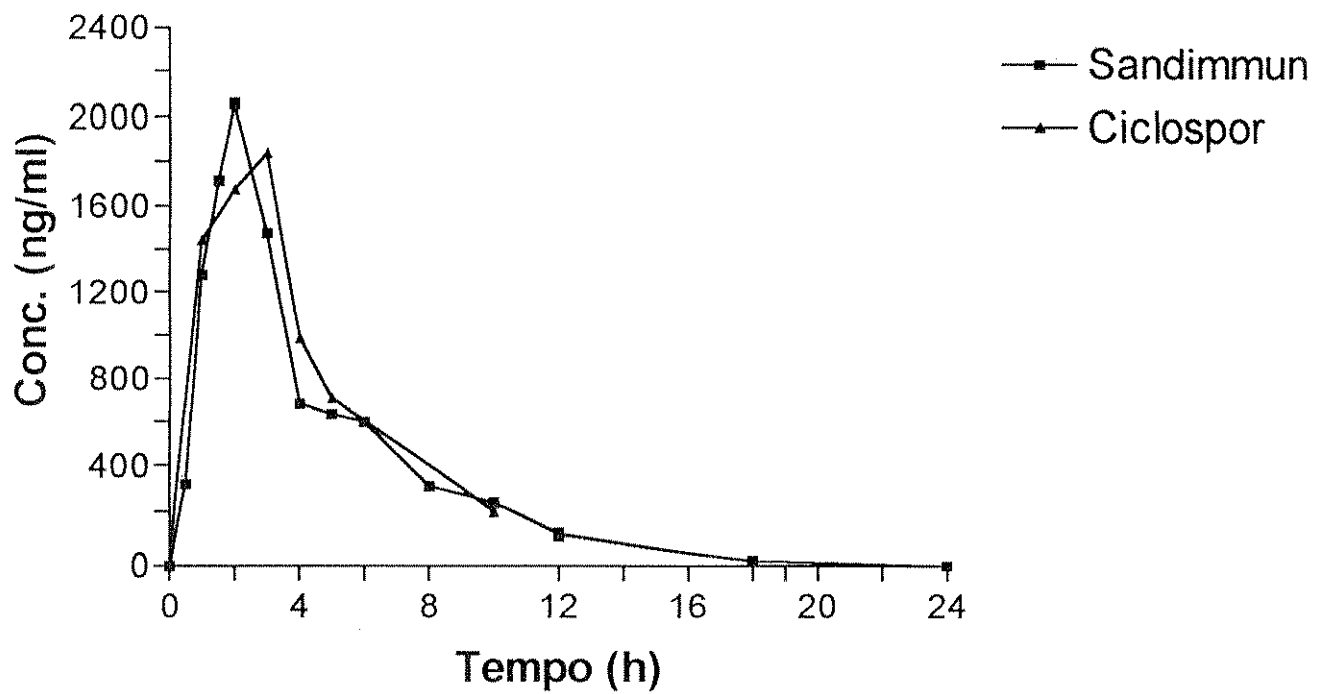
Gráficos com os valores individuais da concentração/tempo para os voluntários Vol 1 a Vol 24.

Vol1**Vol 2**

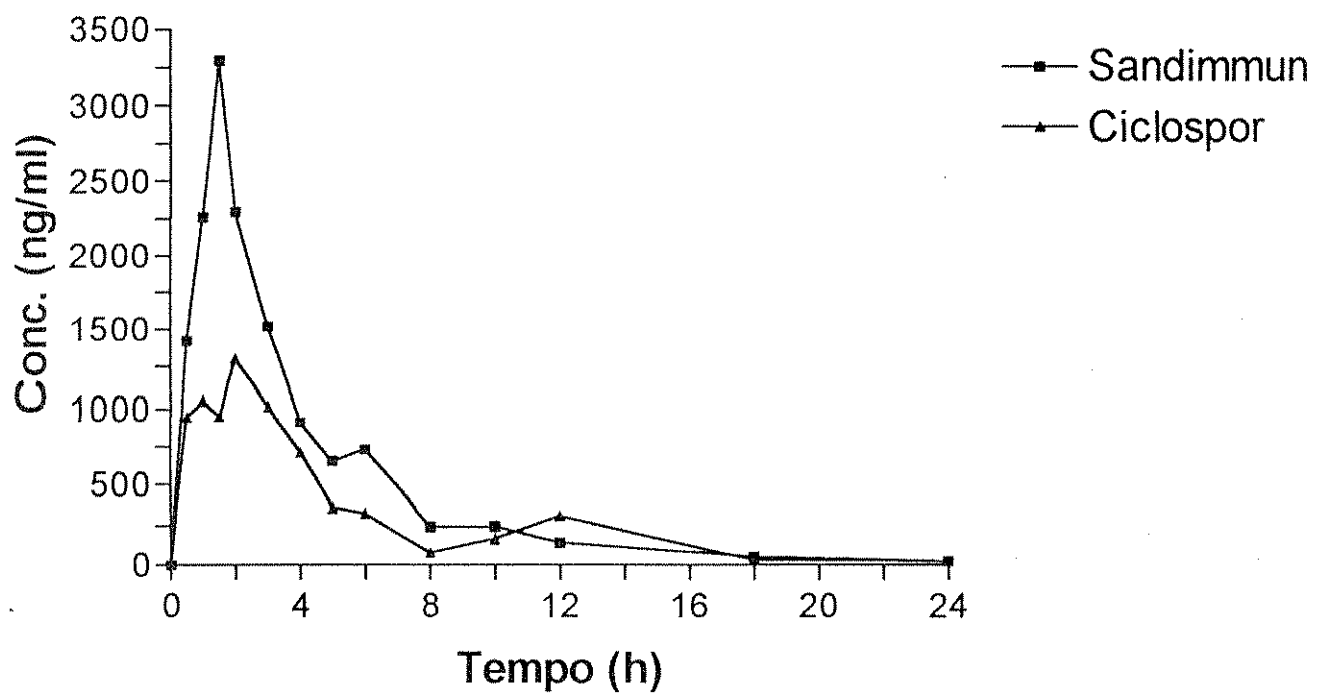
Vol. 3**Vol. 4**

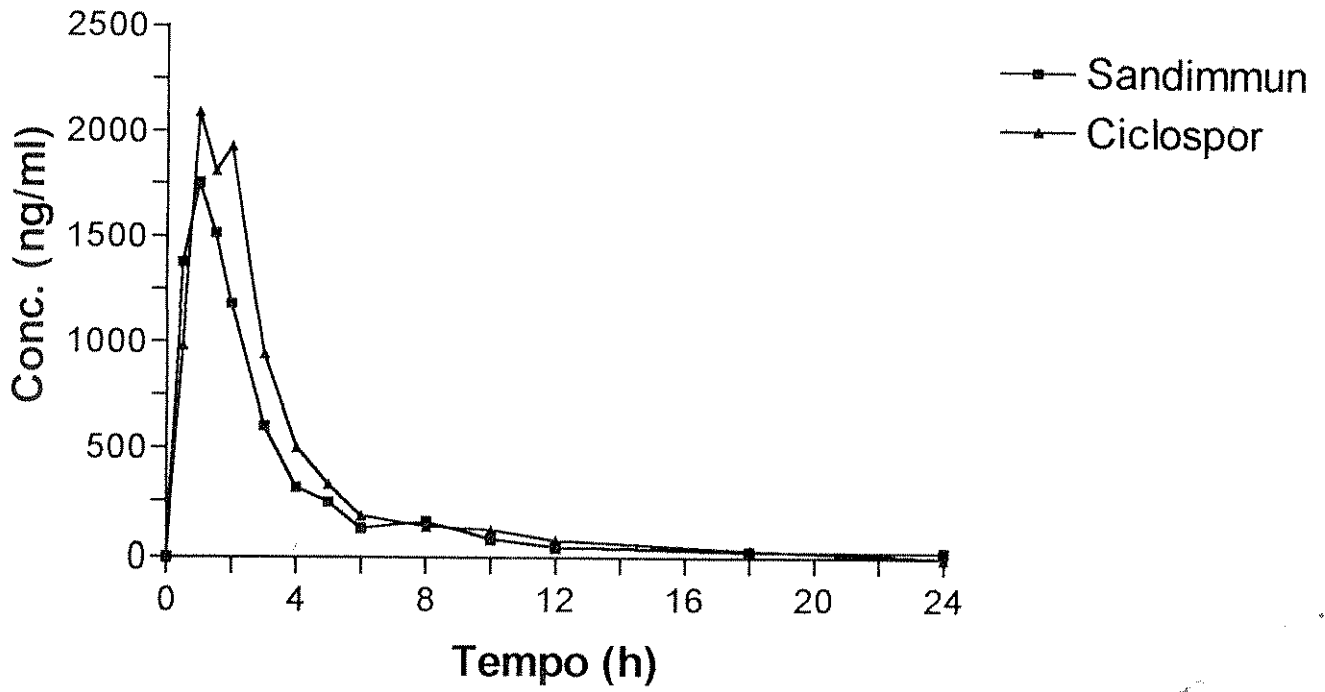
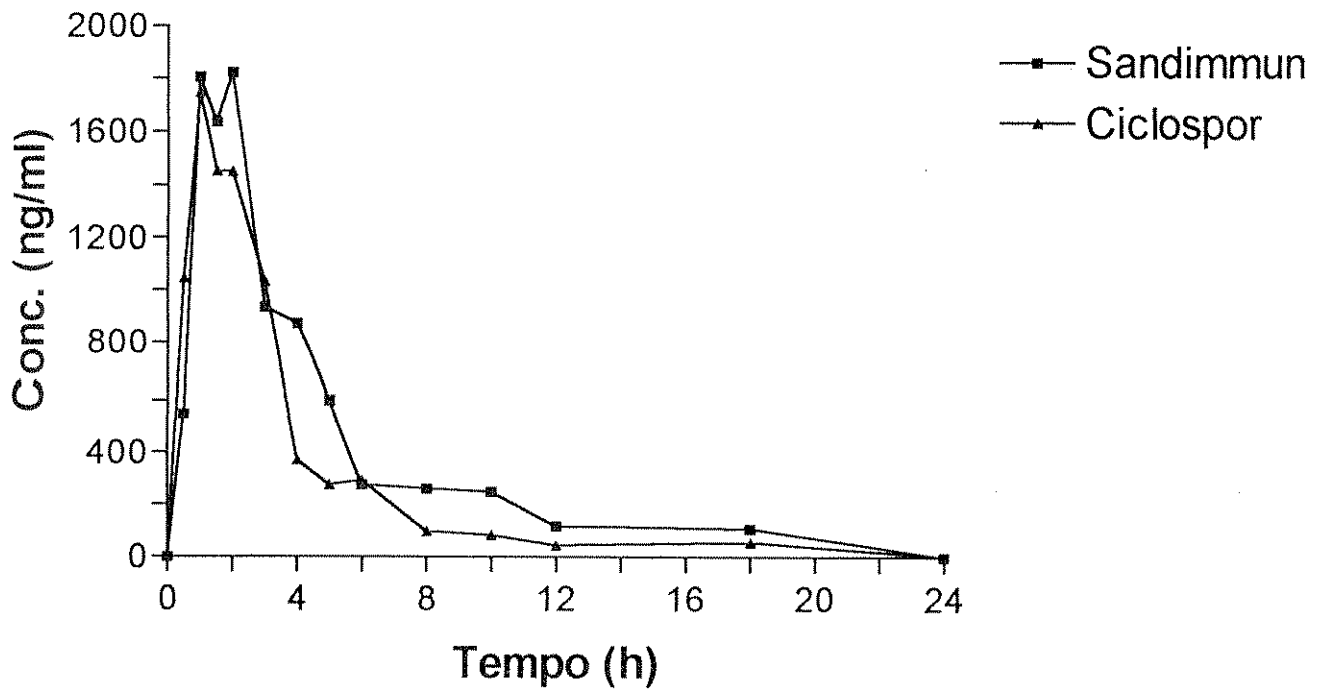
Vol. 5**Vol. 6**

Vol. 7

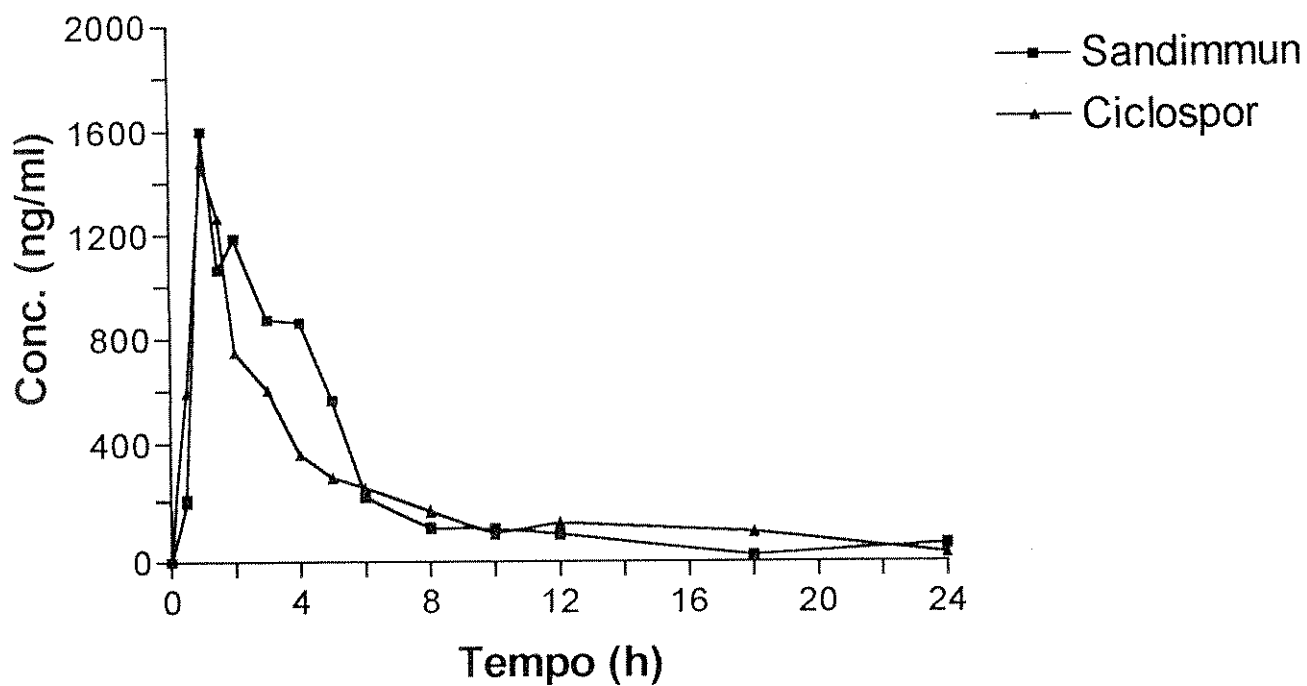


Vol. 8

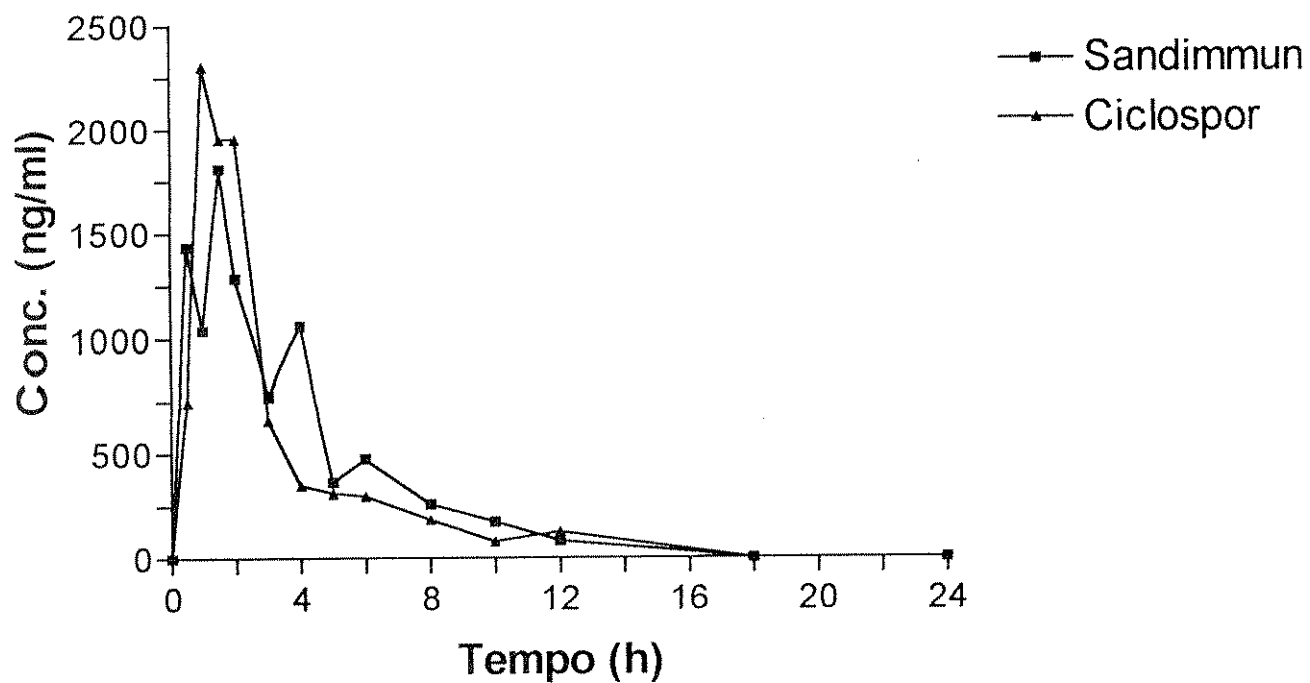


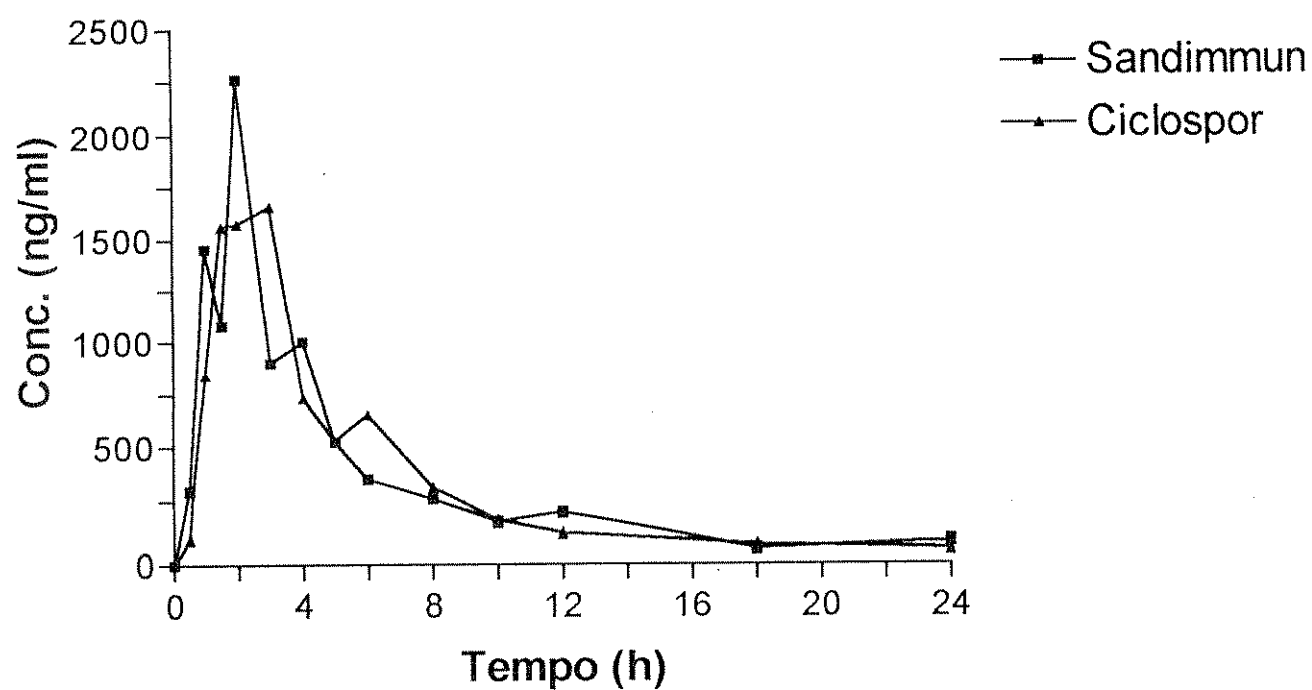
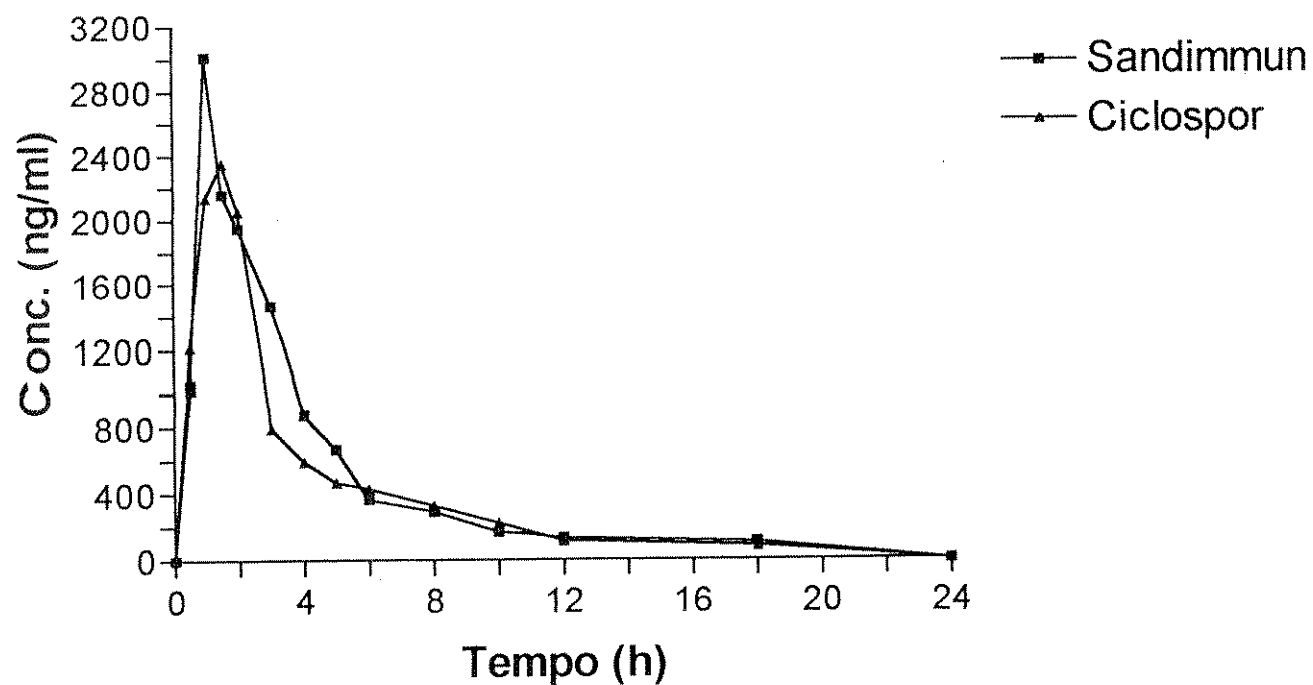
Vol. 9**Vol. 10**

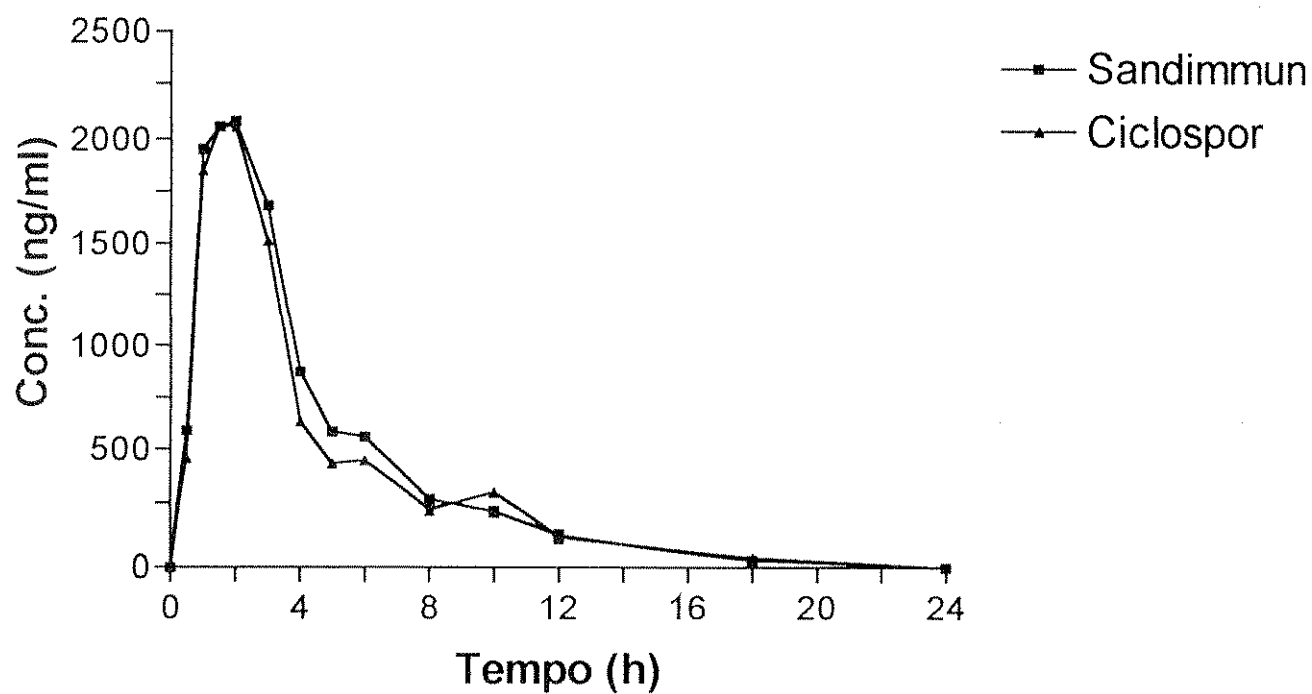
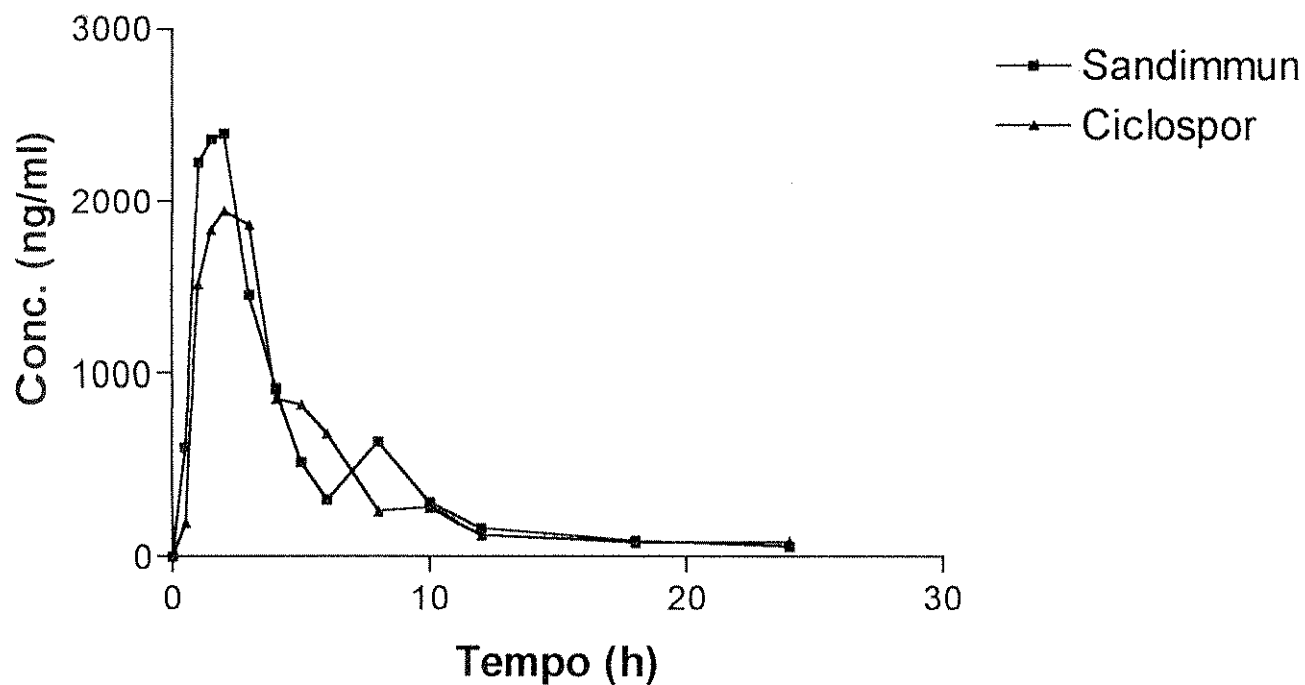
Vol. 11



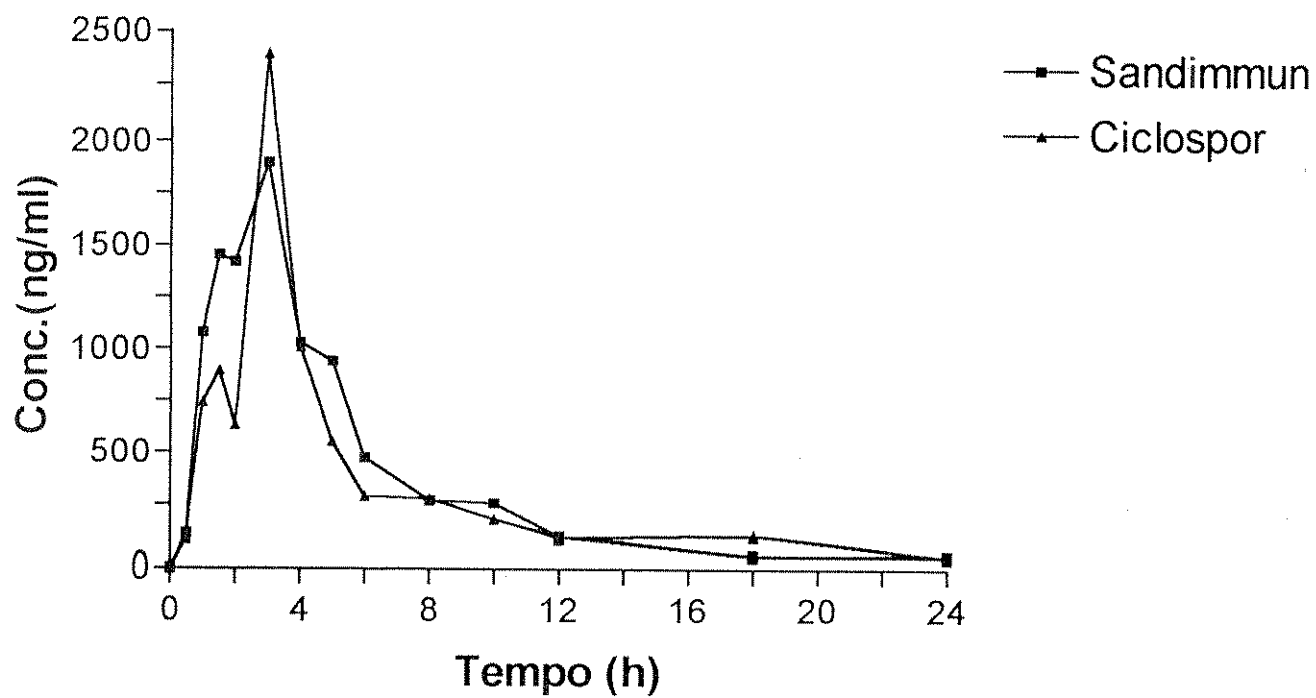
Vol. 12



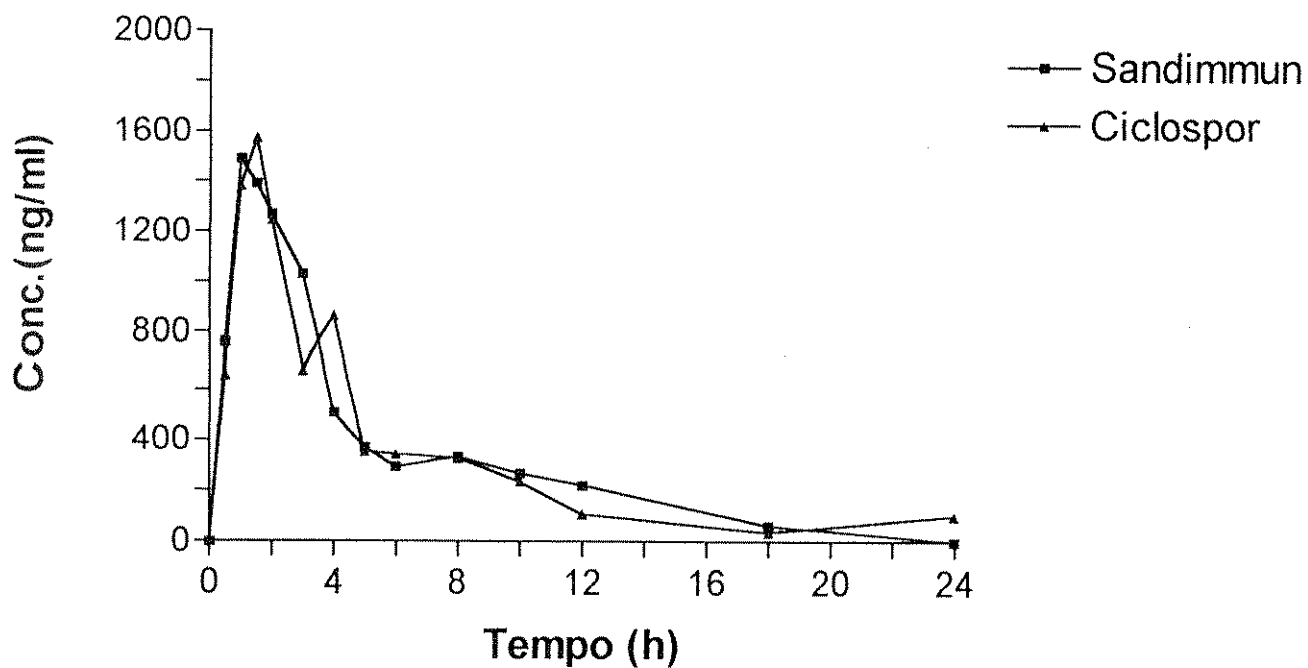
Vol. 13**Vol. 14**

Vol. 15**Vol. 16**

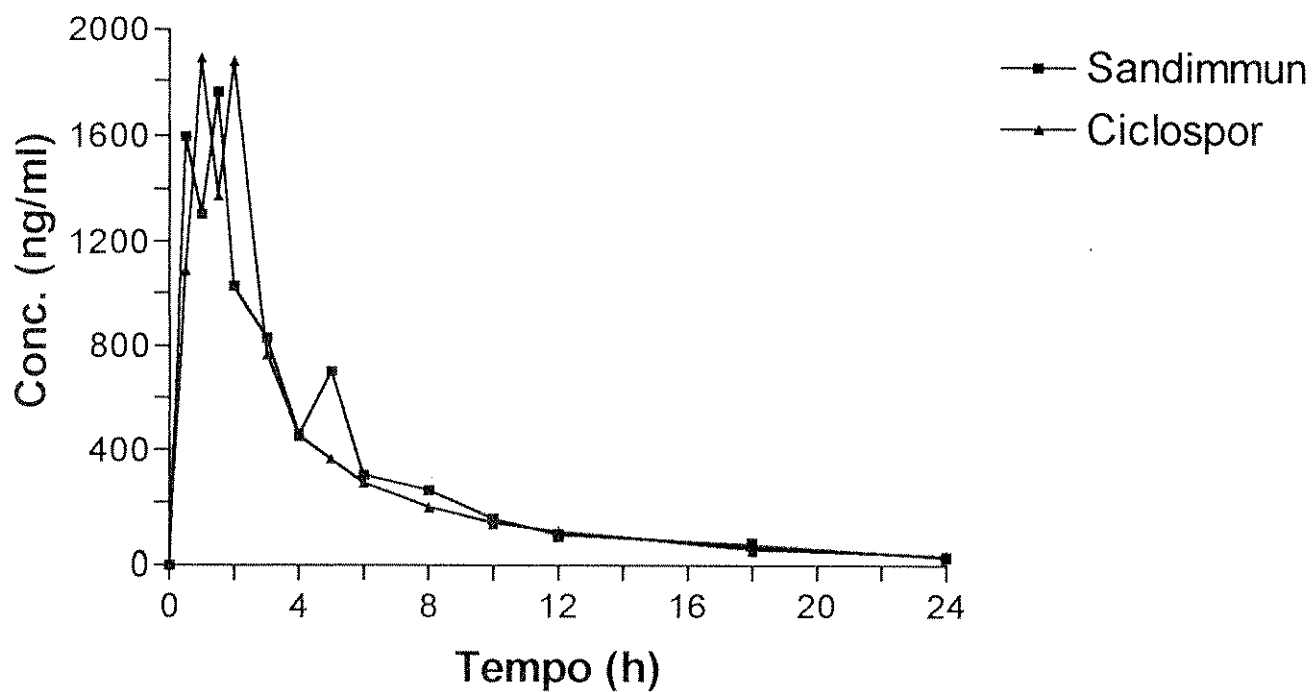
Vol. 17



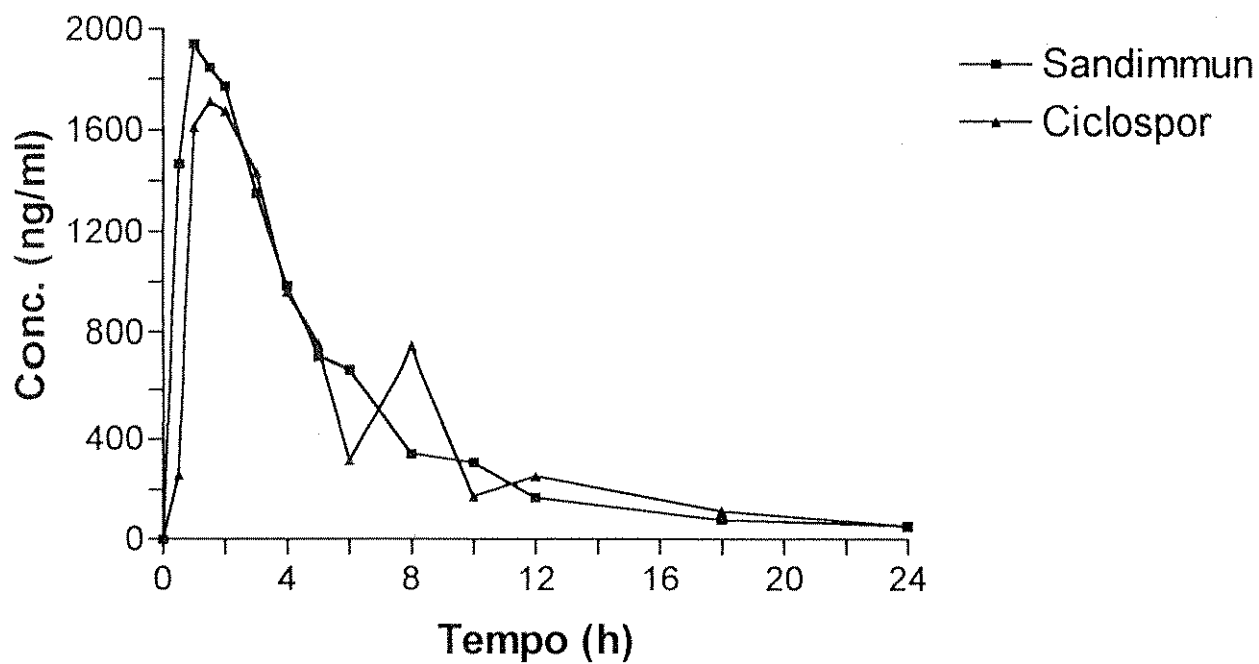
Vol. 18



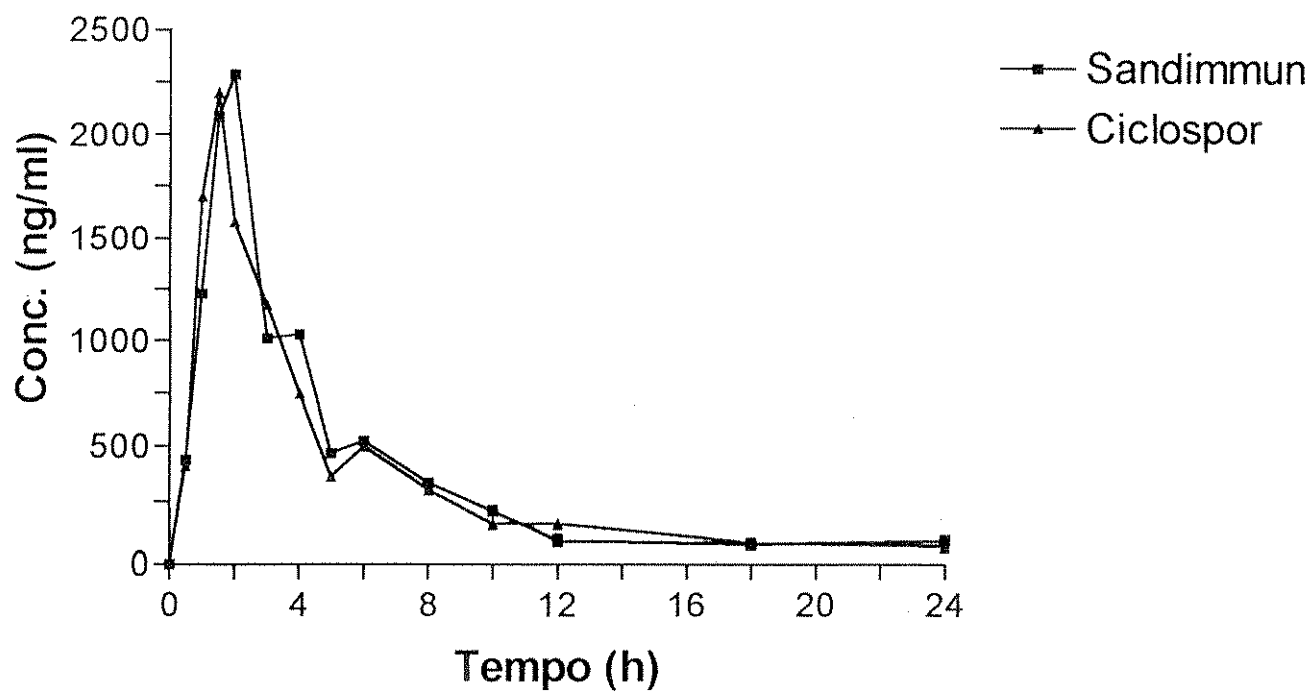
Vol. 19



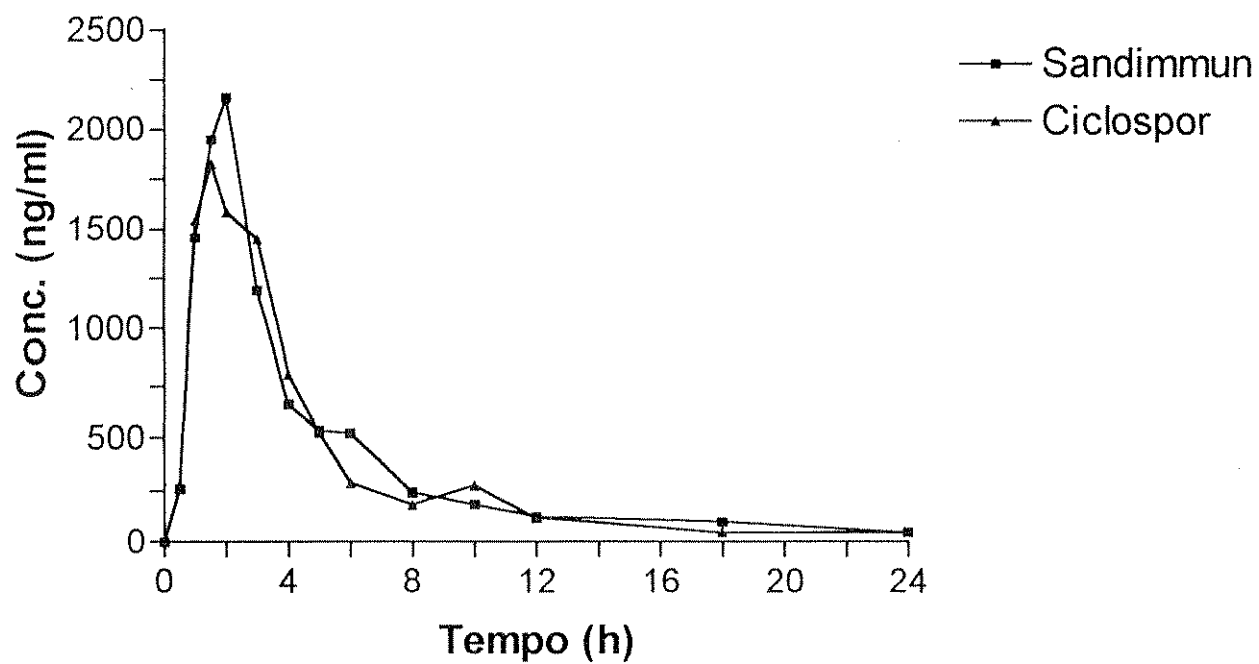
Vol. 20

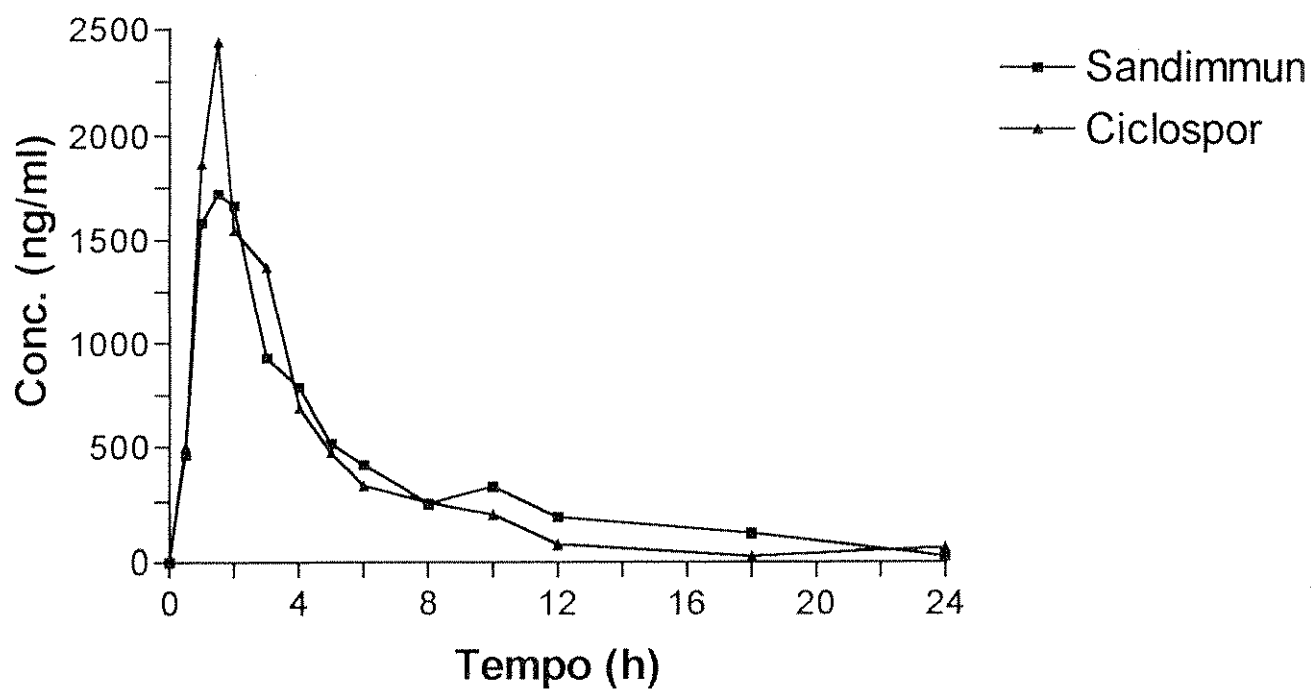
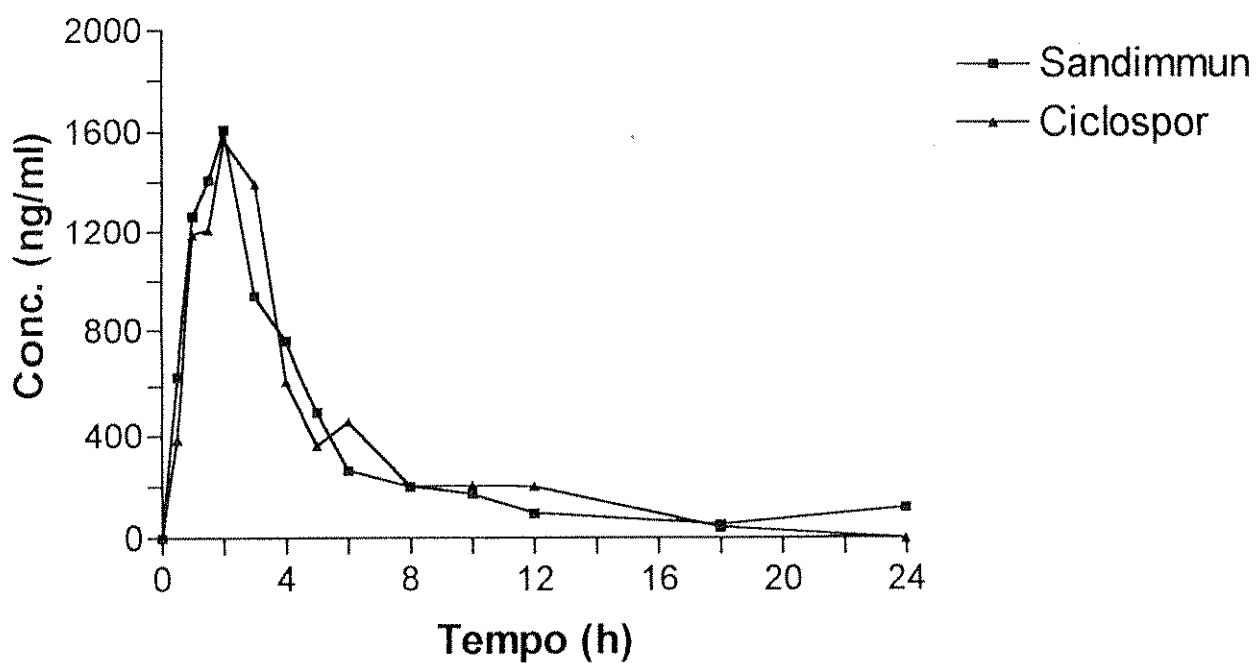


Vol. 21



Vol. 22

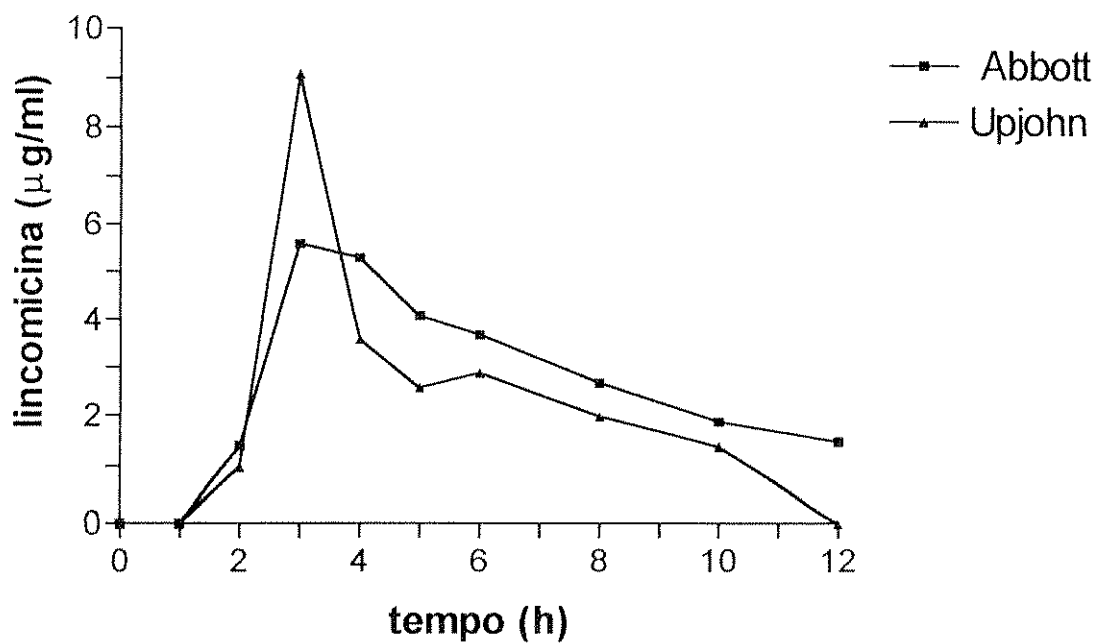


Vol. 23**Vol. 24**

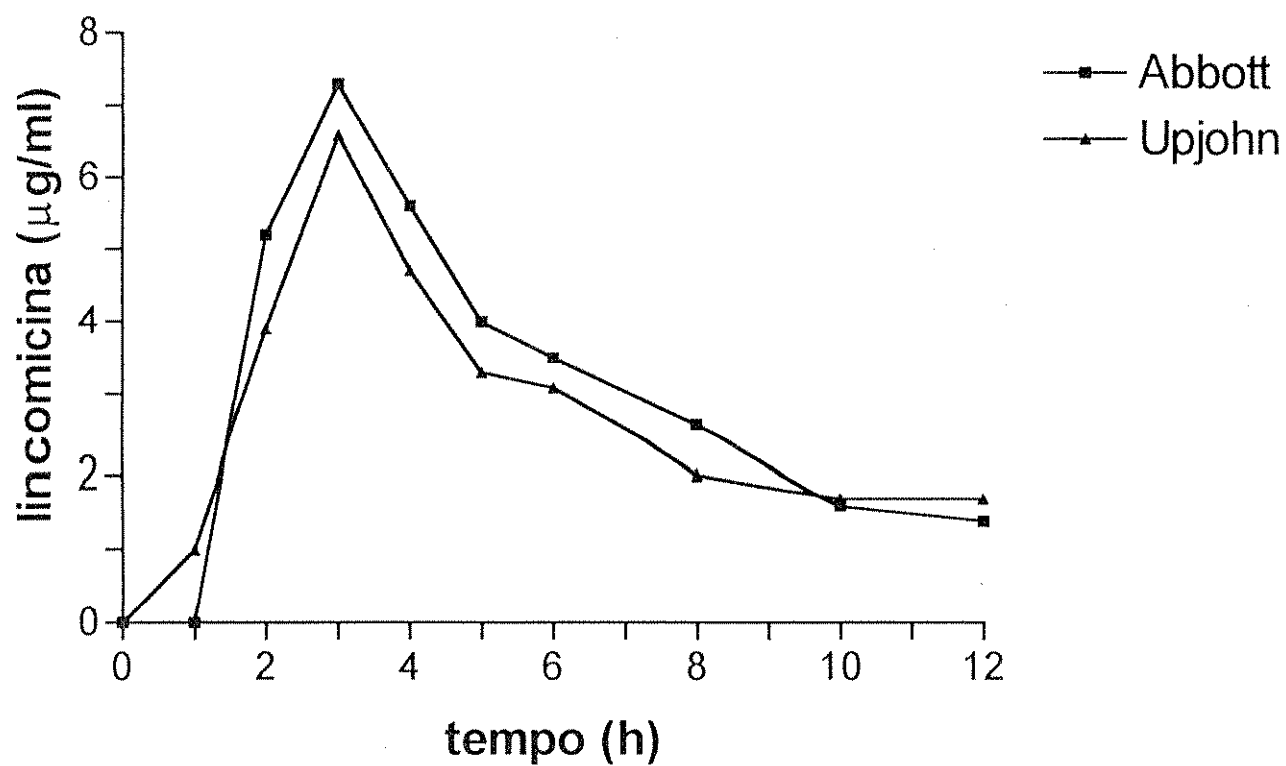
Estudo de bioequivalência entre duas formulações de lincomicina (lincocin - Upjohn e lincomicina Abbott)

Gráficos com os valores individuais da concentração/tempo para os voluntários Vol 1 a Vol 14.

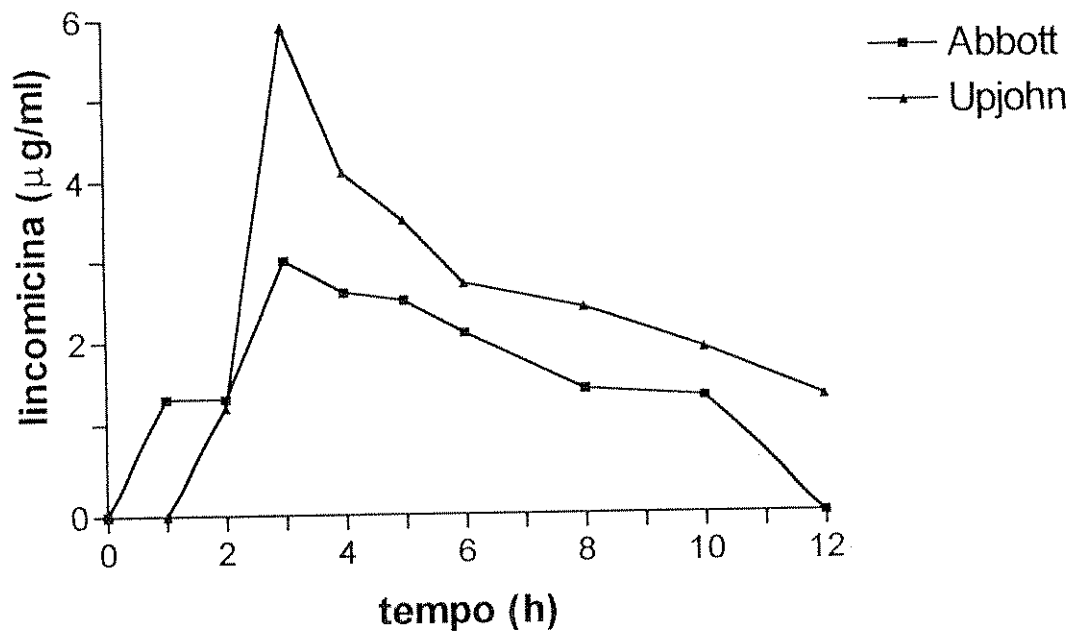
Vol. 1



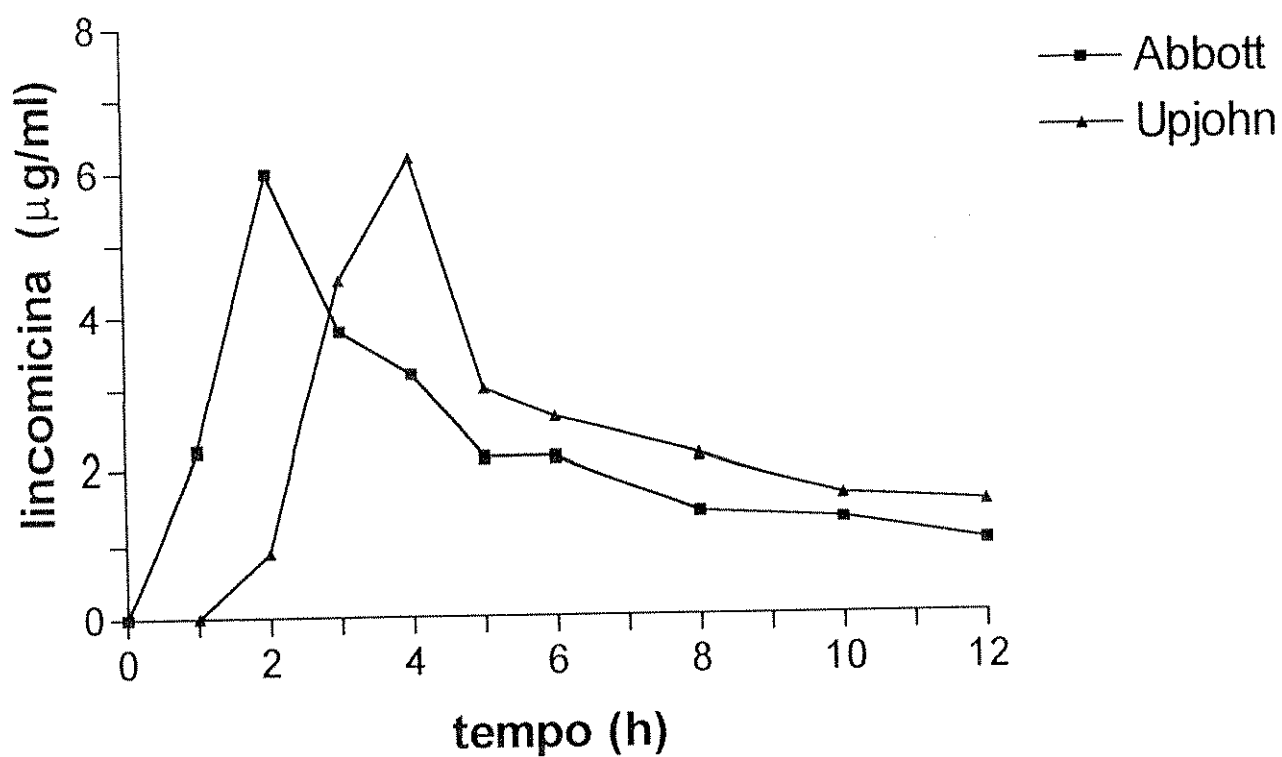
Vol. 2



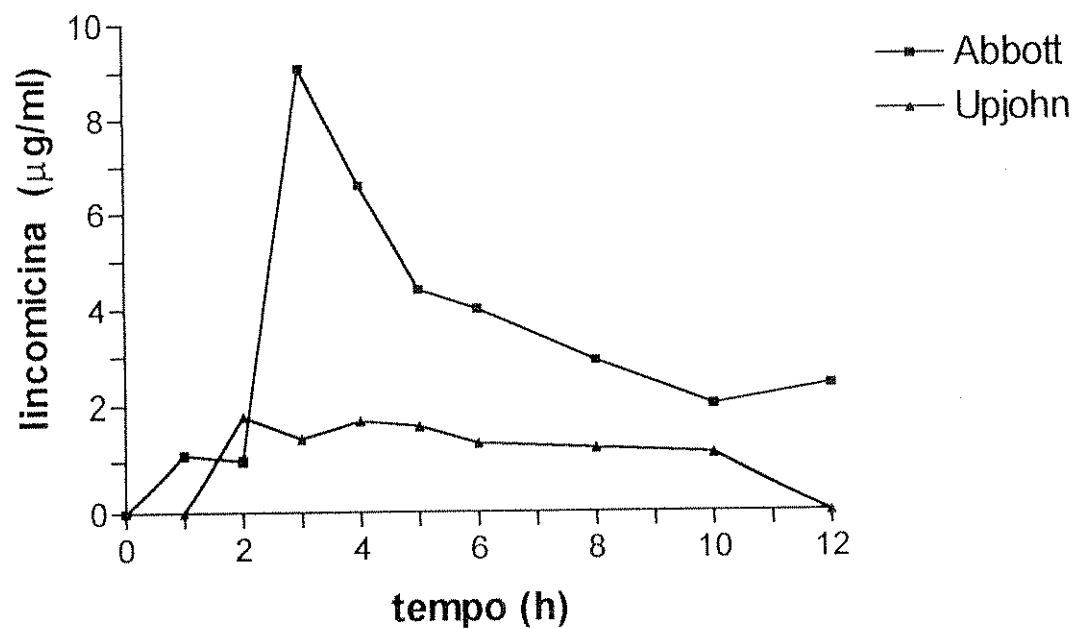
Vol. 3



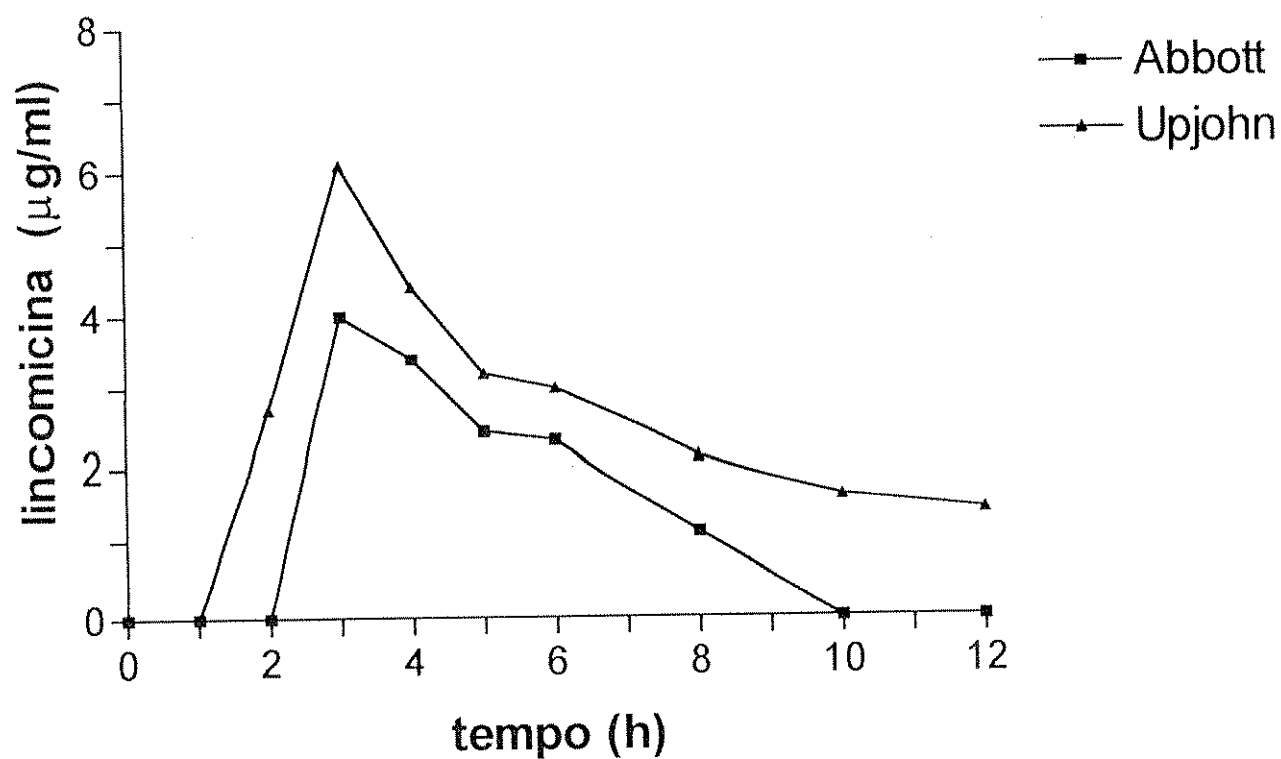
Vol. 4



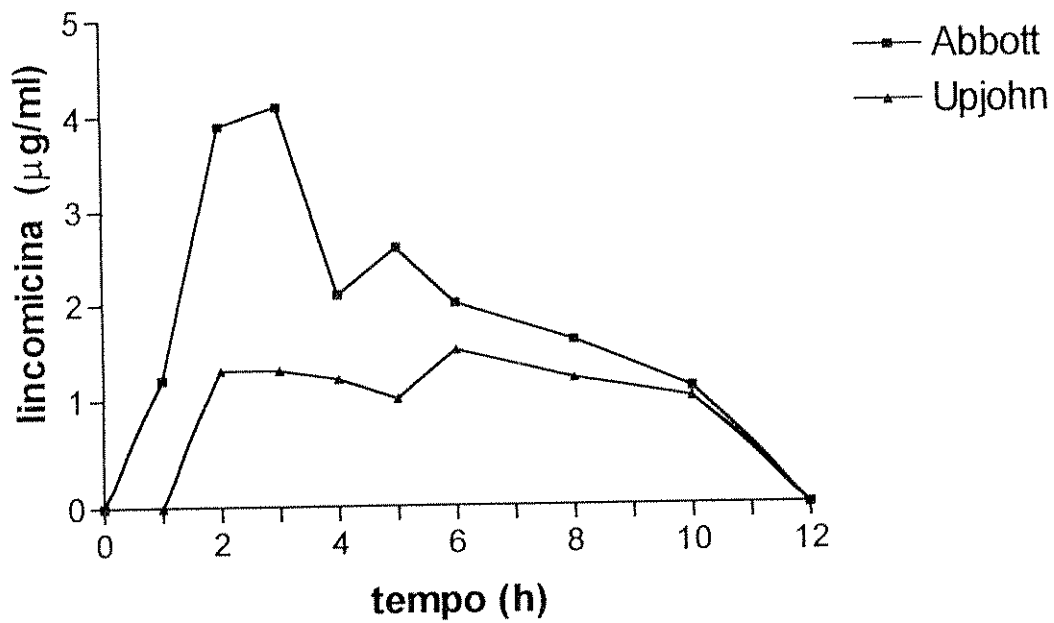
Vol. 5



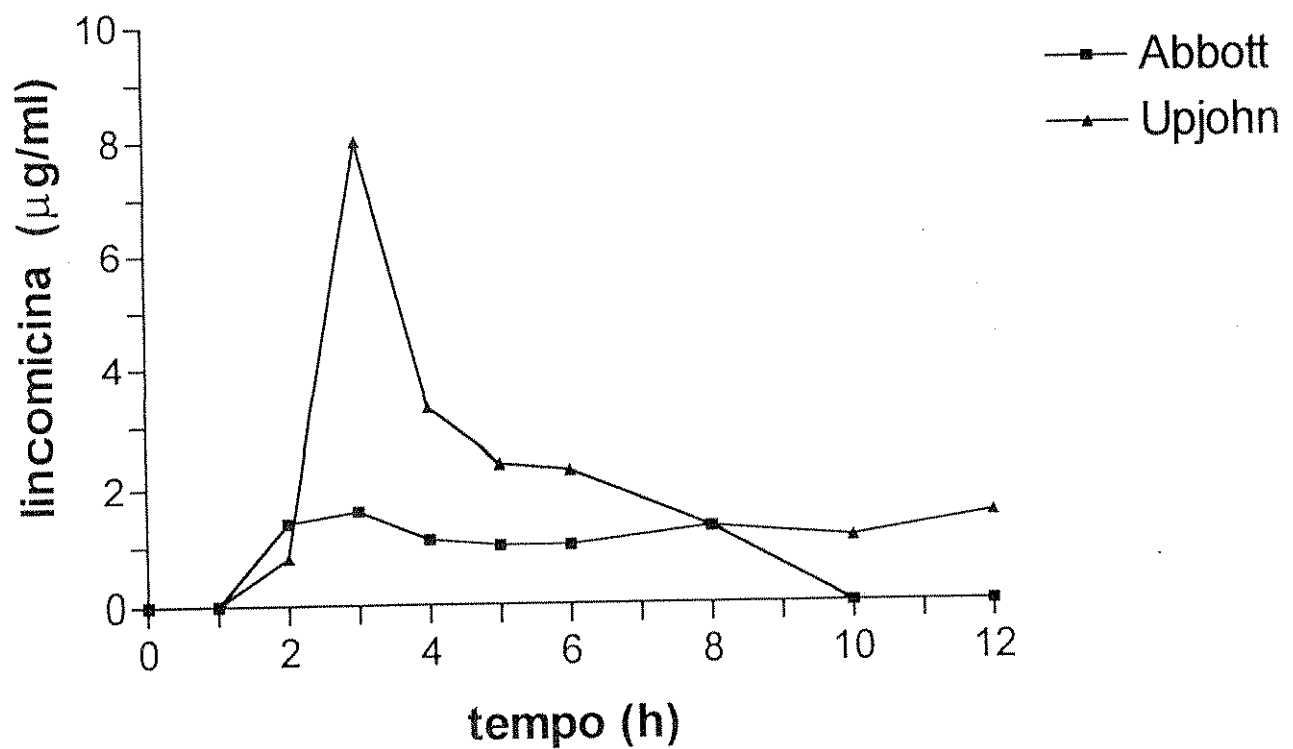
Vol. 6



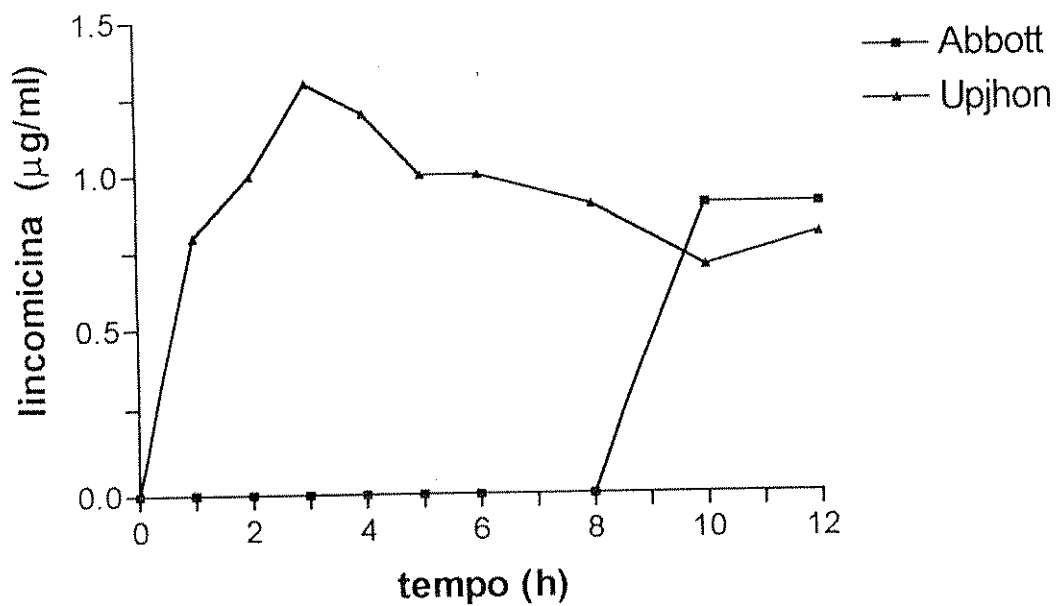
Vol. 7



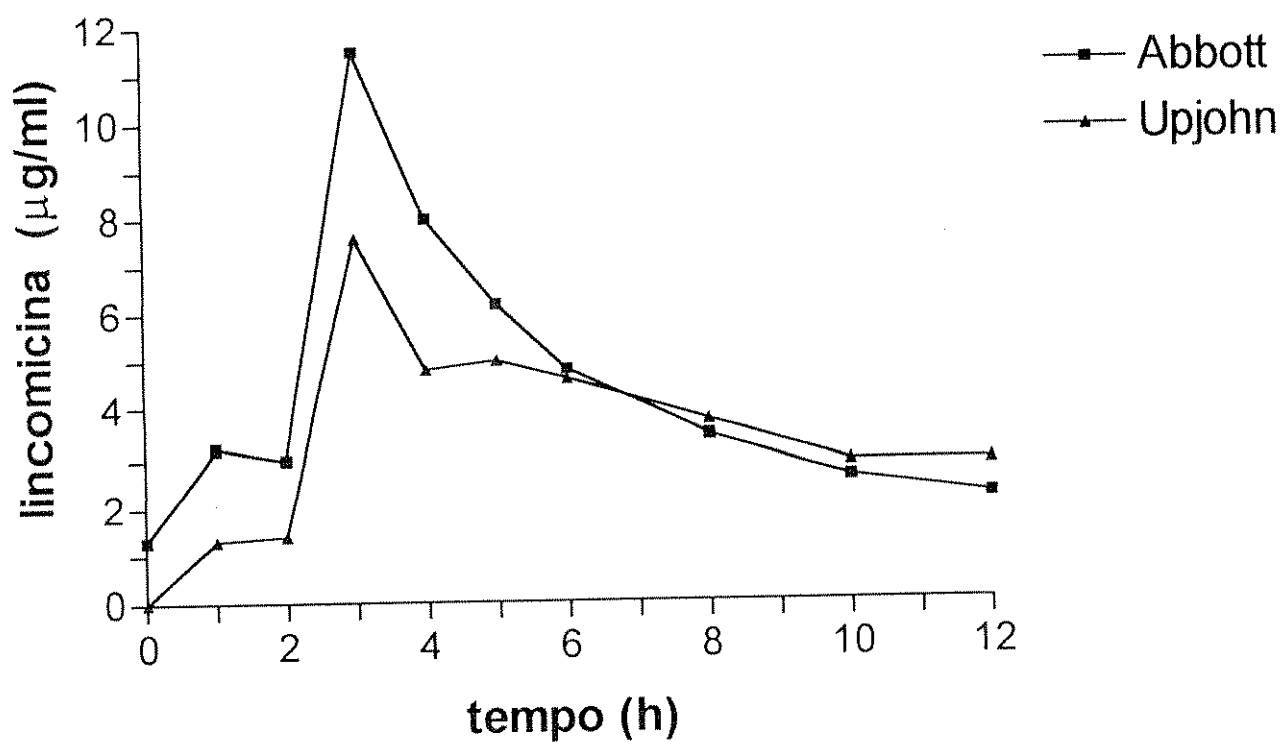
Vol. 8



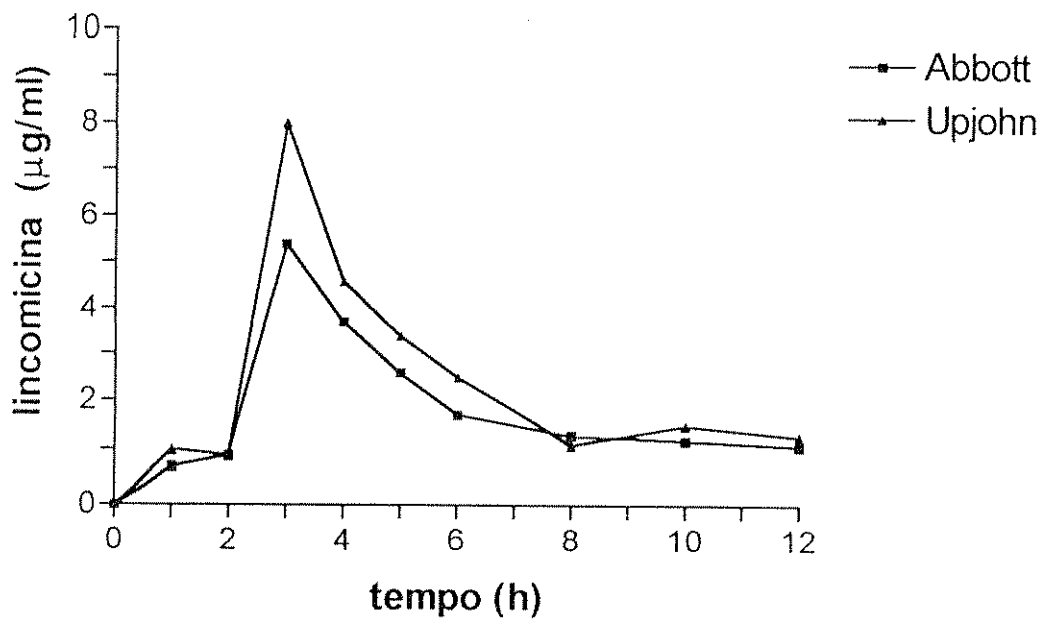
Vol. 9



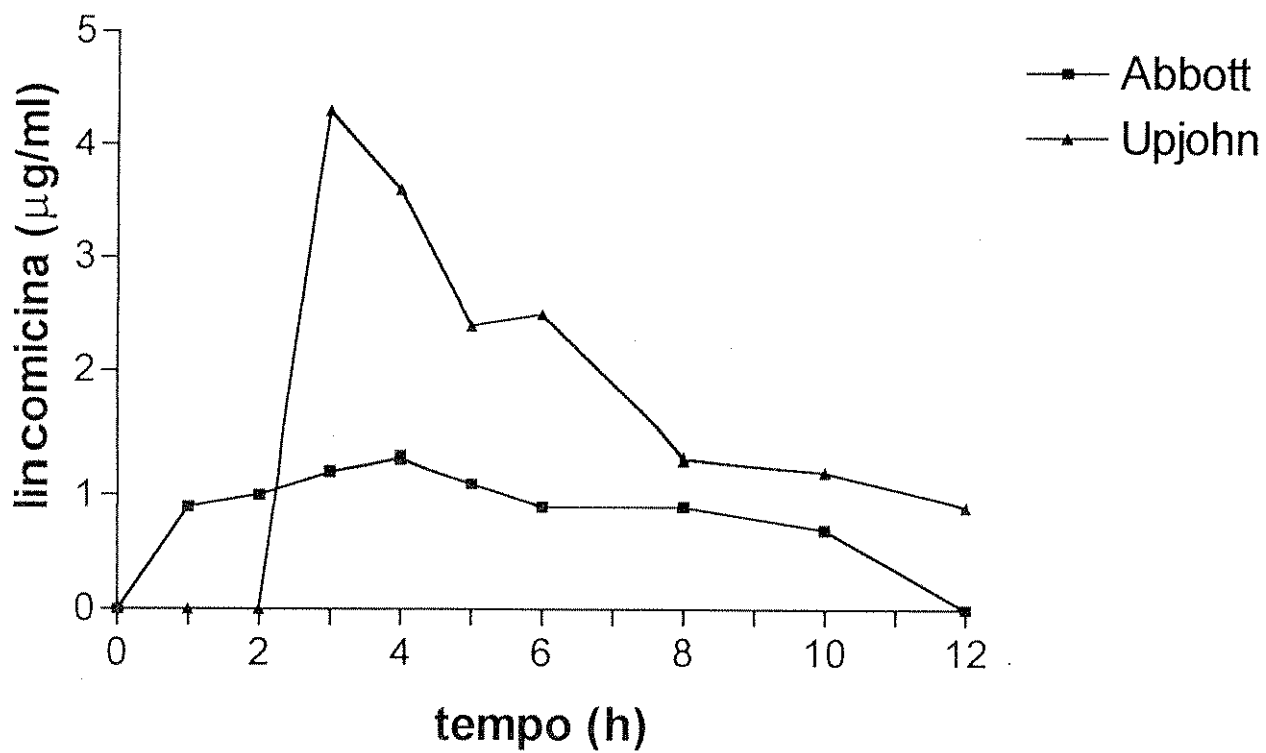
Vol. 10



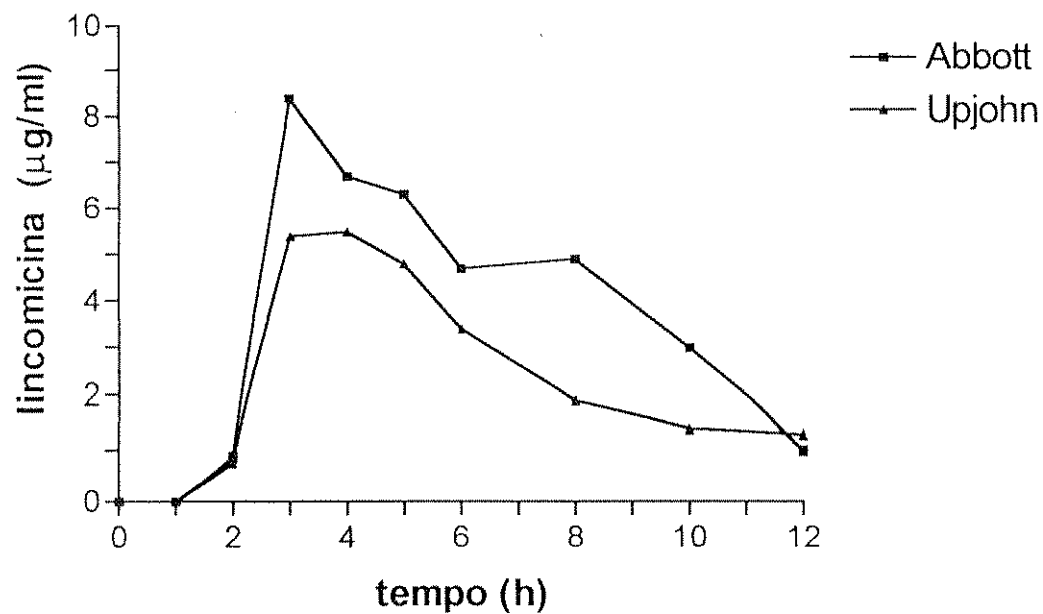
Vol. 11



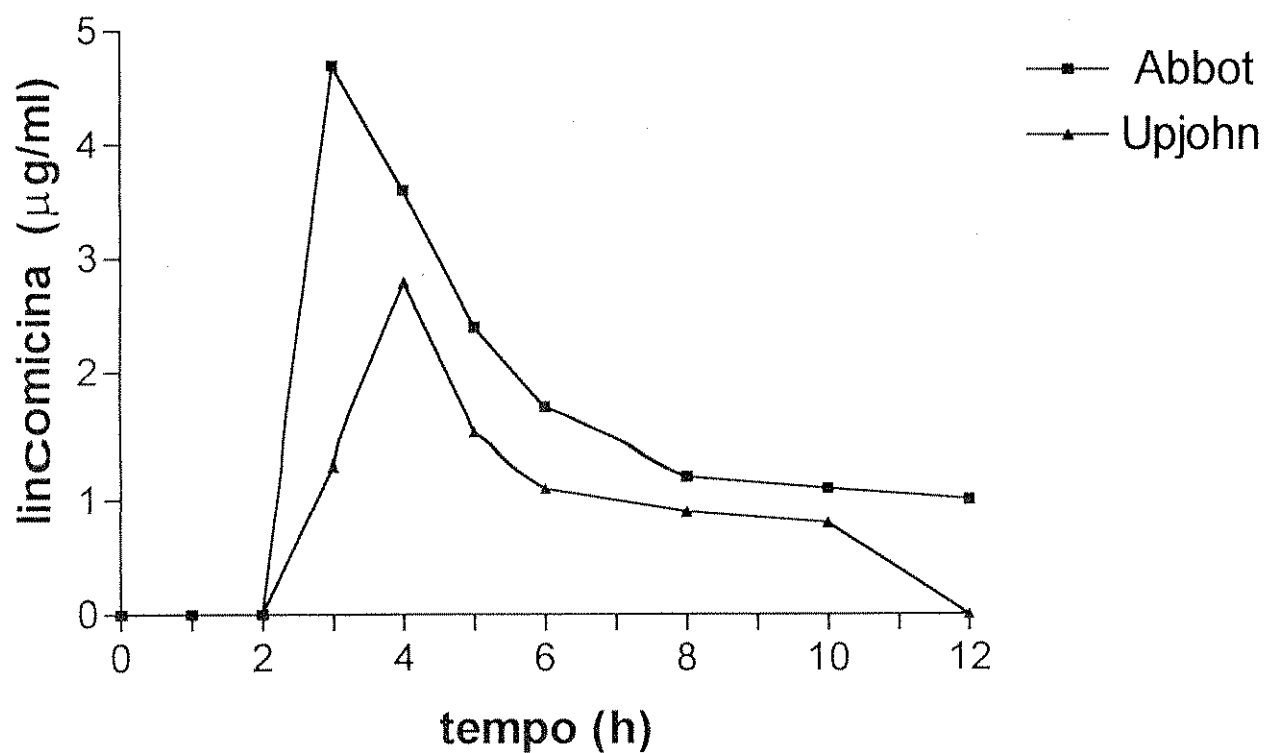
Vol. 12



Vol. 13

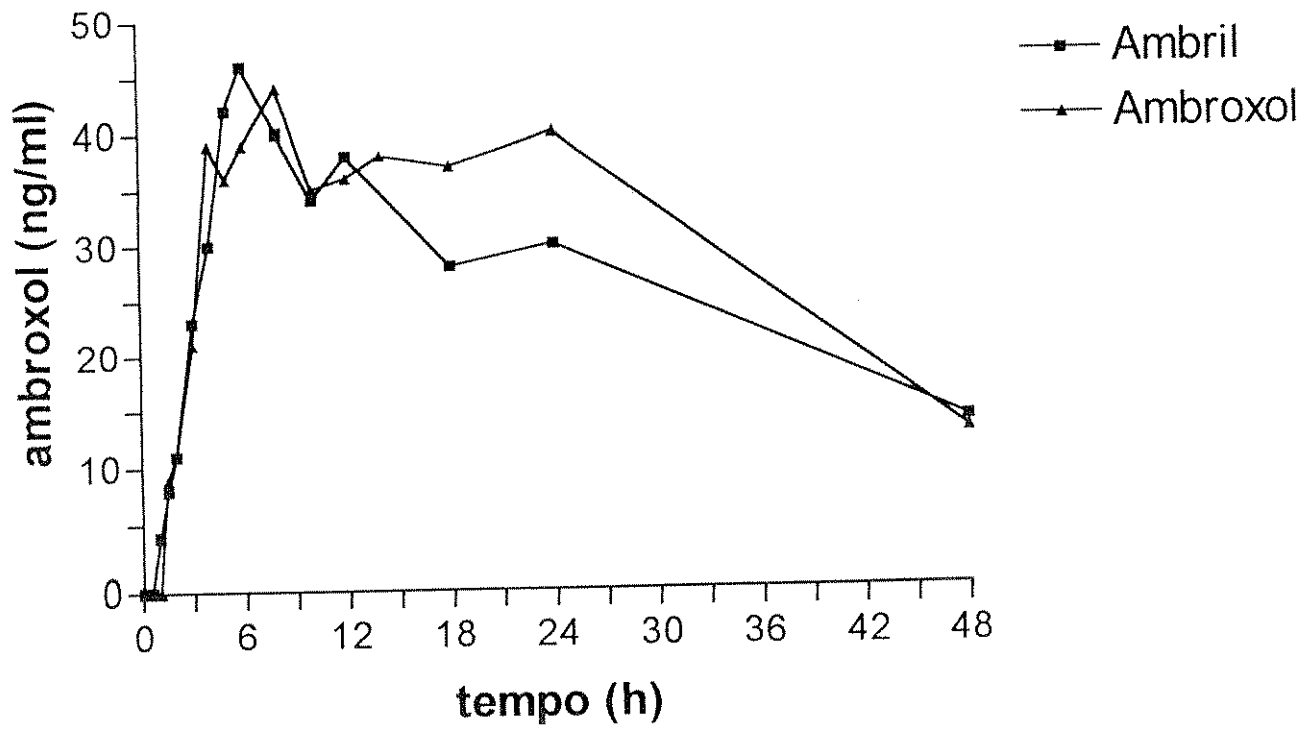
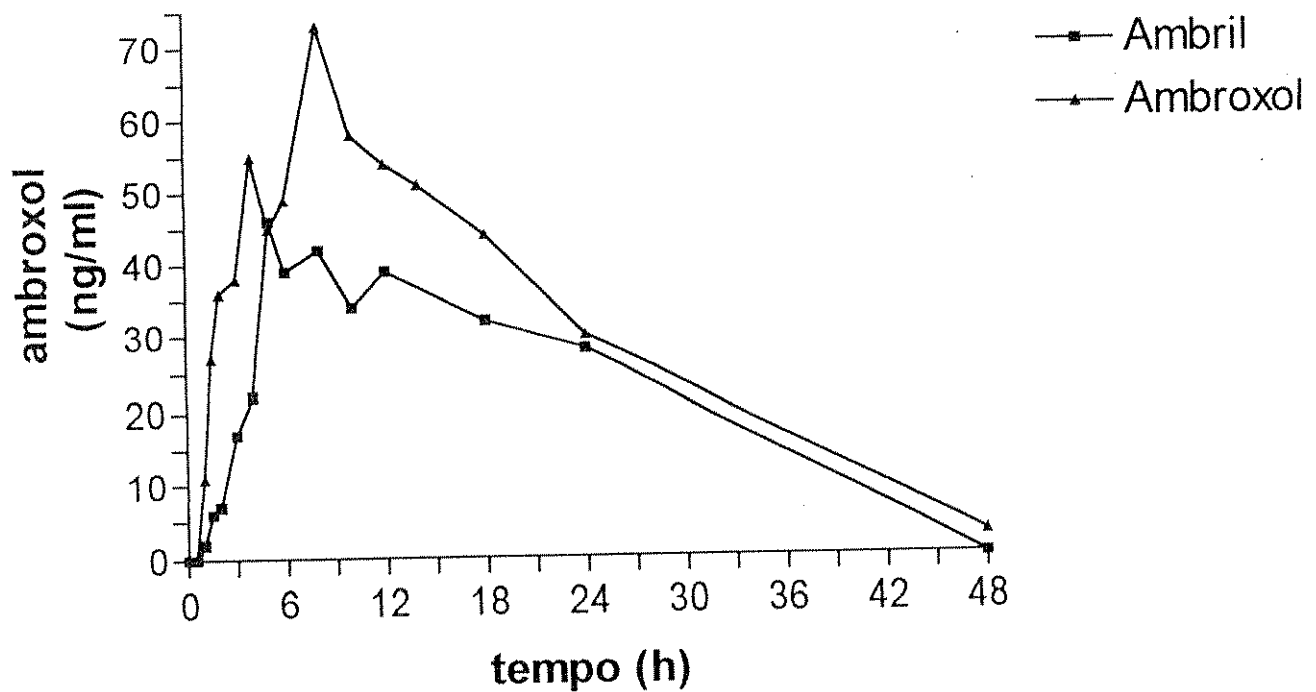


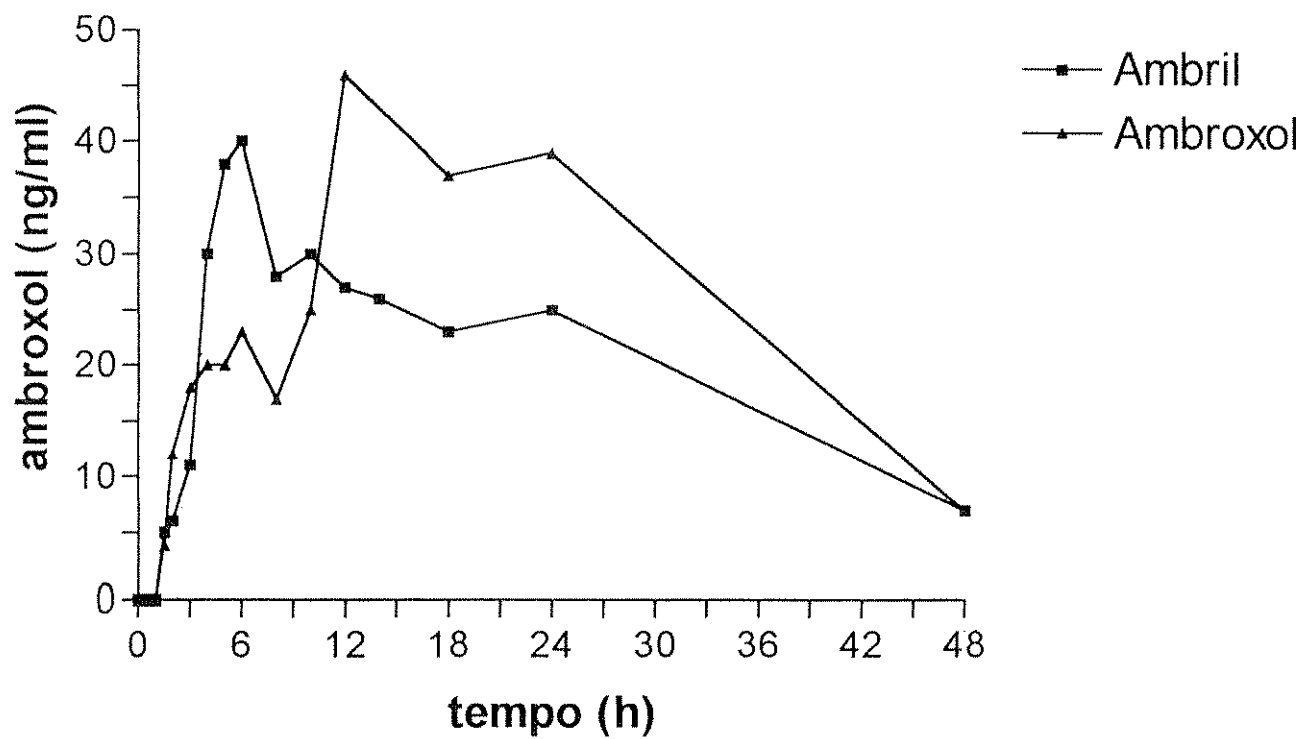
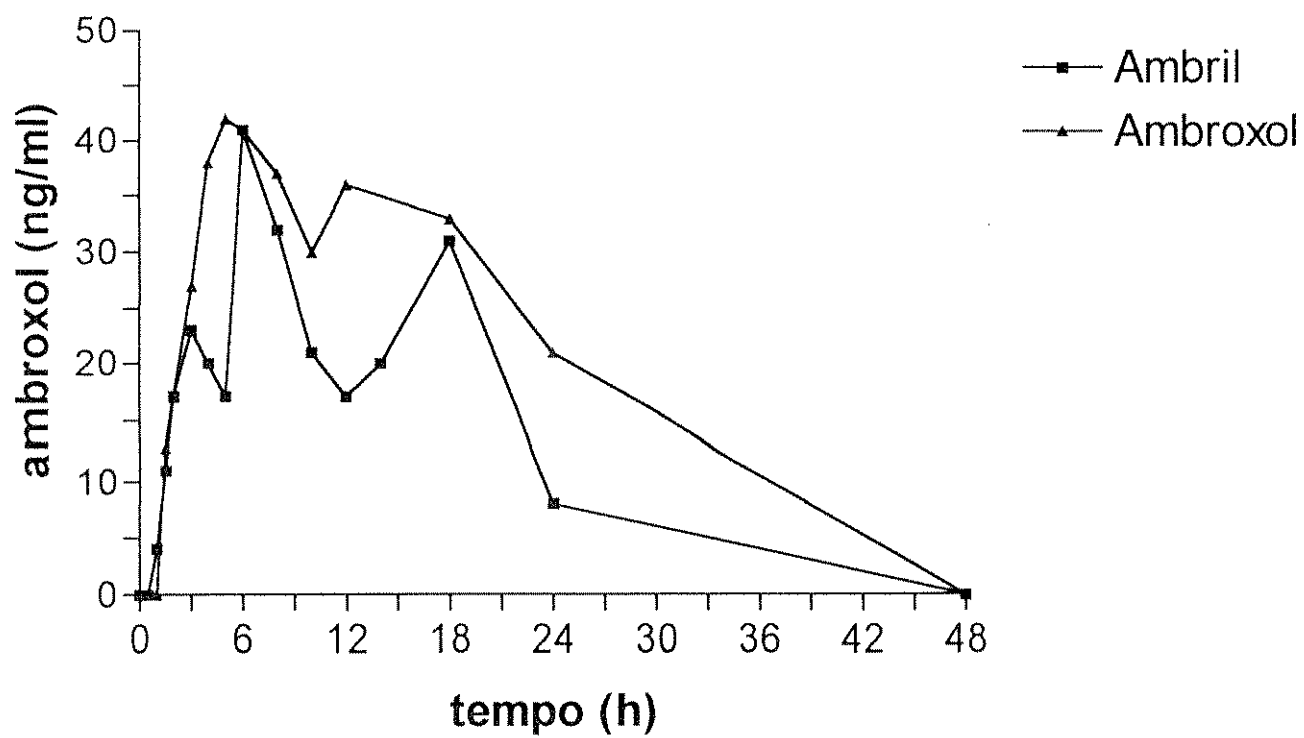
Vol. 14

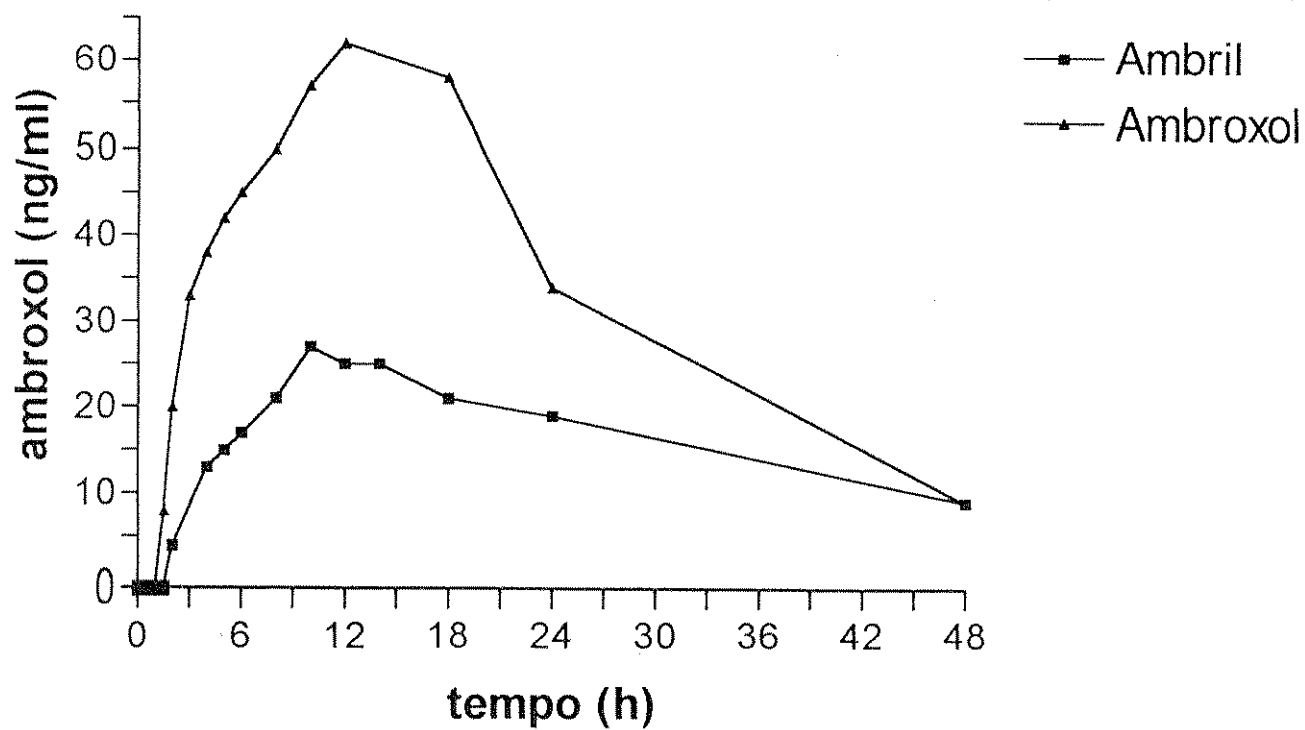
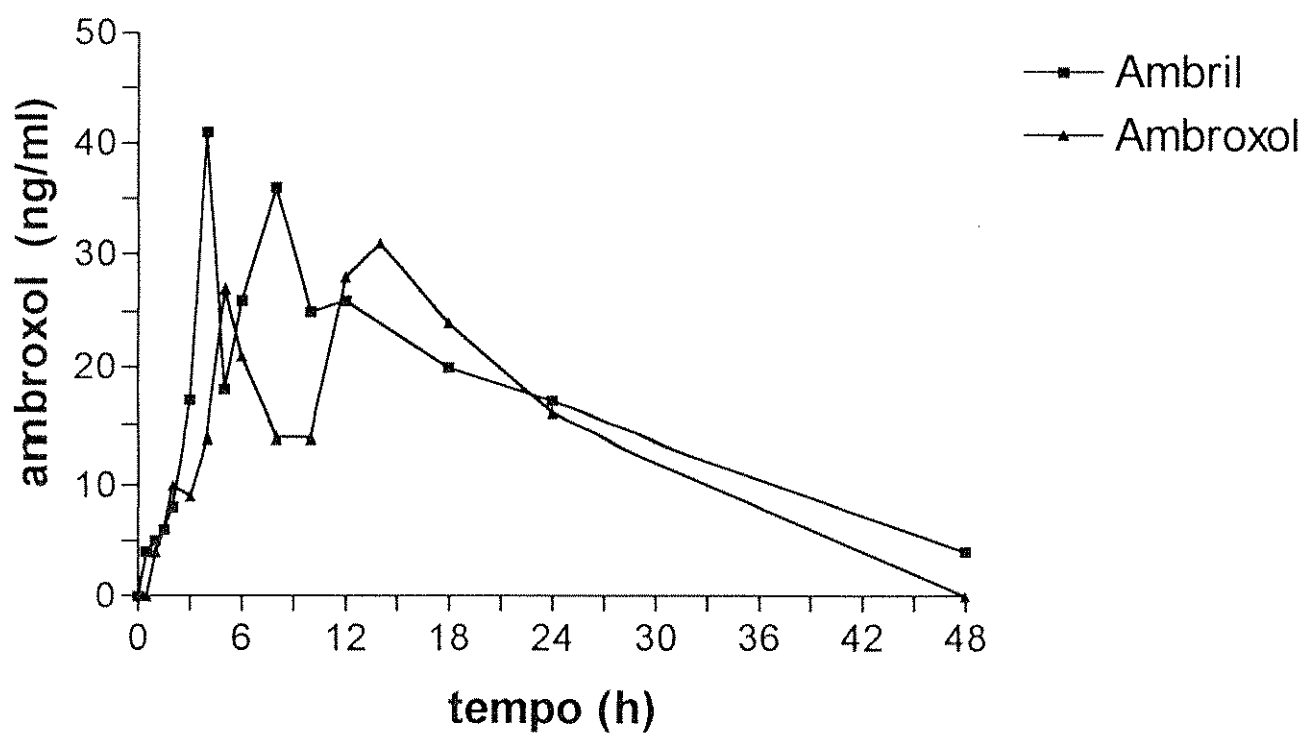


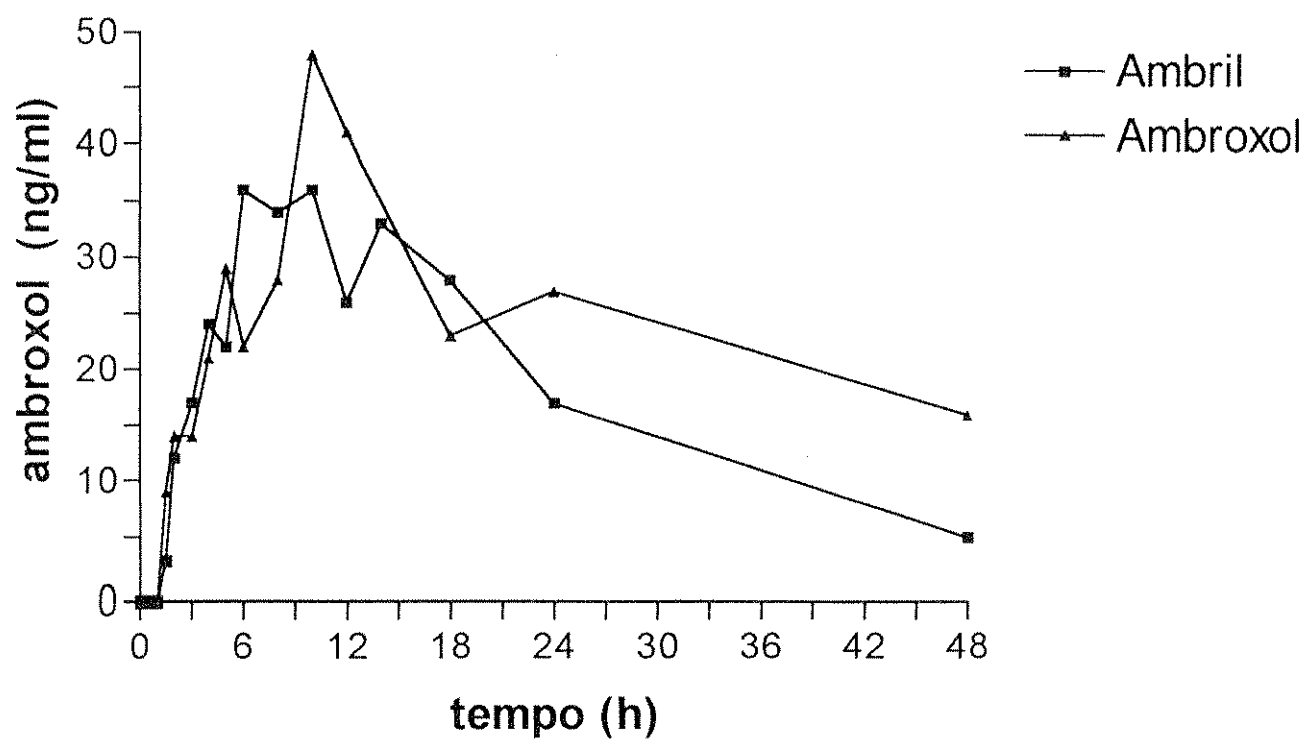
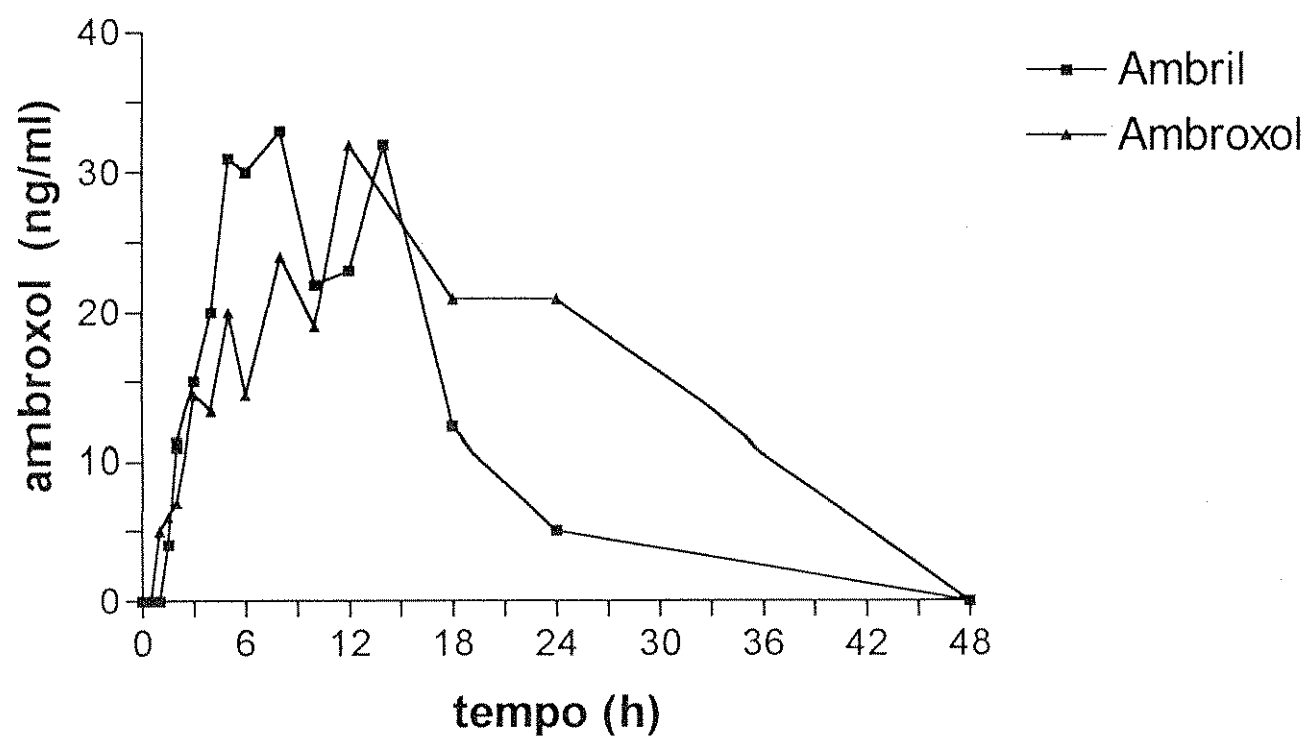
Estudo de bioequivalência entre duas formulações de ambroxol (ambril - Merck e ambroxol - Euderma)

Gráficos com os valores individuais da concentração/tempo para os voluntários Vol 1 a Vol 18.

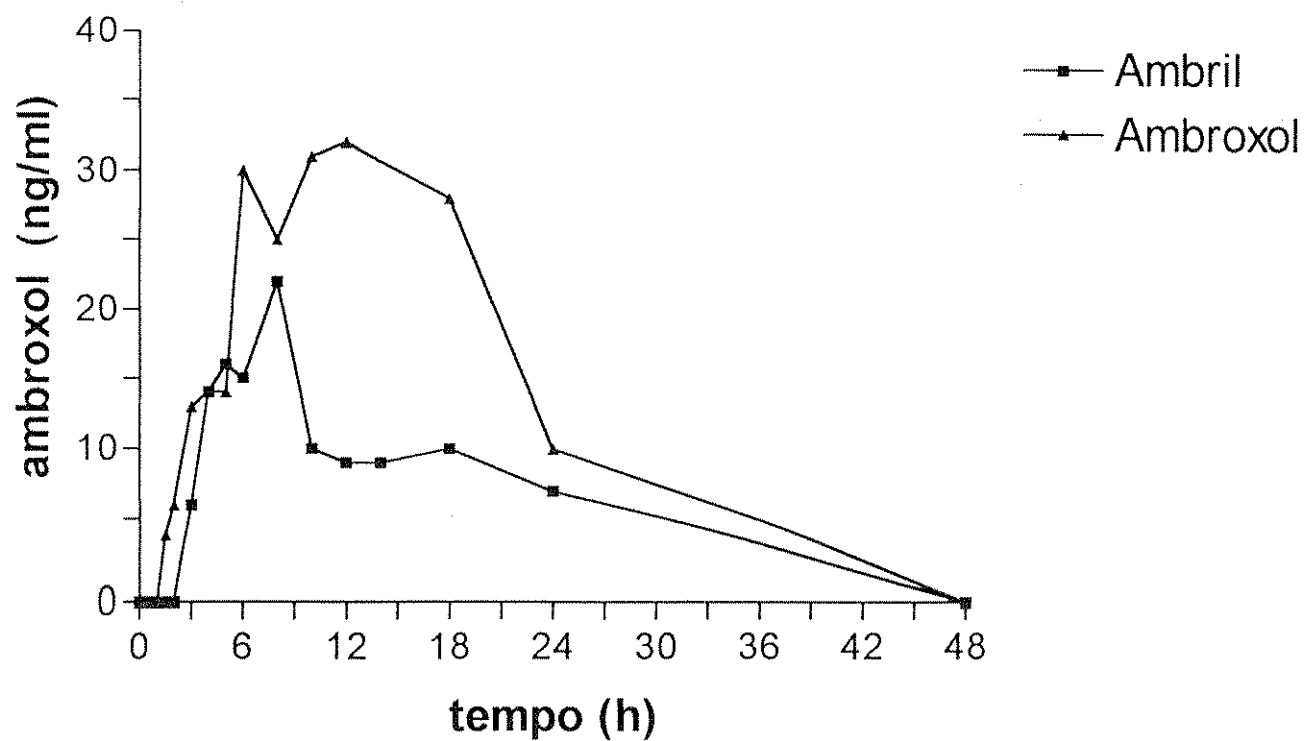
Vol. 1**Vol. 2**

Vol. 3**Vol. 4**

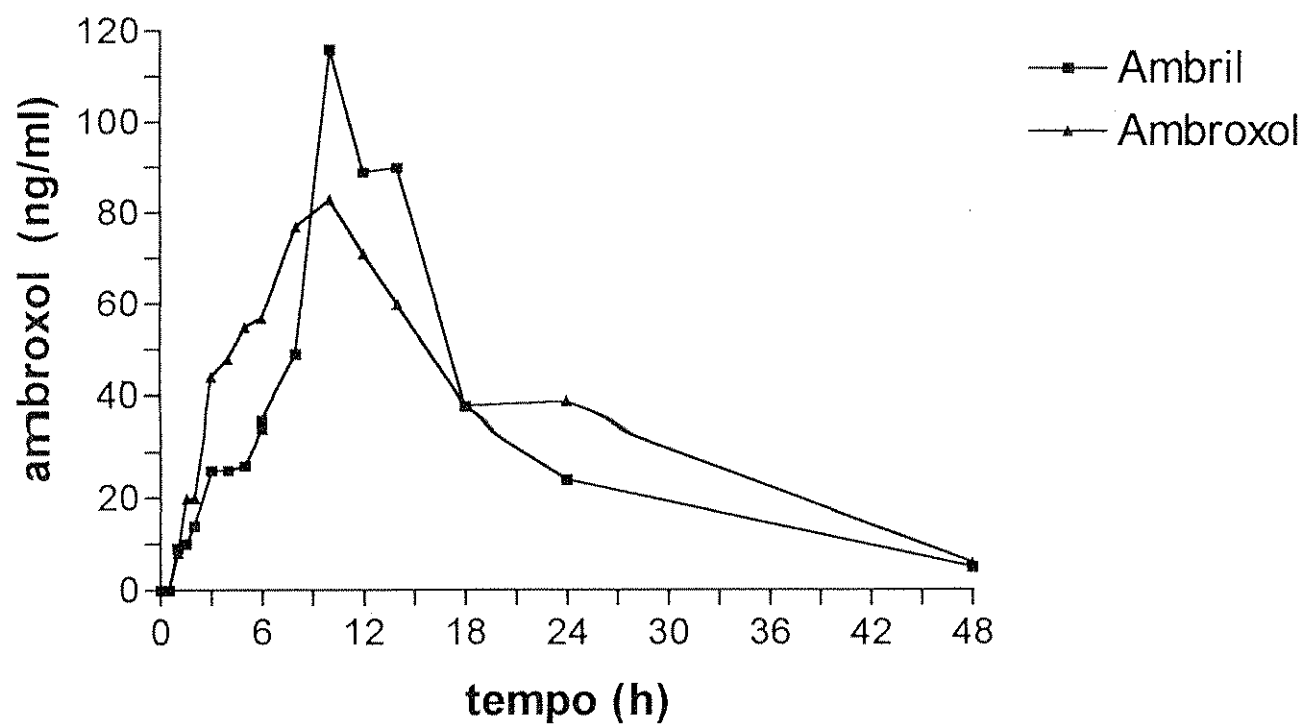
Vol. 5**Vol. 6**

Vol. 7**Vol. 8**

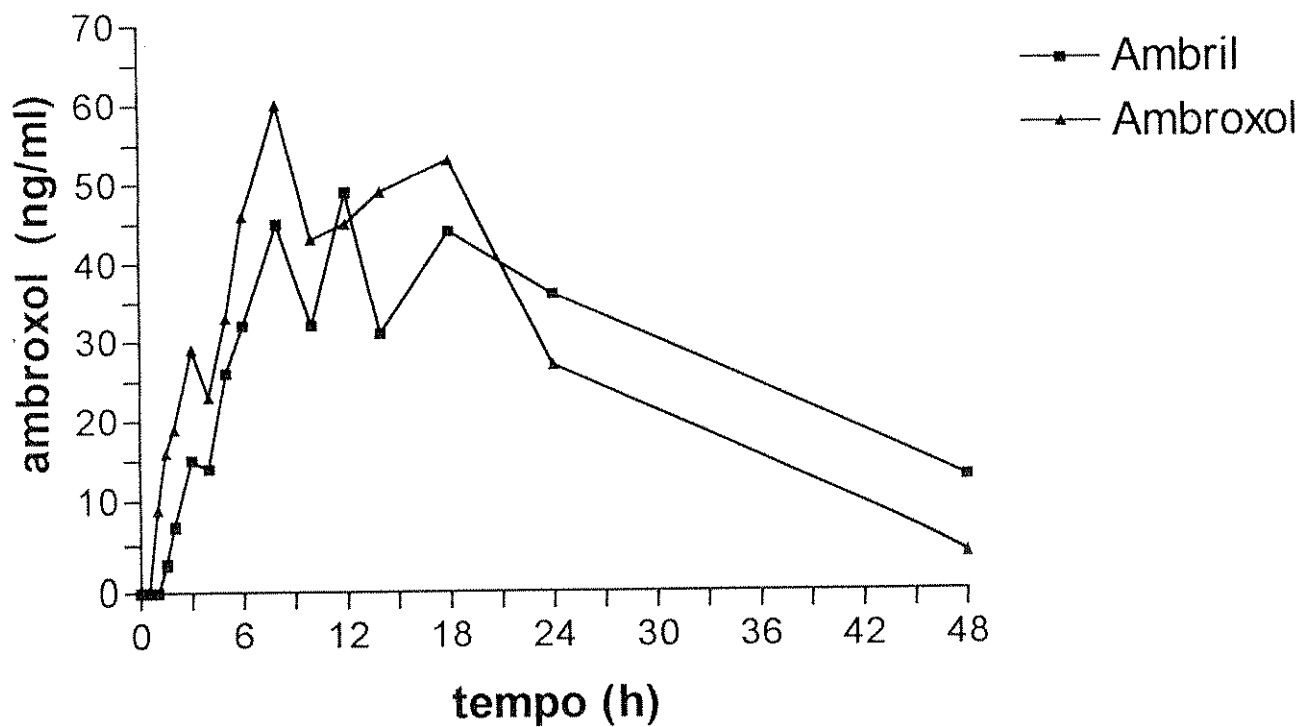
Vol. 9



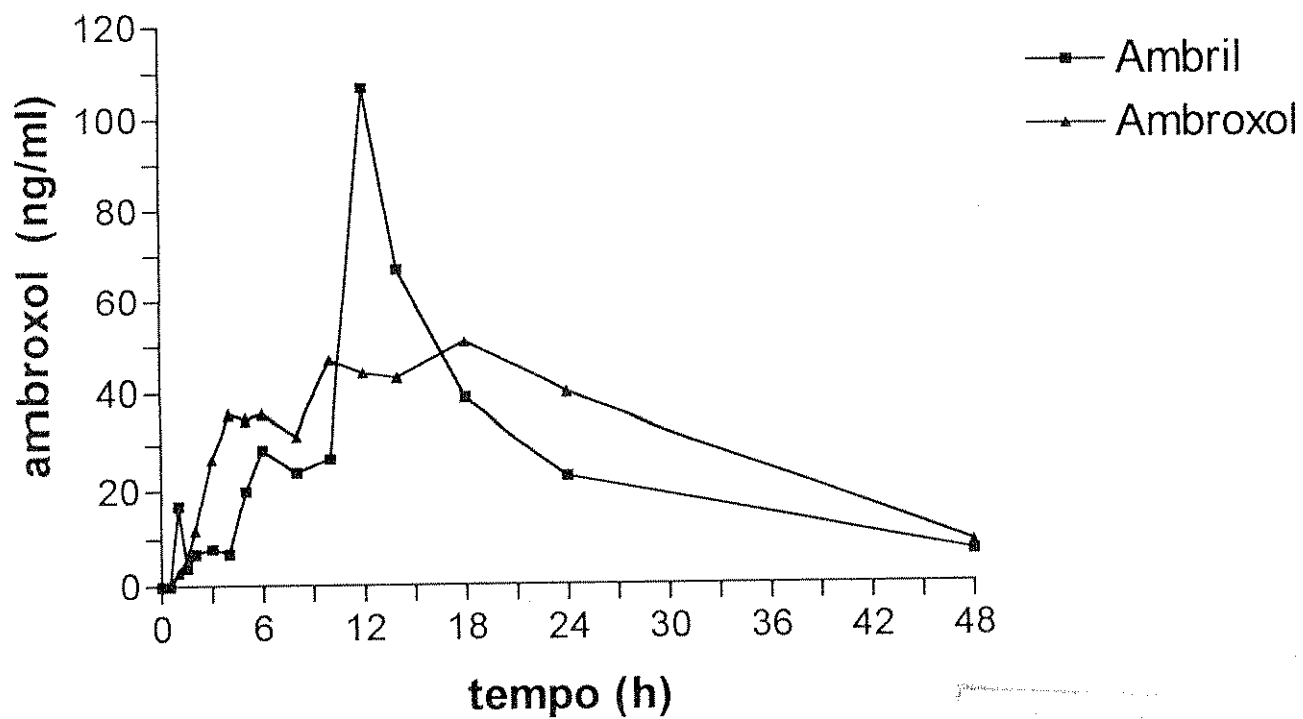
Vol. 10

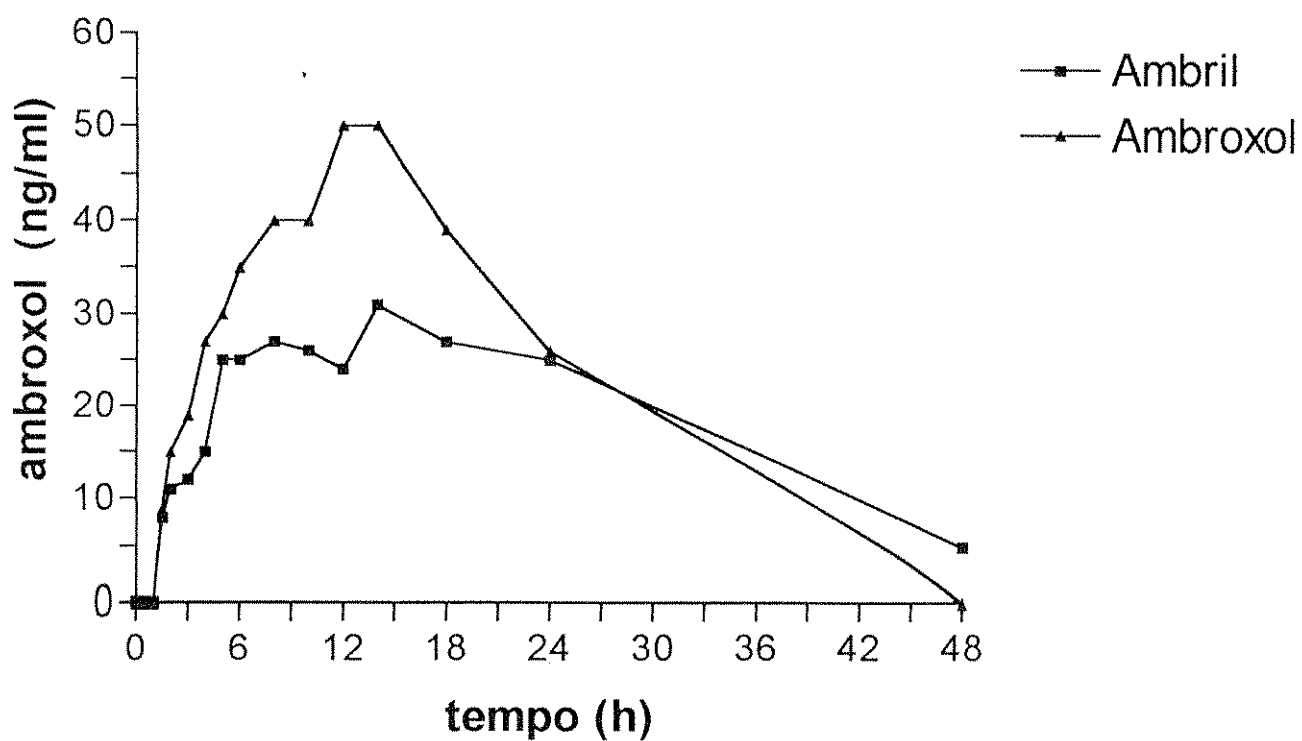
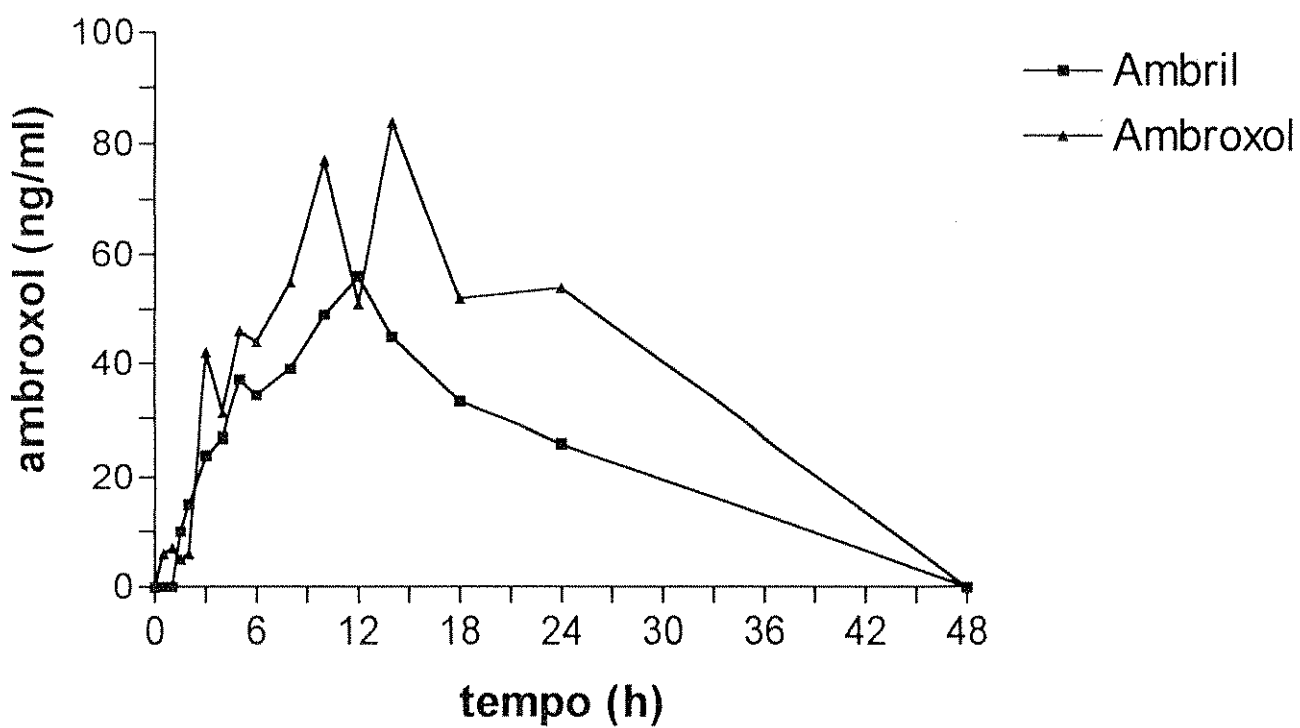


Vol. 11

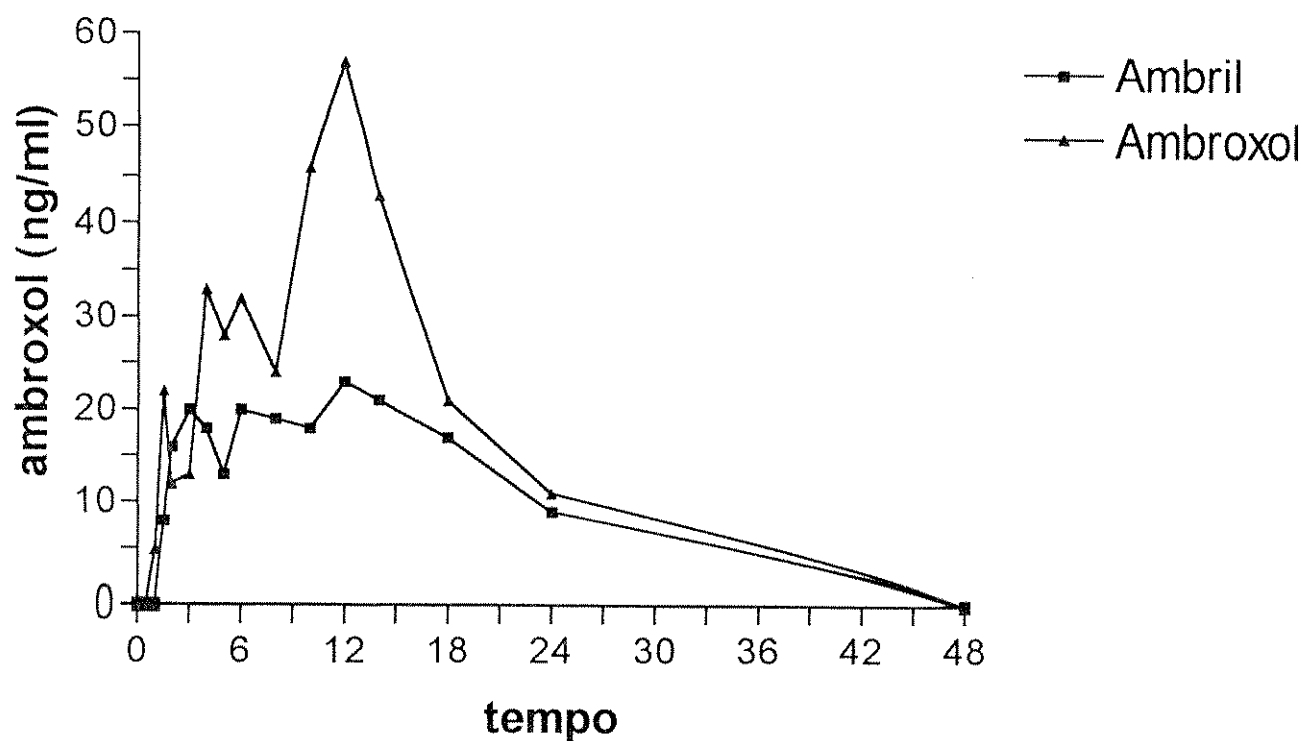


Vol. 12

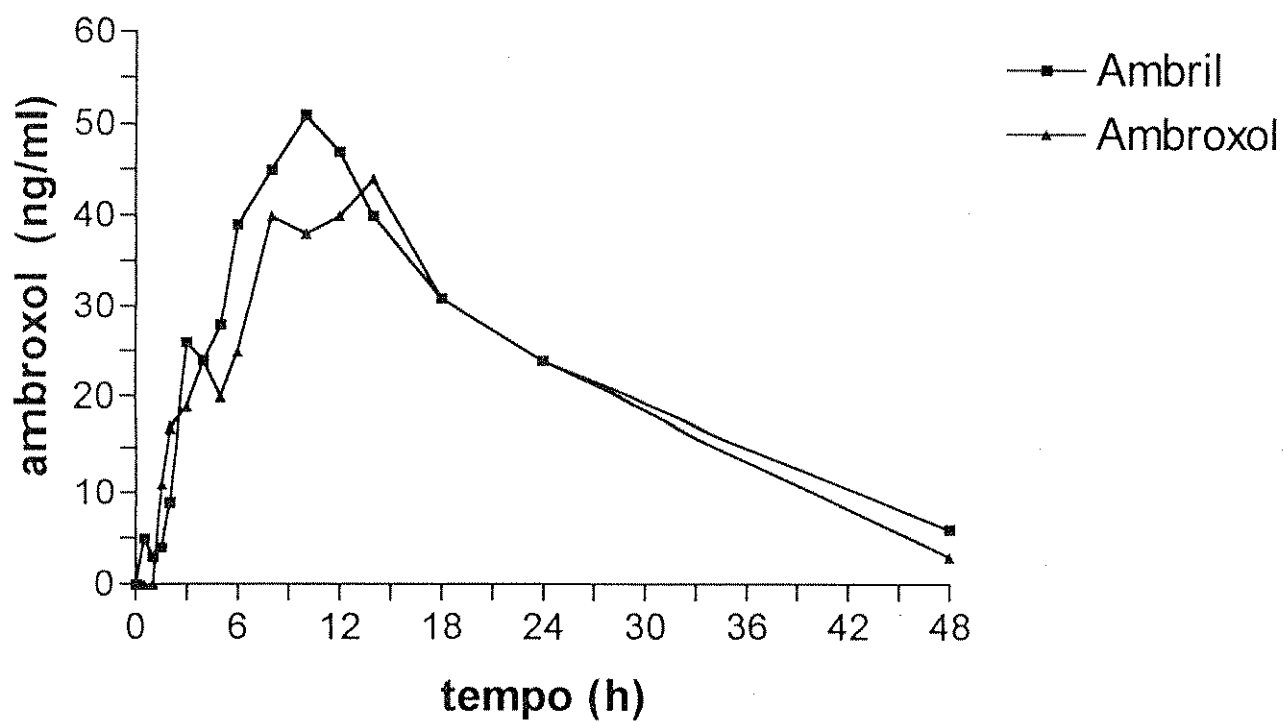


Vol. 13**Vol. 14**

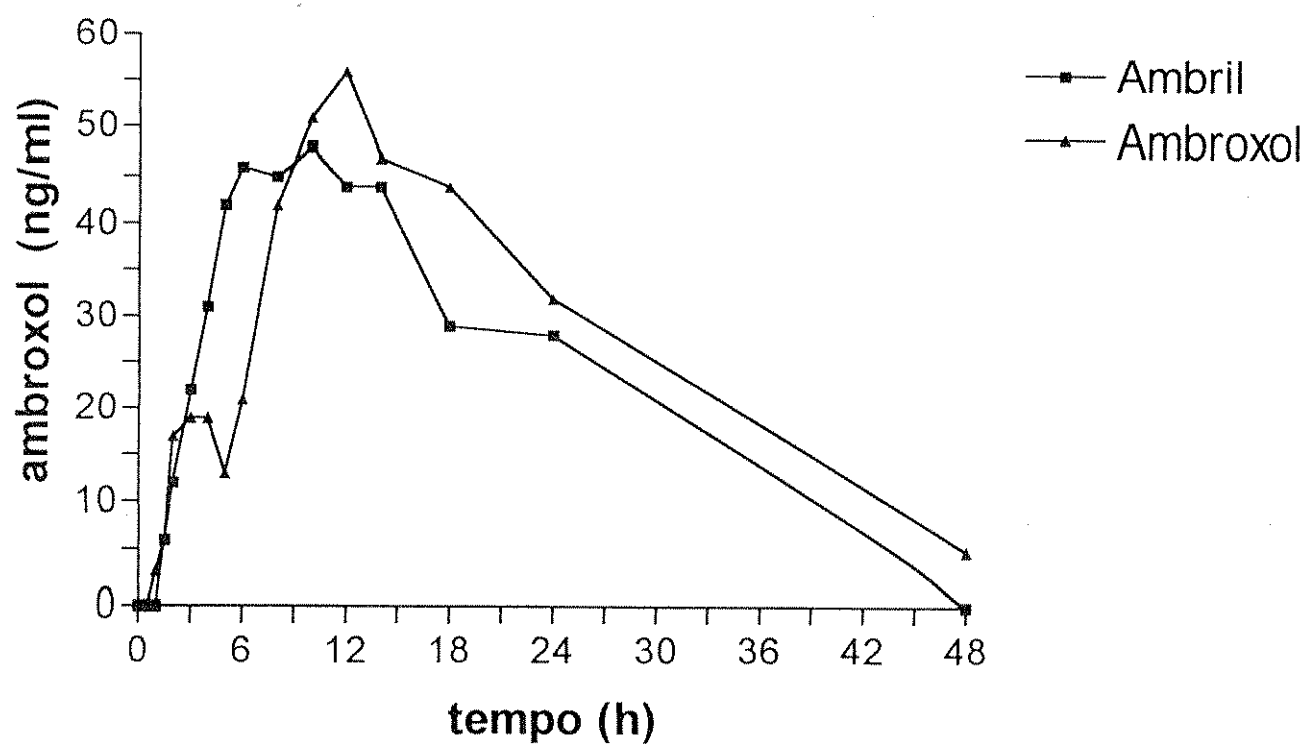
Vol. 15



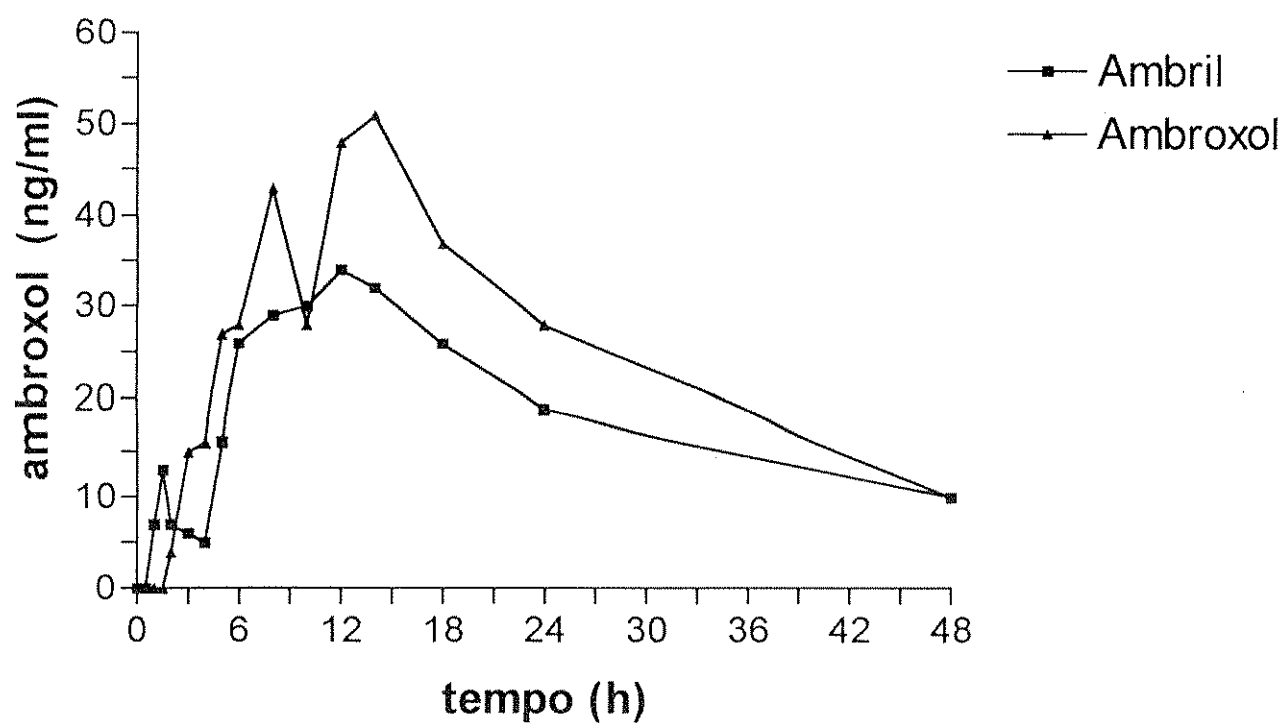
Vol. 16



Vol. 17



Vol. 18



ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE 2 PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE CICLOSPORINA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

Responsáveis: Drs. Eduardo Abib Jr., Gun Birgitta Mendes e Gilberto de Nucci

O abaixo-assinado (Jonas Cintra Do Amaral Galette, 51487 - 654 A), declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade dos médicos Heitor Moreno Jr, Gun Birgitta Mendes e Gilberto de Nucci, da Unidade de Farmacologia Clínica - HC UNICAMP. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar se a solução de Ciclosporina elaborado pelo Laboratório BIOSINTÉTICA (**ciclosporina® 100 mg/ml**) atinge níveis plasmáticos equivalentes à solução vendida comercialmente pelo Laboratório SANDOZ (**Sandimmun Neoral® 100 mg/ml**).

ii - Durante o estudo, será **internado duas vezes por 48 horas, com intervalo de 12 dias**. Em ambas as ocasiões, será administrado **01 (uma)** solução de **100 mg/ml** de ciclosporina por via oral e coletadas **14 amostras** de sangue de 10 ml cada através de butterfly heparinizado em cada internação.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - A administração oral de ciclosporina pode causar efeitos colaterais como **náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia e flatulência**. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.

v - Será submetido antes da primeira internação e após a segunda internação aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase

- alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, urina I, sódio, potássio, cloro e eletrocardiograma.
- vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.
- vii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, a não ser que esta interrupção seja contra-indicada por motivo médico.
- viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.
- ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade de Farmacologia Clínica não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- x - Durante o período de 180 dias a partir da data da assinatura do mesmo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Vera Cruz Seguradora.
- xi - A Unidade de Farmacologia Clínica o manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o voluntário.
- xii - Caso haja surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da UNICAMP e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico (vide telefones abaixo).
- xiii - Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone 397766) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

xiv - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

Campinas,

Assinatura do voluntário

Dr Eduardo Abib Jr (Assin.) Fone - 019 - 2364325

Dra Gun Birgitta Mendes (Assin.)

Dr Gilberto de Nucci (Assin.) fone - 0192-516928

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Admission Criteria

Subject Inclusion Criteria

The following selection criteria must be satisfied for the subject to be enrolled in the study:

- | | | |
|--|---------|--------|
| 1. The subject is male or female unable to bear children | (X) Yes | () No |
| 2. The subject is 18 to 45 years of age | (X) Yes | () No |
| 3. The subject weights between 55 and 95 Kg and is within $\pm$ 10% of the acceptable range of weights for men and women according to height and frame | (X) Yes | () No |
| 4. The subject was examined and considered in good health as demonstrated in pages 2-5 | (X) Yes | () No |
| 5. The subject had freely given informed consent after the essential elements of the protocol have been explained, and prior to the initiation of any study-specific procedures. | (X) Yes | () No |
| 6. The subject has negative sorology for hepatitis B, C and HIV | (X) Yes | () No |

Subject Exclusion Criteria

Any of the following criteria will exclude a subject from the study:

- | | | |
|--|---------|--------|
| 1. The subject's laboratory values are outside the accepted normal ranges (+ 10%), unless considered not clinically significant by the investigator | () Yes | (X) No |
| 2. The subject has participated in an experimental study or has ingested an experimental drug within three months prior to the initiation of the study | () Yes | (X) No |
| 3. The subject has taken any medication regularly within four weeks immediately prior to the initiation of the study, and any drugs within one week prior to the study | () Yes | (X) No |
| 4. The subject has been hospitalized for any reason within eight weeks prior to the initiation of the study | () Yes | (X) No |
| 5. The subject had a history of drug or alcohol abuse, or had ingested alcohol within 48 hours prior to the beginning of the confinement portion of the study | () Yes | (X) No |
| 6. The subject has a history of hepatic, renal, epileptic or hemopoietic study | () Yes | (X) No |
| 7. The subject has hypo or hypertension of any etiology requiring pharmacological treatment | () Yes | (X) No |
| 8. The subject has had a myocardial infarction, angina pectoris and/or congestive heart failure | () Yes | (X) No |
| 9. The subject has donated or lost 450 ml or more of blood within three months prior to the study | () Yes | (X) No |
| 10. The subject has any other condition as per investigator judgement | () Yes | (X) No |

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01 Subject Initials FRM

Medical History

Date History Taken:

Date of Birth: Sex: (X) Male () Female Occupation:

System Review	Normal	Abnormal	If Abnormal, give pertinent details
Allergy	(X)	()	
Eyes-Ears-Nose-Throat	(X)	()	
Respiratory	(X)	()	
Cardiovascular	(X)	()	
Gastrointestinal	(X)	()	
Genitourinary	(X)	()	
Central Nervous System	(X)	()	
Hematopoietic-Lymphatic	(X)	()	
Endocrine-Metabolic	(X)	()	
Dermatological	(X)	()	
Musculoskeletal	(X)	()	
Emotional Stability	(X)	()	
Family History	(X)	()	
Surgical History	(X)	()	
Other	(X)	()	

Comments:

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01 Subject Initials FRM

General Physical Examination - Pre-Study

Date of Exam: _____

Blood pressure (upright)	Arterial Pulse Rate (upright)	Respiration Rate	Height (cm)	Body Weight (light clothes)	Temperature
Systolic/Diastolic (mmHg)	(beats/min)	(mov/min)	(cm)	71.5 (Kg)	(axillary °C)

System Review	Normal	Abnormal	If Abnormal, give pertinent details
Appearance	(X)	()	_____
Skin	(X)	()	_____
Head-Neck	(X)	()	_____
Eyes	(X)	()	_____
Ears	(X)	()	_____
Nose	(X)	()	_____
Mouth	(X)	()	_____
Throat	(X)	()	_____
Chest	(X)	()	_____
Heart	(X)	()	_____
Abdomen	(X)	()	_____
Back-Spine	(X)	()	_____
Genitalia	(X)	()	_____
Lymph Nodes	(X)	()	_____
Neurological	(X)	()	_____
Extremities	(X)	()	_____
Other	()	()	_____

José Rego

Name of Examining Physician

Signature

84584

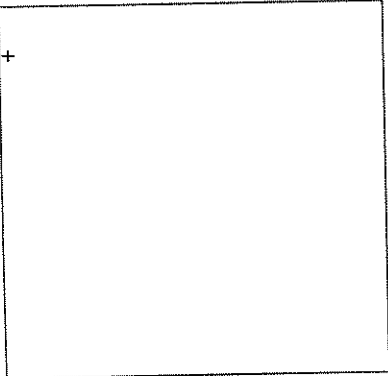
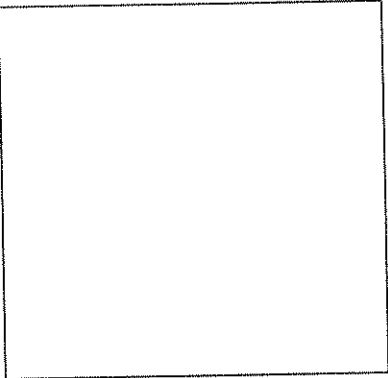
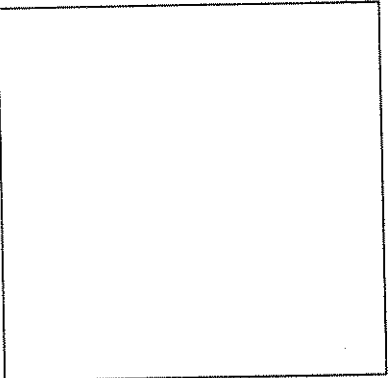
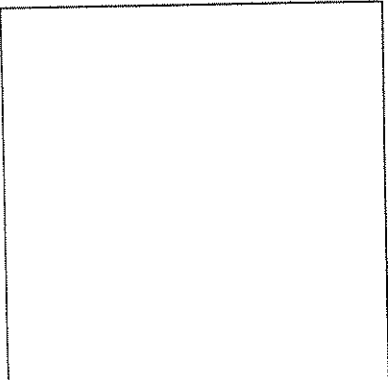
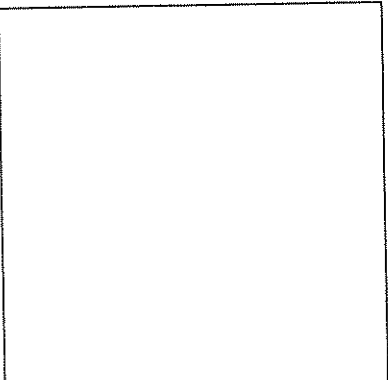
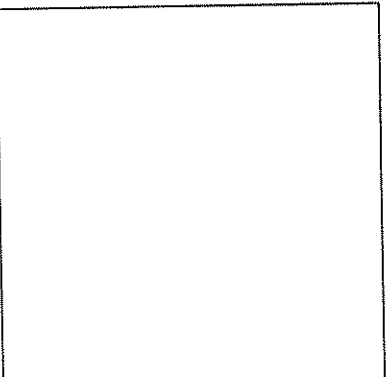
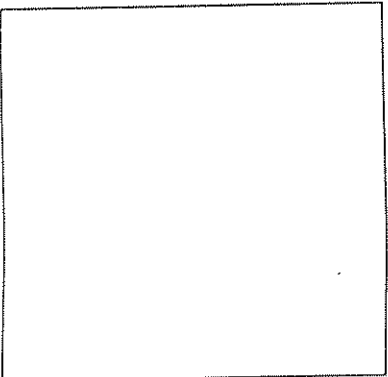
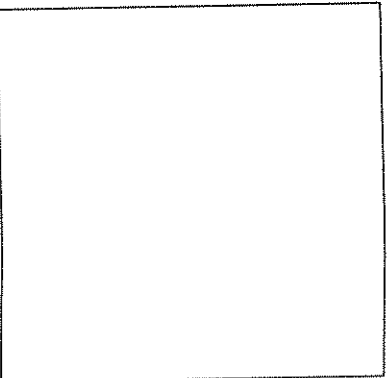
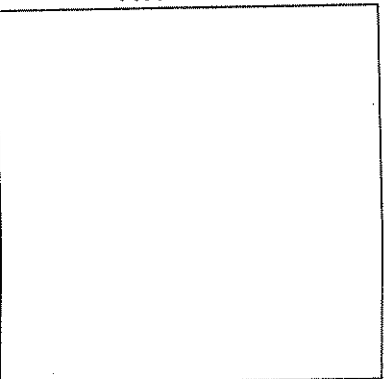
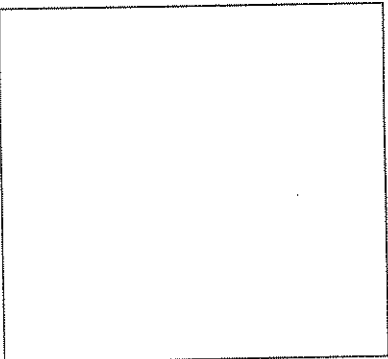
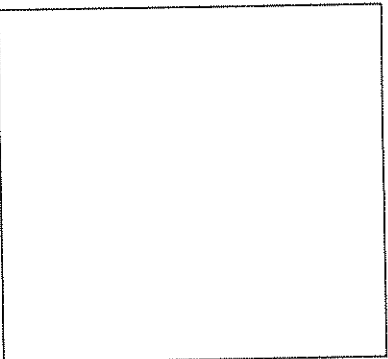
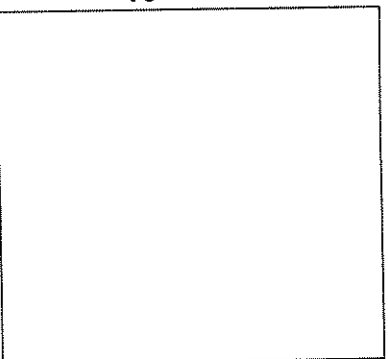
Mat. Prof.

Date

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -
Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº Subject Initials

Electrocardiogram pre-study

		
DI	DII	DIII
		
AVR	AVL	AVF
		
V1	V2	V3
		
V4	V5	V6

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

ECG Determinations

ECG REPORT - PRE-STUDY

Date of ECG:

Cardiac Rhythms:

PR interval:

SAP: °

QRS duration:

SAQRS: °

QTc:

SAT: °

HR:

Conclusions:

- () Normal
- () Abnormal, not clinically significant
- () Abnormal, clinically significant

Abnormalities specified:

Eduardo Abib Jr

53546

Name of Examining Physician

Signature

CREMESP

Date

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº Subject Initials

Clinical Laboratory Determinations

Hematology Results	Pre-Study	Post Study	Normal	Comments
Date Sample Taken (day/mo/yr)	17/01/97			
Hemoglobin g%	14.7		13.5 - 18.5	
Hematocrit %	45		40 - 55	
WBC $10^3/\text{mm}^3$	6.7		5.0 - 10.0	
Differential count (%)				
Band neutrophils			00 - 05	
Segmented neutrophils	46			
Lymphocytes	35			
Monocytes	9			
Basophils	-	-		
Eosinophils	10			
Other	-	-		
Platelet count $10^3/\text{mm}^3$	normal		250 - 450	not quantified

Chemistry Results	Pre-Study	Post Study	Normal	Comments
Date Sample Taken (day/mo/yr)				
Urea mg/dl	18		15 a 40	
Creatinine mg/dl	1.0		0.4 a 1.3	
Total Bilirubin mg/dl	0.33		<1.2	
Total Protein g/dl	6.9		6 a 8	
Albumin g/dl	3.8		3.8 a 5.2	
Fasting Blood Glucose mg/dl	82		70 a 110	
Alkaline Phosphatase U/l	50		13 a 43	
SGOT (AST) U/l	10		8 a 27	
SGPT (ALT) U/l	15		8 a 27	
Sodium mEq/l	143		135 a 144	
Potassium mEq/l	4.0		3.6 a 5	
Uric Acid mg/dl	4.2		2.5 a 7	
Gamma GT U/l	15		7 a 45	

* - Not available

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Clinical Laboratory Determinations (cont.)

Urinalysis Results	Pre-Study	Post Study	Normal	Comments
Date Sample Taken (day/mo/yr)	17/01/97			
Specific Gravity	1022		1010 - 1030	
pH	6.0		5.0 - 6.0	
Albumin	negative	-	negative	
Glucose	negative	-	negative	
Ketones	negative	-	negative	
Microscopic				
WBC	16,000		<10,000	
RBC	2,000		<5,000	
Casts	negative	-	negative	
Epithelial Cells	few	-	negative / few	
Crystal	negative	-	negative	
Bacteria	negative	-	negative	
Other:				

Faeces: negative

Serology:

HIV positive	(X) negative	()
Hepatitis B positive	(X) negative	()
Hepatitis C positive	(X) negative	()

Comments:

Ulysses Moraes de Oliveira

Name of Physician

Signature

29245

CREMESP

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

First Confinement Period

Short Physical Examination Pre-dosing

Significant changes since the pre-study examination? YES () NO ()

Comments

Gilberto de Nucci

43154

Name of Examining Physician

Signature

CREMESP

Date

Short Physical Examination - End of the First Period

Significant changes since the pre-study examination? YES () NO ()

Comments

Gilberto de Nucci

43154

Name of Examining Physician

Signature

CREMESP

Date

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

First Confinement Period

Dosing, Blood Sampling, Vital Signs and Meals

Dose Administration: Date: **25/01/97** Study drug administered in this confinement period:

Time: **08:40**

() Biosintética cyclosporin A 5 mg/kg

(X) Sandoz cyclosporin A 5 mg/kg

Total given

300 mg (3ml / 100 mg / ml)

Blood Sampling					
Time Related to Dose (h)	Clock Time (24h clock)	Cyclosporin A (ng/ml)	Blood Pressure Sitting (mm/Hg)	Pulse sitting (beats/min)	Temperature °C (axillary)
0.0	08:40		120 / 80	60	36,2
0.5	09:10		120 / 90	56	
1	09:40		120 / 90	64	
1.5	10:10		120 / 90	68	
2	10:40		110 / 80	64	
3	11:40		120 / 80	70	
4	12:40		130 / 90	72	
5	13:40		114 / 80	68	
6	14:40		120 / 80	64	
8	16:40		110 / 80	64	
10	18:40		120 / 84	64	
12	20:40		120 / 82	66	
18	02:40		128 / 84	70	
24	08:40		120 / 84	70	

Take whit orange juice . no taste .

Begin Fast Time: 11 : 00

Lunch Time: 12 : 00

Dinner Time:

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Second Confinement Period

Short Physical Examination Pre-dosing

Significant changes since the pre-study examination? YES () NO ()

Comments

José Rego

84584

Name of Examining Physician

Signature

Mat. Prof.

Date

Short Physical Examination - End of the Second Period

Significant changes since the pre-study examination? YES () NO ()

Comments

José Rego

84584

Name of Examining Physician

Signature

Mat. Prof.

Date

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Second Confinement Period

Dosing, Blood Sampling, Vital Signs and Meals

Dose Administration: Date: 09/12/95 Study drug administered in this confinement period:

Time: 07:15

() Biosintética cyclosporin A 5 mg/kg

() Sandoz cyclosporin A 5 mg/kg

Total given

300 mg

Blood Sampling					
Time Related to Dose (h)	Clock Time (24h clock)	Cyclosporin A (ng/ml)	Blood Pressure Sitting (mm/Hg)	Pulse sitting (beats/min)	Temperature °C (axillary)
0.0					
0.5					
1					
1.5					
2					
3					
4					
5					
6					
8					
10					
12					
18					
24					

Begin Fast Time:

Lunch Time:

Dinner Time:

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Adverse Reactions

Adverse effects during the study?

() YES

() NO

Description	Date of Onset	Time of Onset	Severity Mild Mod. Sev.	Duration	Attributable to test drug?				Action Taken
					Yes	Pos	No	Unk	
1.			() () ()		()	()	()	()	
2.			() () ()		()	()	()	()	
3.			() () ()		()	()	()	()	
4.			() () ()		()	()	()	()	
5.			() () ()		()	()	()	()	
6.			() () ()		()	()	()	()	
7.			() () ()		()	()	()	()	
8.			() () ()		()	()	()	()	
9.			() () ()		()	()	()	()	

Mod. = Moderate

Sev. = Severe

Pos. = Possible

Unk. = Unknown

Comments

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Medications for Treatment of Adverse Reactions

If patient has had any adverse reaction which required use of drugs for its management, please, find below all the relevant information referred to the same number used in Page 10 for the adverse reaction.

Nº used in Page 10 for this adverse reaction	Drug administered (generic or commercial name)	Route (oral, I.V., I.M.)	Dosage schedule (mg/dose, nº doses/day)	Total dosage administered (mg)

If necessary, see Page 14 - Additional Comments

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -*Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97*

Subject nº 01

Subject Initials FRM

Premature Termination of the Study*

Subject drop out of the study?

() YES

() NO

Date dropped out

study:

Reason(s) dropped out of the study:

I certify that these forms are correct and that all the data was entered as it was obtained during the study.

G de Nucci

Name of Principal Investigator

Signature

Date

* - If subject completed entire study, please proceed directly to the next page.

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

General Physical Examination - Post-Study

Date of Exam:

Blood pressure (upright)	Arterial Pulse Rate (upright)	Respiration Rate	Height	Body Weight (light clothes)	Temperature
Systolic/Diastolic (mmHg)	(beats/min)	(mov/min)	(cm)	(Kg)	(axillary °C)

System Review	Normal	Abnormal	Change	Observations
Appearance	()	()	()	_____
Skin	()	()	()	_____
Head-Neck	()	()	()	_____
Eyes	()	()	()	_____
Ears	()	()	()	_____
Nose	()	()	()	_____
Mouth	()	()	()	_____
Throat	()	()	()	_____
Chest	()	()	()	_____
Heart	()	()	()	_____
Abdomen	()	()	()	_____
Back-Spine	()	()	()	_____
Genitalia	()	()	()	_____
Lymph Nodes	()	()	()	_____
Neurological	()	()	()	_____
Extremities	()	()	()	_____
Other	()	()	()	_____

Gilberto de Nucci

43154

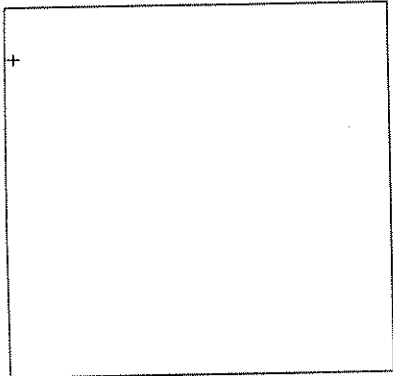
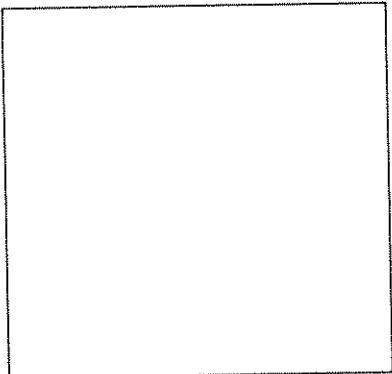
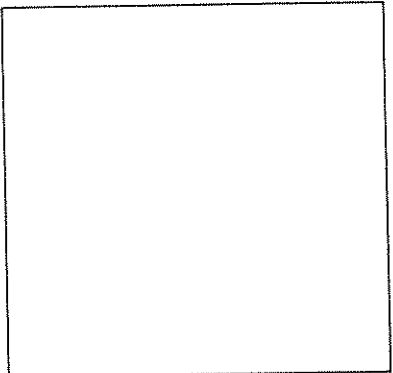
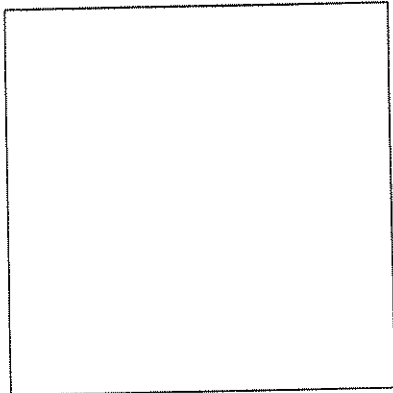
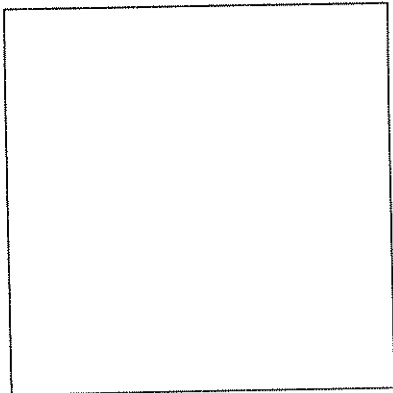
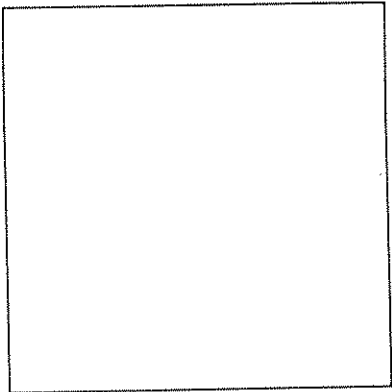
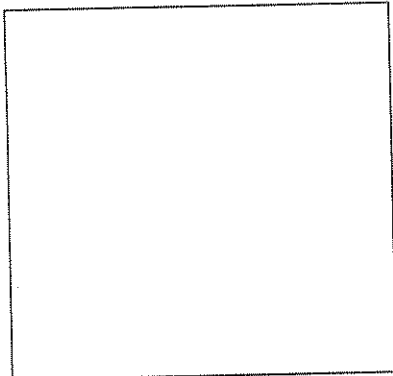
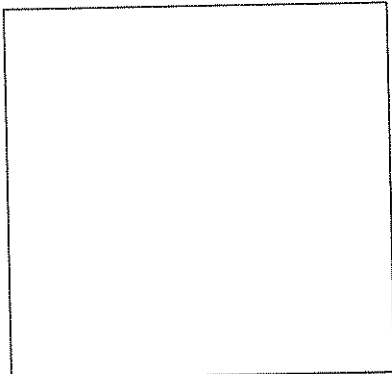
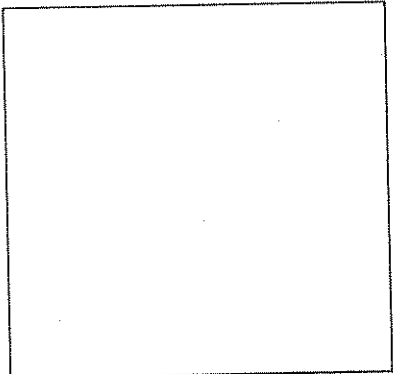
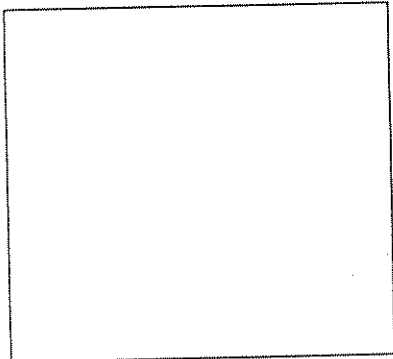
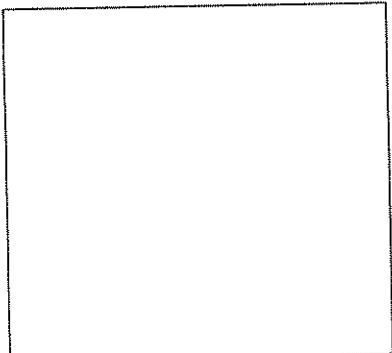
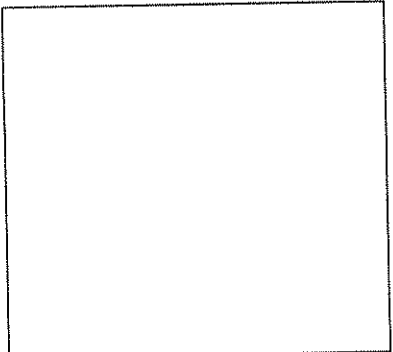
Name of Examining Physician

Signature

CREMESP

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -
Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97
Subject nº 01 Subject Initials FRM

Electrocardiogram post-study

		
DI	DII	DIII
		
AVR	AVL	AVF
		
V1	V2	V3
		
V4	V5	V6

Cyclosporin A (oral solution) Bioequivalence Study -

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit - UNICAMP - GDN-01/97

Subject nº 01

Subject Initials FRM

ECG Determinations

ECG REPORT - POST-STUDY

Date of ECG:

Cardiac Rhythms:

PR interval:

SAP:

QRS duration:

SAQRS: °

QTc:

SAT: °

HR:

Conclusions:

() Normal

() Abnormal, not clinically significant

() Abnormal, clinically significant

Abnormalities specified: Incomplete right bundle branch block

Eduardo Abib Jr

53546

Name of Examining Physician

Signature

CREMESP.

Date

Date _____

10. trabalhos publicados ou enviados para publicação durante o período de doutoramento

BIOEQUIVALENCE STUDY OF THREE ASCORBIC ACID TABLET FORMULATIONS IN HEALTHY MALE VOLUNTEERS

P.L.G. Molina¹, W. Ribeiro¹, L.A. Moraes¹, A. Poli², E. Abib Jr.¹, R.A. Moreno¹, W. Leahey³, H. Moreno Jr.¹, M.N. Muscará⁴ and G. de Nucci^{5*}

¹Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ²Department of Pharmacology, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil; ³Department of Therapeutics and Pharmacology, The Queen's University of Belfast, Belfast, Northern Ireland; ⁴Clinical Pharmacology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil; ⁵Institute of Biomedical Sciences, USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, 05508-900, SP, Brazil.

ABSTRACT

This study compares the bioequivalence of three ascorbic acid formulations (test: Celong 500 mg prolonged release tablets from Whitehall; standard: Cewin 500 mg prolonged release tablets from Winthrop and Redoxon oral effervescent 1000 mg tablets from Roche) in seventeen healthy male volunteers. A single oral dose of 1000 mg of the appropriate formulation was administered according to a randomized cross-over way with a two week washout interval between periods. Plasma samples for HPLC determination of ascorbic acid were obtained before and at set intervals up to 48h after the administration of each formulation. From the plasma concentration vs. time curves obtained for each formulation, the following parameters were obtained: areas under the curves (AUC) from 0 to 12 h and from 0 to 48 h, maximum achieved concentration (C_{max}) and the time at which it occurred (T_{max}). Parametric and non-parametric analysis of individual AUC and C_{max} ratios and T_{max} differences among formulations showed no statistical significance, despite their different patterns of drug release. Based on the above results and in accordance with the European Union and the US Food and Drug Administration, Celong was found to be bioequivalent to both Cewin and Redoxon, and also Cewin was bioequivalent to Redoxon with regard to both the extent and rate of absorption.

INTRODUCTION

Ascorbic acid (AA), a water-soluble vitamin, consists of l-ascorbic acid and its oxidized form dehydro-l-Ascorbic acid (DHAA). Both forms are equally biologically active (1). It is a normal constituent of body fluids and has importance in biochemical reactions as a reducing agent (2, 3, 4). The physiological roles of the vitamin C include collagen synthesis, amino acid metabolism, synthesis of anti-inflammatory steroids and copper metabolism (5, 6).

DHAA acid occurs in biological materials at relatively low concentrations, and it is formed in a redox system in the presence of AA. One additional transporter for AA has been identified in the intestinal cell. L-AA is taken up across the brush-border membrane against a concentration gradient coupled with Na^+ diffusion. Several studies on the entry of AA from luminal content into the enterocyte have demonstrated that the gastrointestinal absorption of AA becomes saturated at doses higher than 500 - 1000 mg, and that AA is taken up against a concentration gradient by an energy dependent process that requires Na^+ (7).

The metabolite, DHAA, from either the lumen or interstitium enters the cell and is enzymatically reduced to AA. The utility of this process is speculative, but some authors find that it could be useful for regulating the whole-body redox state of vitamin C (8, 9, 10).

The pharmacokinetics of AA have been under investigation for many years and the processes of intestinal uptake and metabolism, and its oxidized metabolite DHAA, have been studied extensively (11, 12).

The objective of this study was to determine the relative bioavailability of three commercial tablet formulations of AA: Celong 500 mg prolonged release tablets (test formulation, from Whitehall, Brazil), Cewin 500 mg prolonged release tablets (standard formulation, from Winthrop, Brazil) and Redoxon oral

effervescent 1000 mg tablets (standard formulation, from Roche, Brazil), in healthy male volunteers.

METHODS

Clinical Protocol

Seventeen healthy male volunteers aged between 22 and 50 years (mean $\pm$ S.E.M.: 32 ± 2 yr), weighing between 55.5 and 90.0 kg (73 ± 2 kg) and within 15% of the ideal body weight, were selected for the study. All subjects gave written informed consent, and the clinical protocol was approved by the Ethics Committee of the UNICAMP University Hospital.

The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal and hematological diseases, as assessed by physical and psychiatric examination, ECG and the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, gamma-GT, total bilirubin, sodium, potassium, uric acid, chloride, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, erythrocyte sedimentation rate and routine urinalysis.

The study was conducted in an open randomized three period crossover fashion with a fourteen day washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 8:00 p.m. having already had a normal evening meal, and after an overnight fast they received at 7:00 a.m. a single 1000 mg dose of the allocated formulation according to the appropriate dose randomization code. A medical evaluation was performed before dosing. After the tablet administration, the volunteers were asked to drink 200 ml of tap water. They were then fasted for 6 h following the drug administration, after which a standard lunch was consumed and an evening meal was provided 12 h after dosing. No other food was permitted during the "in-house" period. Liquid consumption was

permitted *ad libitum* after lunch, except for xanthine or vitamin C containing drinks and foods. A low vitamin C ingestion was required two weeks before and during the study (13).

Drug Analysis

Blood samples for serum drug assay were taken from a suitable forearm vein before and 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 and 48 h after each AA formulation administration. On each occasion, one 10 ml sample was taken via "butterfly". The actual times of sampling were recorded using 24 hour clock notation. Venous blood was collected into dipotassium EDTA (1 mg/ml) and the plasma was separated by centrifugation (2,000 g, for 10 minutes) within the next 30 min following blood collection.

Two hundred and fifty microliters of plasma were added to 250 μ l of a 10% metaphosphoric acid solution to precipitate proteins and stabilize ascorbate at low pH. After vortex mixing, the precipitated proteins were removed (2,000 g, for 15 minutes at 4°C) and the supernatants were stored at -20°C until analyzed.

All samples from a single volunteer were analyzed within the same assay in order to avoid inter-assay variations.

Total AA (ascorbate + dehydroascorbate) content in the samples were analyzed by HPLC using the method originally described by Speek et al. (14). Briefly, total AA is oxidized to dehydroascorbate, after which a derivatization step with orthophenylenediamine follows to render a fluorescent adduct, before being separated by HPLC and quantified by fluorimetry.

To 100 μ l of deproteinized sample or standard in a 4 ml polypropylene tube were added 250 μ l of 4.5 M acetate buffer (pH 6.5). Iodine solution (100 μ l of 2,4 mg/ml I₂ in 0.3 M KI) was further added and incubated at room temperature and in the dark during 10 min. Excess iodine was reduced by adding 100 μ l of 0.5 M sodium thiosulphate solution. Orthophenylenediamine (550 μ l of aqueous 1.12

mg/ml orthophenylenediamine solution) was then added and the tubes were again incubated at room temperature and in the dark during 45 min. The samples were then kept at 4°C until being injected into the chromatograph (within the next 8 h).

Chromatographic Conditions

The mobile phase (15 mM Na₂HPO₄ buffer, pH 7.0 / methanol: 77 / 23) was delivered through the column (μBondapak C18 5μm, 30 cm x 4 mm ID) at a flow rate of 1.5 ml/min. The fluorescence detector was set at 360 nm (excitation wavelength) and 402 nm (emission wavelength). Under these conditions, the retention time of total AA was approximately 12 min.

The calibration curve was constructed by plotting total AA peak heights against the concentrations, and the AA content in the samples were calculated from the equation obtained by least-square regression.

The chromatographic system consisted of a Waters 510 pump (Millipore-Waters, USA) with external pulse dampener (Supelco, USA) coupled to a Shimadzu RF 535 fluorescence monitor (Shimadzu, Japan), with the output signal recorded on a Bryans 28000 chart recorder (Bryan Southern Instruments, UK).

Pharmacokinetic and Statistical Analysis

The areas under the individual plasma AA concentration vs. time curves from 0 to 12 h ($AUC_{[0-12h]}$) and from 0 to 48 h ($AUC_{[0-48h]}$; as indexes of extent of absorption) were calculated by applying the trapezoidal method. The maximum observed plasma concentration (C_{max}), the time taken to be achieved (T_{max}) and the ratio $C_{max} / AUC_{[0-48h]}$ (as indexes of rate of absorption) were obtained.

Bioequivalence between both formulations was assessed by calculating individual $AUC_{[0-12h]}$, $AUC_{[0-48h]}$, C_{max} , and $C_{max} / AUC_{[0-48h]}$ ratios (test / reference) and T_{max} differences (test - reference) together with their geometric means and 90%

confidence intervals (CI). The inclusion of the 90% CI for the ratios into the 80 - 125% range, and that of the zero value into the 90% CI for the differences were analyzed by using either parametric (ANOVA for untransformed and log-transformed data) and non parametric (Wilcoxon rank sum test, according to Hauschke et al.; ref. 15) methods.

Drugs and Reagents

Commercially available 1000 mg AA tablets were obtained from Merck (Redoxon® 1000 mg; Proc. N° WH0094), from Whitehall (Celong® 500 mg; Proc. N° WH0094) and from Winthrop (Cewin® 500 mg; Proc. N° WH0094). Analytical grade AA and HPLC grade methanol were supplied by Merck Indústrias Químicas (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Metaphosphoric acid was purchased from Carlo Erba (Italy), dipotassium EDTA was obtained from Vetec Química Fina Ltda. (SP, Brazil) and orthophenylenediamine was obtained from Sigma Chemical Co. (MO, USA).

Analytical grade acetic acid, sodium acetate, sodium thiosulphate and disodium phosphate were purchased from Merck Indústrias Químicas (RJ, Brazil).

RESULTS

All AA formulations were well tolerated at the administered dose. No adverse effects were reported and the biochemical parameters remained unchanged and within the reference range values.

Figure 1 shows an example of chromatograms obtained by the HPLC method described above. Under the described conditions, the lowest quantifiable AA plasma concentration was 2 µg/ml. The calibration curve was linear at least up to 100 µg/ml, with typical regression coefficients of 0.998, and intercept values not significantly different from zero.

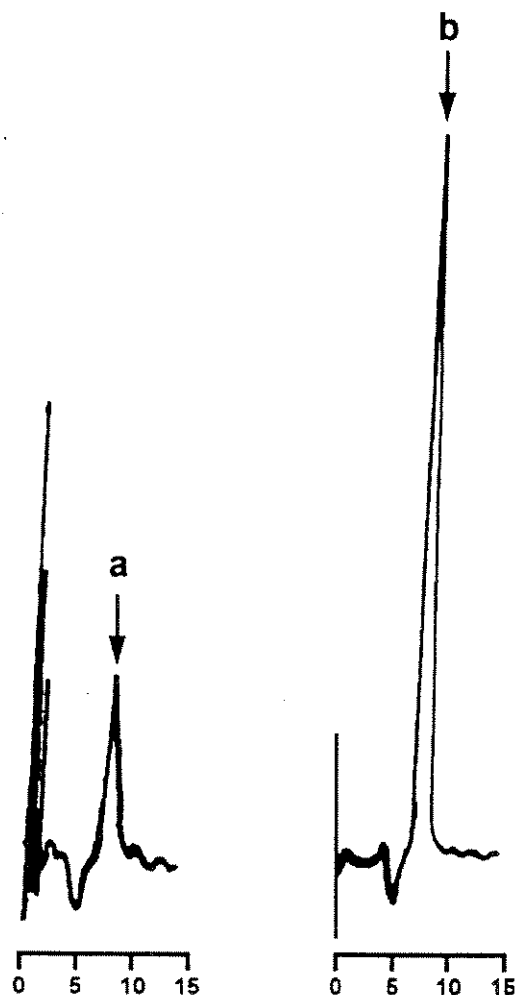


FIG. 1: Examples of obtained HPLC chromatograms. Panel (a): plasma sample taken before the administration of 1000 mg of ascorbic acid (note the presence of the endogenous AA peak, corresponding to C_0 : 2 $\mu\text{g/ml}$). Panel (b): plasma sample taken 5 hours after the administration of 1000 mg of ascorbic acid. The AA concentration measured in this sample was 8 $\mu\text{g/ml}$.

Mean recovery of AA from spiked plasma samples from 5.0 to 10.0 $\mu\text{g/ml}$ was $60.5 \pm 9.0\%$. The inter-assay coefficient of variation for AA at 5.0, 25.0 and 75.0 $\mu\text{g/ml}$ were 4.5, 3.7 and 4.8%, respectively (number of replicates = 8).

Mean total AA plasma concentration vs time profiles obtained after the single oral

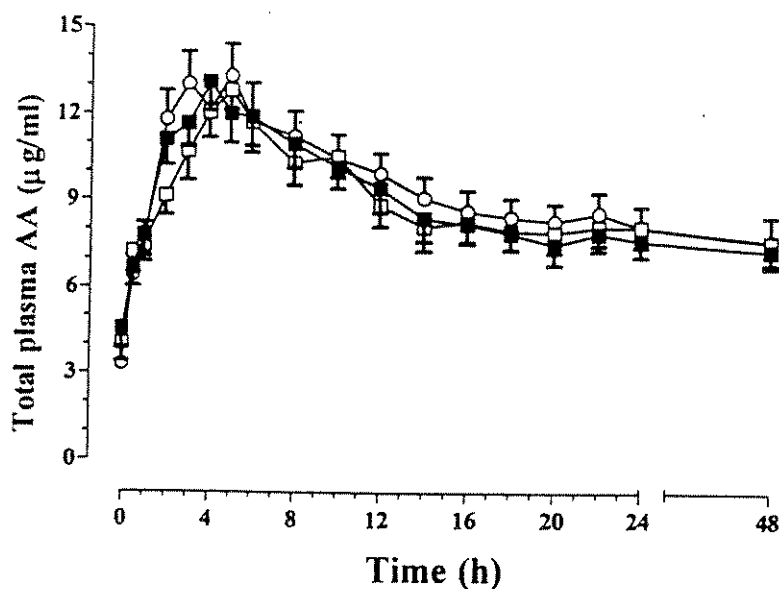


FIG. 2: Total plasma AA concentration (mean $\pm$ SEM) versus time curve obtained from seventeen healthy male volunteers after the single oral administration of each of the ascorbic acid tablet formulation. (Celong: filled squares; Cewin: open squares; Redoxon: open circles).

administration of 1000 mg of each of the formulations are shown in Figure 2.

Mean (and the 90% CI) $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , T_{max} and C_0 (basal AA concentration) values obtained for the three AA tablet formulations are shown in Table 1.

Tables 2, 3 and 4 show the statistical analysis of individual $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} and $C_{max} / AUC_{[0-48]}$ ratios and T_{max} differences between Celong vs Cewin, Celong vs Redoxon and Redoxon vs. Cewin, respectively.

All 90% CI for individual percentual ratios either for $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, $C_{max} / AUC_{[0-48]}$ or C_{max} were included into the accepted bioequivalence range 80 - 125%, and 90% CI for individual T_{max} differences between the formulations significantly included the zero value. Both parametric and non-parametric analysis of C_0 (Tables 2, 3 and 4) revealed that the basal AA concentrations were similar for the three AA tablet formulations.

TABLE 1

MEAN PHARMACOKINETIC PARAMETERS OBTAINED FROM SEVENTEEN HEALTHY MALE VOLUNTEERS AFTER THE ADMINISTRATION OF EACH 1000 MG ASCORBIC ACID TABLET FORMULATION.

Parameter	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] ($\mu\text{g. h. ml}^{-1}$)			
Geom. Mean	381	390	407
90% CI	324 - 447	342 - 445	362 - 458
AUC _[0-12] ($\mu\text{g h ml}^{-1}$)			
Geom. Mean	121	119	126
90% CI	104 - 141	106 - 133	111 - 142
C _{max} ($\mu\text{g / ml}$)			
Geom. Mean	14.0	13.8	14.8
90% CI	12.1 - 16.1	12.4 - 15.5	13.1 - 16.6
T _{max} (h)			
Median	4	5	4.0
Range	2 - 8	2 - 8	2 - 14
C _{max} / AUC _[0-48] (h^{-1})			
Geom. Mean	0.037	0.035	0.036
90% CI	0.034 - 0.040	0.033 - 0.038	0.034 - 0.038
C ₀ ($\mu\text{g/ml}$)			
Arith. Mean	4.6	4.0	3.3
S.D.	2.9	2.6	2.6

DISCUSSION

Various methods have been developed for the detection and quantification of L-AA and/or DHAA acid in whole blood or plasma (16, 17, 18). HPLC methods with electrochemical detection (19, 20) allow for the determination of L-AA only. On the other hand, measurement by UV absorbance is subject to interference by other substances usually present in the sample (e.g. uric acid, hypoxanthine, xanthine, etc.; (21)).

TABLE 2

STATISTICAL ANALYSIS OF $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} AND $C_{max} / AUC_{[0-48]}$ RATIOS (CELONG / CEWIN) AND T_{max} AND C_0 DIFFERENCES (CELONG - CEWIN) OBTAINED AFTER THE ADMINISTRATION OF 1000 mg OF EACH TABLET FORMULATION TO SEVENTEEN HEALTHY MALE VOLUNTEERS.

CELONG / CEWIN % Ratios	Parametric		Non-parametric ^a	
	Geom. Mean	90% CI	Point Estimate	90% CI%
$AUC_{[0-48]}$	97.8	86.1 - 110.9	101.9	89.9 - 110.2
$AUC_{[0-12]}$	105.9	92.0 - 121.7	107.7	91.9 - 121.5
C_{max}	100.9	85.9 - 118.4	103.2	85.7 - 124.1
T_{max} (h)	0.2 ^b	-0.7 - 1.2 ^c	0.0	-0.5 - 1.0
$C_{max} / AUC_{[0-48]}$	103.9	94.4 - 114.2	103.3	94.1 - 112.3
C_0 (µg/ml)	0.5 ^b	-1.1 - 2.2 ^c	0.6	-0.3 - 2.0

The AA may be easily oxidized to DHAA. This oxidation occurs during deproteinization of blood, when oxygen is released from oxyhemoglobin. Due to this oxidation (and also possibly to the previous oxidation during blood collection), transport and storage can produce systematic errors. The fact that AA and DHAA are of equal biological activity, makes the HPLC methodology described here (quantifies the reduced plus the oxidized forms) a valid analytical procedure for evaluating bioequivalence between different pharmaceutical formulations, given the sensitivity and selectivity that this method offers.

The basal plasma AA level before the first confinement was 2.2 (0.6 (g/ml (mean (SEM). One way ANOVA showed significantly higher ($p < 0.0001$)

TABLE 3

STATISTICAL ANALYSIS OF $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} AND $C_{max} / AUC_{[0-48]}$, RATIOS (CELONG / REDOXON) AND T_{max} AND C_0 DIFFERENCES (CELONG - REDOXON) OBTAINED AFTER THE ADMINISTRATION OF 1000 mg OF EACH TABLET FORMULATION TO SEVENTEEN HEALTHY MALE VOLUNTEERS.

CELONG / REDOXON % Ratios	Parametric		Non-parametric ^a	
	Geom. Mean	90% CI	Point Estimate	90% CI
$AUC_{[0-48]}$	93.6	83.0 - 105.6	97.4	90.2 - 104.6
$AUC_{[0-12]}$	94.7	81.5 - 110.1	92.8	81.8 - 101.8
C_{max}	94.9	81.2 - 101.0	94.7	82.3 - 108.9
T_{max} (h)	-0.4 ^b	-1.8 - 1.1 ^c	0.3	-1.0 - 1.0
$C_{max} / AUC_{[0-48]}$	102.7	95.7 - 110.3	105.7	96.1 - 111.3
C_0 (µg/ml)	1.3 ^b	-0.3 - 2.8 ^c	1.0	-0.05 - 2.8

basal levels for the second and third confinement periods (4.1 (0.5 and 5.6 (0.5 (g/ml, respectively. The increase observed in the basal AA levels may have resulted from AA accumulating from the previous confinements, or from the ingestion of AA during the 14 day period between the confinements, even though the subjects had been requested to maintain a low AA diet. However, the statistical methods for comparing the bioavailabilities of the formulations tested here take into account these considerations and make the suitable corrections to avoid variations due to differences between periods.

The elimination rate for AA is inversely proportional to the degree of saturation of the system (22, 23). Thus, the elevated basal levels seen at the second and the

TABLE 4

STATISTICAL ANALYSIS OF $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} AND $C_{max} / AUC_{[0-48]}$, RATIOS (REDOXON / CEWIN) AND T_{max} AND C_0 DIFFERENCES (REDOXON / CEWIN) OBTAINED AFTER THE ADMINISTRATION OF 1000 mg OF EACH TABLET FORMULATION TO SEVENTEEN HEALTHY MALE VOLUNTEERS.

REDOXON / CEWIN % Ratios	Parametric		Non-parametric ^a	
	Geom. Mean	90% CI	Point Estimate	90% CI
$AUC_{[0-48]}$	104.8	94.8 - 116.0	105.1	95.1 - 118.1
$AUC_{[0-12]}$	110.5	101.5 - 120.3	111.9	99.9 - 121.3
C_{max}	107.1	95.5 - 120.0	105.9	92.1 - 124.5
$C_{max} / AUC_{[0-48]}$	103.9	94.4 - 114.2	103.3	94.1 - 112.3
T_{max} (h)	0.6 ^b	-0.8 - 2.0 ^c	0.0	-1.0 - 2.0
C_0 (μg/ml)	-0.7 ^b	-2.3 - 0.8 ^c	-0.5	-2.1 - 0.5

^aAccording to Hauschke et al. (15) and the US FDA (26, 27), non-parametric results are expressed as point estimate and 90% CI of individual ratios, except for T_{max} and C_0 (expressed as point estimate and 90% CI of individual differences).

^bArithmetic mean of individual differences. ^c90% CI of individual differences.

third confinements may indicate that the elimination pathways are saturated (24, 25). Although these basal values could be theoretically subtracted from the corresponding data obtained after the second and third phases, this operation was not made, given that the significant differences observed among periods were not paralleled by significant differences among formulations (Tables 2, 3 and 4), and that this approach could introduce substantial errors into the estimation of the pharmacokinetic parameters (22).

As shown in Table 1, mean $AUC_{[0-48h]}$, $AUC_{[0-12h]}$, C_{max} , $C_{max} / AUC_{[0-48h]}$ and T_{max} values were similar for both formulations with overlapping 90% CI's. Tables 2 and 3 show that 90% CI for mean $AUC_{[0-12]}$ and $AUC_{[0-48]}$ (after the log-transformation of individual ratios) were included into the bioequivalence range, i.e., 80-125%, when analyzed by either parametric or non-parametric analysis, thus showing that each pair of formulations are bioequivalent for the extent of absorption, as required by either the U.S. Food and Drug Administration (26, 27) and the European Union (28).

Parametric and non-parametric tests show that C_{max} ratios (after the log-transformation of individual values) were included into the established bioequivalence range and that T_{max} differences between each pair of formulations were not statistically different from zero (as shown by the 90% CI's). In this way, we can also conclude bioequivalence among all the formulations for the rate of absorption.

Despite C_{max} and T_{max} being considered as indexes of absorption rate, many authors have questioned the usefulness and the limitations of these parameters to decide on a bioequivalence problem, given the effects that the sampling schedule has on them. In this way, Endrenyi et al. (29) have demonstrated that C_{max} not only reflects the rate, but also the extent of absorption, as evidenced by the high correlation observed with the parameter AUC (extrapolated to infinity), and proposed that the ratio C_{max}/AUC should better reflect the absorption rate. In this study, we were not able to estimate the terminal elimination constant to extrapolate the calculated $AUC_{[0-12]}$ or $AUC_{[0-48]}$ to infinity. This is due to the fact that the pharmacokinetic curves derived from the plasma AA concentrations do not show the typical late decaying phase, probably due to the endogenous component. In this way, we felt that the value $AUC_{[0-48]}$ could satisfactorily substitute for the extrapolation to infinity and the variant $C_{max}/AUC_{[0-48]}$ was calculated. Statistical analysis of this variable also

showed that the differences among the three formulations were less than 20%, thus confirming the bioequivalence for the rate of absorption.

Based on these considerations and on the obtained results, we conclude that Celong was bioequivalent to Cewin and Redoxon with regard to both the extent and rate of absorption.

REFERENCES

1. Chatterjee, I. B., Majumder A. K., Nandi, B. K. and Subramanian N., Synthesis and some major functions of vitamin C in animals, *Ann. NY Acad. Sci.*, 258, 24-47 (1975).
2. Moeslinger, T., Brunner, M., Volf, I. and Spieckermann, Spectrophotometric determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, *Clin. Chem.*, 41-8: 1177-1181 (1995).
3. Mondovi, B. and Avigliano, L., In Copper Proteins and Copper Enzymes, CRC Press, Boca Raton, 1984, 101-118.
4. Malmstrom, B. G., Andreasson, L. E. and Reinhammar, B., The Enzymes, Academic Press, 1975, 507-579.
5. Liao, L. S., Lee, B. L., New, A. L. and Ong, C. N., Determination of plasma ascorbic acid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection, *J. of Chrom.*, 612, 63-70 (1993).
6. Gershoff S. N., Vitamin C (Ascorbic Acid): New roles, new requirements?, *Nutrition Reviews*, 51, 313-326 (1993).
7. Stevenson, N., and Brush, M., Existence and characteristics of Na^+ - dependent active transport of ascorbic acid in guinea pig, *Am. J. Clin. Nutr.*, 22, 318-326 (1969).
8. Rose, C. R., Intestinal absorption of water-soluble vitamins, *Soc. for Exp. Biol. and Med.*, 212, 191-198 (1996).
9. Stevenson, N., Active transport of L-ascorbic acid in the human ileum, *Gastroenterology*, 67, 952-956 (1974).

10. Mellors, A.J., Nahrwold DL, Rose RC (1977). Ascorbic acid flux across the mucosa border of guinea pig and human ileum, *Am J Physiol*, 233, E374-E379.
11. Angel, B., Alfred, J., Leichter, J., Lee, M. and Marchant, L., Effect of oral administration of larges quantities of ascorbic acid on blood levels and urinary excretion of ascorbic acid in men, *Int. J. Nutr. Res.*, 45, 237-243 (1975).
12. Davies, H. E. F., Davies, J. E.W., Hughes, R. E. and Jones, E., Studies on the absorption of L-xyloascorbic acid (vitamin C) in young and elderly subjects, *Hum. Nutr. Clin.*, 38, 463-471 (1984).
13. Hornig, D., Vuilleumier, J. P. and Hartmann, D., Absorption of large, single, oral intakes of ascorbic acid. *Hum. Int. J. Nutr. Res.*, 50, 309-314 (1980).
14. Speek, A. J., Schrijver, J. and Schreurs, W. H. P., Fluorometric Determination of Total Vitamin C in Whole Blood by High-Performace Liquid Chromatography with Pre-Colun Derivatization, *J. of Cromatography*, 805, 58-60 (1984).
15. Hauschke, D., Steinijans, V. W. and Diletti E., A distribution- free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 28, 72-78 (1990).
16. Felton, S. P. and Halver J. E., Separation of three commercial forms of vitamin C (ascorbic acid, ascorbic-2-sulfate and ascorbate-2-polyphosphate) by HPLC, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 190, 217-218 (1989).
17. Kacem, B., Marshall M. R. and Gregory J. F., Simultaneous analysis de ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC with postcolumn derivatization and UV absorbance, *J. Agric. Food. Chem.*, 34, 271-274 (1986).
18. Keating, R. W. and Haddad, P. R., Silmultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by reversed-phase ion-pair high-performace liquid chromatography with pre-column derivatization, *J. Chrom.*, 245, 249-255 (1982).
19. Tsao, C. S. and Salimi, S. L, Differential determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid by reversed-phase high-performace liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chrom.*, 245, 355-358 (1982).
20. Iwase, H., Determination of ascorbic acid in elemental diet by high-performance liquid chromatography with eletrochemical detection, *J. Chrom.*, 606, 277-280 (1992).

21. Ross, M. A., Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chrom.*, 657, 197-200 (1994).
22. Piotrovskij, V. K., Kallay, Z., Gajdos, M., Gerykova, M. and Trnovec, T., The use of a nonlinear absorption model in the study of ascorbic acid bioavailability in man, *Biopharm and drug Dispositon*, 14, 429-442 (1993).
23. Wagner, E. S., Lindley, B. and Coffin, R. D. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in urine. Effect on urinary excretion profiles after oral and intravenous administration of vitamin C. *C. J. Chrom.*, 163, 225-229 (1979).
24. Nelson, E. W., Lane, H., Fabri, P. J. and Scott, B., Demonstration of saturation kinetics in the intestinal absorption of vitamin C in man and the guinea pig, *J Clin Pharmacol*, 18, 325-335 (1978).
25. Mellors, A. J., Nahrwold, D.L., and Rose, R.C., Ascorbic acid flux across the mucosal border of guinea pig and human ileum, *Am J Physiol*, 233, E374-E379 (1977).
26. Food and Drug Administration. Bioavailability and Bioequivalence Requirements, Food and Drug Administration, 4-1- Edition. Federal Register. Part 320, 1985, 154-173.
27. Food and Drug Administration In vivo bioequivalence guidances. Pharmacopeial Forum, 1993, 19, 6501-6508.
28. Salmonson, T., Current practice of BA/BE requirements for immediate release products in the EU. Abstract from "Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics," *Internacional Conference of F.I.P.*, "Bio-Internacional 96", Tokyo, Japan, april 22-24, 16-19 (1996).
29. Edrenyi, L., Fritsch, S. and Yan, W., C_{max}/AUC is a clearer measure than C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 29, 394-399 (1991).

Pharmacological characterization of kinin-induced relaxation of human corpus cavernosum

C.E. TEIXEIRA, R.A. MORENO, U. FERREIRA*, N. RODRIGUES NETTO-JR*, A. FREGONESI*,

E. ANTUNES and G. De NUCCI

Discipline of Urology and Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas (SP), Brazil*

Objective To characterize the kinin receptor subtype involved in the relaxation of human isolated corpus cavernosum (HCC) induced by bradykinin (BK), Lys-bradykinin (Lys-BK), Met-Lys-bradykinin (Met-Lys-BK) and des-Arg⁹-bradykinin, and to investigate whether the kinin-induced relaxation of HCC results from the stimulation of nonadrenergic, noncholinergic (NANC) neurons supplying the cavernosal tissue.

Materials and methods Excised HCC tissues were immediately placed in Krebs solution and kept at 4°C until use (never > 24 h after removal). HCC was cut in strips of ≈ 2 cm, suspended in a cascade system and superfused with oxygenated and warmed Krebs solution at 5 mL/min. After equilibration for ≈ 90 min, noradrenaline (3 μ mol/L) was infused to induce a submaximal contraction of the HCC strips. The release of cyclo-oxygenase products was prevented by infusing indomethacin (6 μ mol/L). HCC strips were calibrated by injecting a single bolus of the nitrovasodilator glyceryl trinitrate (GTN) and the sensitivity of the tissues adjusted electronically to be similar. The agonists (kinins, histamine and acetylcholine) were injected as a single bolus (up to 100 μ L) and the relaxation of HCC expressed as a percentage of the submaximal relaxation induced by GTN.

Results Bradykinin, Lys-BK and Met-Lys-BK significantly relaxed the HCC tissues: on a molar basis, there was no statistical difference among the degrees of relaxation induced by these peptides. The B₁ kinin receptor agonist des-Arg⁹-bradykinin had no effect on the HCC. The infusion of the B₂ kinin receptor antagonist Hoe 140 (50 nmol/L) virtually abolished the relaxation

induced by BK, Lys-BK and Met-Lys-BK without affecting those induced by acetylcholine and histamine. The infusion of the nitric oxide synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester increased the tone of the HCC tissues and significantly reduced ($P < 0.01$) the relaxation induced by BK (74%), Lys-BK (90%), Met-Lys-BK (87%) and acetylcholine (89%) without affecting those induced by GTN. The subsequent infusion of L-arginine (300 μ mol/L) partially reversed the increased tone and significantly ($P < 0.01$) restored the relaxation induced by BK, Lys-BK and Met-Lys-BK. The results were similar with the novel guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one] which reduced by > 95% ($P < 0.01$) the relaxation induced by BK, Lys-BK, Met-Lys-BK, acetylcholine and GTN. The infusion of the sodium-channel blocker tetrodotoxin had no significant effect on the BK-, GTN- and acetylcholine-induced relaxation of HCC.

Conclusion This study clearly showed the existence of functional B₂ kinin receptors in human erectile tissues that when activated lead to the release of NO and hence relaxation of the HCC tissues. As tetrodotoxin failed to affect the kinin-induced relaxation of HCC strips, it is likely that these peptides release NO from the endothelium of sinusoidal capillaries rather than from neuronal sources supplying the cavernosal tissue. Although tissue kallikreins and their components have been found in the male reproductive system, the pathophysiological importance of these findings has yet to be elucidated.

Keywords Penile erection, kinins, nitric oxide, B₂ receptors

Introduction

Kinins, e.g. bradykinin (BK), Lys-bradykinin (L-BK) and Met-Lys-bradykinin (ML-BK) are potent vasoactive peptides that influence a variety of biological processes. They are released from either high molecular (HK) or

low molecular (LK) weight kininogen through the enzymatic action of serine proteases called kallikreins. Tissue kallikrein (except the rat enzyme) preferentially forms L-BK from LK, whereas plasma kallikrein forms BK from HK [1].

Bradykinin and its analogues release nitric oxide (NO) and/or prostacyclin from endothelial cells [2–4] leading to the relaxation of different blood vessels via activation

of either B₁ or B₂ receptors [5]. Bradykinin also causes endothelium-dependent relaxation of both rabbit [6] and human [7] corpus cavernosum.

Nitric oxide has been considered a pivotal mediator involved in the nonadrenergic noncholinergic (NANC) relaxation of erectile tissues [8–12]. Beside the endothelium covering the sinusoidal capillaries, NANC nerves supplying erectile tissues have also been reported as an important source of NO production in penile tissues [13,14]. The aim of the present study was to characterize the receptor involved in the relaxation of human isolated corpus cavernosum (HCC) induced by both B₁/B₂ (BK, L-BK and ML-BK) and B₁ (des-Arg⁹-BK) agonists. As kinins are able to stimulate primary sensory neurons [15], we also investigated the effects of the sodium-channel blocker tetrodotoxin (TTX) on the kinin-induced relaxation of HCC.

Materials and methods

HCC tissue from seven patients (17–46 years of age) who underwent multiple organ donation was used. The clinical study was approved by the University hospital ethics committee. Excised tissues were placed immediately in Krebs solution and kept at 4°C until use (never >24 h after removal). The HCC was cut in strips of ≈2 cm (two strips from each patient), the tissues suspended in a cascade [16] and continuously superfused with oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) and warmed (37°C) Krebs solution at 5 mL/min. The responses of the HCC strips were detected with auxotonic levers attached to Harvard heart/smooth muscle transducers and displayed on a Watanabe multichannel pen recorder (Model WTR 381). After an equilibration of ≈90 min, noradrenaline (3 µmol/L) was infused (0.1 mL/min) to induce a sub-maximal contraction of the HCC strips. The release of cyclo-oxygenase products was prevented by infusing (0.1 mL/min) indomethacin (6 µmol/L). HCC strips were calibrated by injecting a single bolus of the nitrovasodilator glyceryl trinitrate (GTN) and the sensitivity of the tissues adjusted electronically to be similar. The agonists (kinins, histamine and acetylcholine [ACh]) were always injected as a single bolus (up to 100 µL).

Drugs

Acetylcholine, noradrenaline, indomethacin, histamine, TTX, L-arginine, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), BK, L-BK, ML-BK and des-Arg⁹-BK were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Glyceryl trinitrate (ampoules containing 1 mg/mL isotonic solution) was obtained from Lipha Pharmaceuticals Ltd (West Drayton, Middlesex, UK). Hoe 140 was kindly provided by Hoechst AG (Frankfurt, Germany). 1H-[1,2,4] oxadia-

zolo[4,3,-alquinoxalin-1-one] (ODQ) was obtained from Tocris Cookson Inc (St Louis, USA).

The Krebs solution (pH 7.4) had the following composition (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.17, CaCl₂·6H₂O 2.5, NaHCO₃ 25 and glucose 5.6.

Statistical analysis

The relaxation induced by the agonists (ACh, histamine and kinins) was measured and calculated as a percentage of the maximal relaxation induced by GTN (dose in nmol). The results are expressed as mean (SEM) of *n* experiments. The ANOVA and Student's unpaired *t*-test were used to evaluate the data, with significance assumed at *P* < 0.05.

Results

Effect of the B₂ kinin receptor antagonist Hoe 140

Bolus injections of GTN (4.3 nmol), ACh (180 nmol), histamine (100 nmol), BK (1–30 nmol), L-BK (1–30 nmol) and ML-BK (1–30 nmol) significantly relaxed the HCC tissues (Fig. 1). On a molar basis, there was no statistical difference between the HCC relaxation induced by BK, L-BK and ML-BK, with the effective dose for 50% inhibition (ED₅₀) being 1.5, 1.3 and 1.4 nmol, respectively (six strips). In contrast, the kinin B₁ receptor agonist des-Arg⁹-BK (30 nmol) had no effect on the HCC tissues (six strips).

The infusion of Hoe 140 (50 nmol/L) virtually abolished the relaxation induced by BK, L-BK and ML-BK without affecting those induced by ACh (180 nmol; 58 (9)% before and 65 (8)% during Hoe 140 infusion) and histamine (100 nmol; 97 (11)% before and 92 (8)% during Hoe 140 infusion; Fig. 1). At the concentration used, Hoe 140 had no effect on the tone of the HCC tissues.

Involvement of NO in kinin-mediated HCC relaxation

The infusion of the NO synthase inhibitor L-NAME (10 µmol/L, eight strips) increased the tone of the HCC tissues (Fig. 2) and markedly reduced (*P* < 0.01) the relaxation induced by ACh (60 nmol), BK (10 nmol), L-BK (10 nmol) and ML-BK (10 nmol; Table 1). The GTN-induced (4.3 nmol) relaxation of HCC was not affected by L-NAME (Fig. 2). The subsequent infusion of L-arginine (300 µmol/L, eight strips) partially reversed the increased tone (Fig. 2) and significantly (*P* < 0.01) restored the relaxation induced by BK, L-BK and ML-BK (Table 1).

Figure 3 shows that infusion of ODQ (10 µmol/L; nine

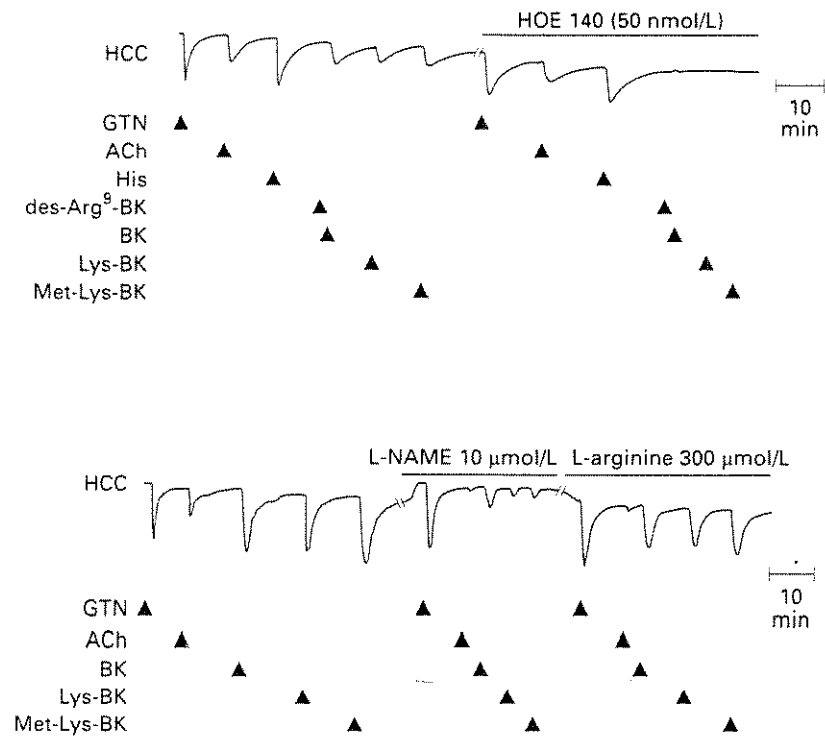


Fig. 1. The B₂ kinin receptor antagonist Hoe 140 (50 nmol/L) inhibited HCC relaxation induced by BK (30 nmol), L-BK (30 nmol) and ML-BK (30 nmol). Note that the bradykinin B₁ receptor agonist des-Arg⁹-BK (30 nmol) had no effect on the HCC strips. The infusion of Hoe 140 affected neither the tone of the HCC tissues nor the HCC relaxation induced by GTN (4.3 nmol), ACh (180 nmol) and histamine (His, 100 nmol). This is a representative tracing from six HCC strips obtained from two donors.

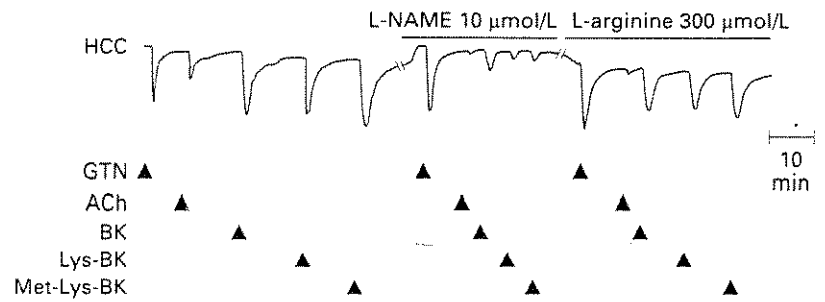


Fig. 2. Effects of L-NAME (10 µmol/L) and L-arginine (300 µmol/L) on HCC strips. The infusion of L-NAME increased the HCC tone and markedly reduced the relaxation induced by ACh (180 nmol), BK (30 nmol), L-BK (30 nmol) and ML-BK (30 nmol). The relaxation induced by GTN (4.3 nmol) was not significantly affected by L-NAME. Subsequent infusion of L-arginine partially reversed the increased HCC tone and also partially restored the relaxation induced by the kinins. This is a representative tracing from eight HCC strips obtained from two donors.

Table 1 The effect of the NO synthesis inhibitor L-NAME (10 µmol/L) and L-arginine (300 µmol/L) on the relaxation of HCC (%) induced by ACh, BK, L-BK and ML-BK. The relaxation induced by ACh and kinins was measured and calculated as a percentage of the maximal relaxation induced by GTN. The results are the mean (SEM) from eight HCC strips

Agents	Control	HCC (% relaxation)	
		L-NAME	L-arginine
ACh (60 nmol)	28 (4)	3 (0.5)†	5 (1)*
BK (10 nmol)	76 (9)	20 (5)†	62 (10)*
Lys-BK (10 nmol)	69 (6)	7 (3.5)†	53 (7)*
Met-Lys-BK (10 nmol)	71 (8)	9 (4)†	56 (8)*

**P* < 0.05 compared with the L-NAME values; †*P* < 0.01 compared to control values.

strips) significantly increased the tone of the HCC tissues and markedly reduced the HCC relaxation induced by ACh (180 nmol: 54 (10)% before and 1.5 (0.5)% during ODQ infusion, *P* < 0.01), BK (30 nmol: 70 (8)% before and 3.5 (0.5)% during ODQ infusion, *P* < 0.01), L-BK (30 nmol: 75 (7)% before and 3 (1)% during ODQ infusion, *P* < 0.01) and ML-BK (30 nmol: 77 (10)% before and 3.5 (1)% during ODQ infusion, *P* < 0.01). The GTN-induced (4.3 nmol) HCC relaxation was also significantly reduced by ODQ, with 93 (2)% inhibition (*P* < 0.01). The relaxation evoked by these agents was

partially restored 30 min after stopping ODQ infusion (Fig. 3).

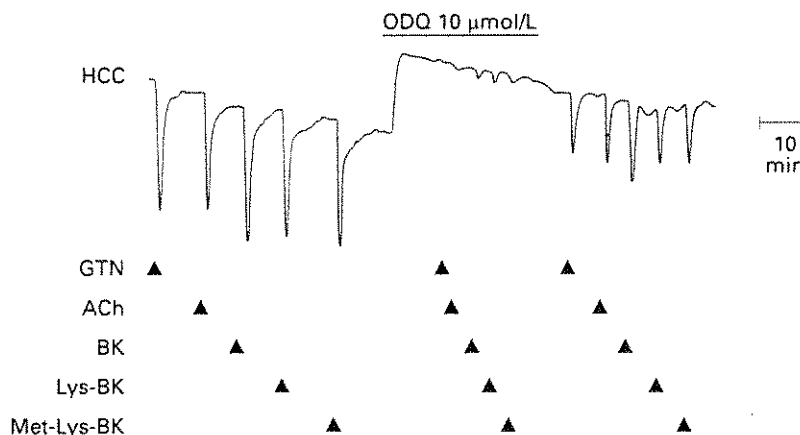
The infusion of TTX (1 µmol/L) did not affect the relaxation of HCC induced by ACh (60 nmol: 50 (9)% before and 68 (12)% during TTX infusion) and BK (10 nmol: 92 (7)% before and 87 (6)% during TTX infusion). Tetrodotoxin also had no effect on the GTN-induced relaxation of HCC (data not shown).

Discussion

This study shows that BK, L-BK and ML-BK (but not des-Arg⁹-BK) relax *in vitro* preparations of HCC, indicating the existence of functional B₂ kinin receptors in human erectile tissues. The kinin-induced HCC relaxation was caused by the release of NO from the HCC preparations, as the NO synthesis inhibitor L-NAME markedly reduced the relaxation and L-arginine significantly reversed this inhibition. This was confirmed by using ODQ, a potent and selective inhibitor of NO-stimulated guanylate cyclase [17], which virtually abolished the kinin-induced HCC relaxation.

Although tissue kallikrein, kininogens, kinins and kininases have been found in different tissues of the male reproductive system [18,19], the physiological importance of these findings is still unclear. Among these tissues, specific staining for tissue kallikrein was detected in the Sertoli cells, epithelial cells of the

Fig. 3. Inhibition by the selective soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$) of HCC relaxation induced by GTN (4.3 nmol), ACh (180 nmol), BK (30 nmol), L-BK (30 nmol) and ML-BK (30 nmol). The infusion of ODQ increased the tone of the tissues and virtually abolished the relaxation induced by the agonists. After infusion, the relaxation was partially restored. This is a representative tracing from nine HCC strips obtained from three donors.



epididymis and the adenocytes of the prostate [20]. They also contain both kininogen [21] and a kinin-inactivating enzyme, mainly a KII-angiotensin converting enzyme type [22]. Clinical trials conducted in infertile men [23,24] have suggested that the tissue kallikrein-kinin system is functionally involved in the regulation and stimulation of sperm motility, as well as in raising the number of spermatozoa [19,25,26].

Bradykinin stimulates primary sensory neurons [15] and releases neuropeptides (substance P, calcitonin gene-related peptide and VIP) from their peripheral nerve endings in different tissues [27]. Interestingly, immunoreactivity studies have revealed the existence of these neuropeptides in nerves of the corpus cavernosum from various species (including man) suggesting a role in penile erection [28–30]. Furthermore, both VIP and substance P are able to relax HCC strips *in vitro* [31]. However, it is unlikely that kinin-induced HCC relaxation is mediated by the release of neuropeptides from NANC nerve fibres supplying the cavernosal smooth muscle, as TTX failed to affect the relaxation.

Recent studies have detected NANC nitrergic nerve fibres in erectile tissues and suggested that the most important source of NO in these tissues is neuronal [32,33]. The finding that kinin-induced HCC relaxation occurs independently of nerve stimulation implies that this peptide causes the release of NO from the endothelium of sinusoidal capillaries supplying the cavernosal tissue, rather than from neuronal sources. Whether BK may be involved in penile erection *in vivo* is currently being investigated.

References

- 1 Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 1–80
- 2 De Nucci G, Gryglewski RG, Warner TD, Vane JR. The receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2334–8
- 3 De Nucci G, Warner T, Vane JR. Effect of captopril on the bradykinin-induced release of prostacyclin from guinea-pig lungs or bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 783–8
- 4 D'Orleans-Juste P, De Nucci G, Vane JR. Kinins act on B_1 or B_2 receptors to release conjointly endothelium derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 920–6
- 5 Regoli D, Rhaleb N-E, Dion S, Drapeau G. New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B_2 receptor characterization. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 156–61
- 6 Kimoto Y, Kessler R, Constantinou CE. Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *J Urol* 1990; 144: 1015–7
- 7 Kimoto Y, Kumazawa J, Kessler R, Constantinou CE. Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *Jpn J Pharmacol* 1992; 58: 321P
- 8 Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 843–50
- 9 Pickard RS, Powell PH, Zar MA. The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 755–9
- 10 Kim N, Azadzi KM, Goldstein I, Saenz De Tejada I. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest* 1991; 88: 112–8
- 11 Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992; 326: 90–4
- 12 Andersson K-E, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 1995; 75: 191–236
- 13 Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 308–14

- 14 Keast JR. A possible neural source of nitric oxide in the rat penis. *Neuroscience Lett* 1992; 143: 69–73
- 15 Kaufman MP, Coleridge HM, Coleridge JCC, Baker DG. Bradykinin stimulates afferent vagal C-fibers in intrapulmonary airways of dogs. *J Appl Physiol* 1980; 48: 511–7
- 16 Vane JR. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br J Pharmacol Chemother* 1964; 23: 360–73
- 17 Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 184–8
- 18 Saitoh S, Kumamoto Y, Shimamoto K, Iimura O. Kallikrein in the male reproductive system. *Arch Androl* 1987; 19: 133–47
- 19 Schill W-B, Miska W, Parsch E-M, Fink E. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In Fritz H, Schmidt I, Dietze G, eds. *The kallikrein-kinin system in health and disease*. Limbach: Druck-und Verlagshaus Braunschweig 1989: 171–203
- 20 Kumamoto Y, Saitoh S, Ito N, Shimamoto K, Iimura O. Localization of kallikrein in human male genital organ. *Adv Exp Med Biol* 1989; 247: 189–93
- 21 Fink E, Schill W-B, Miska BW. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma. *Adv Exp Med Biol* 1989; 247: 311–6
- 22 Krassnigg F, Niederhauser H, Fink E, Frick J, Schill W-B. Angiotensin converting enzyme in human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. *Int J Androl* 1989; 12: 22–8
- 23 Schill W-B. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double-blind study. *Arch Androl* 1979; 2: 163–70
- 24 Micic S. Kallikrein and antibiotics in the treatment of infertile men with genital tract infections. *Andrologia* 1988; 20: 55–9
- 25 Schill W-B, Haberland GL. Kinin-induced enhancement of sperm motility. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1974; 355: 229–31
- 26 Steiner R, Hoffmann N, Hartman R, Kaufmann R. The influence of kallikrein on the velocity of human spermatozoa measured by laser Doppler spectroscopy. In Haberland GL, Rohen JW, Suzuki T, eds. *Kininogenases, Kallikrein* 4th edn. Stuttgart-New York: Schattauer Verlag, 1977: 229–35
- 27 Geppetti P. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept* 1993; 47: 1–23
- 28 Larsen JJ, Ottosen B, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the male genitourinary tract: concentration and motor effect. *Invest Urol* 1981; 19: 211–3
- 29 Gu J, Polak JM, Probert L *et al.* Peptidergic innervation of the human male genital tract. *J Urol* 1983; 130: 386–91
- 30 Stief CG, Wetterauer U, Schaebdsau FH, Jonas U. Calcitonin gene-related peptide: a possible role in human penile erection and its therapeutic application in impotent patients. *J Urol* 1991; 146: 1010–4
- 31 Andersson K-E, Hedlund H, Mattiasson A, Sjogren C, Sundler F. Relaxation of isolated human corpus spongiosum induced by vasoactive intestinal polypeptide, substance P, carbachol and electrical field stimulation. *World J Urol* 1983; 1: 203–8
- 32 Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TSK, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401–3
- 33 Burnett AL, Tillman SL, Chang TSK *et al.* Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 1993; 150: 73–6

Authors

C.E. Teixeira, MSc.
 R.A. Moreno, MSc.
 U. Ferreira, MD, Urologist.
 N. Rodrigues Netto Jr, MD, Urologist.
 A. Fregonesi, MD, Urologist.
 E. Antunes, PhD, Assistant Professor.
 G. de Nucci, MD, PhD, Full Professor.
 Correspondence: Dr E. Antunes, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP PO Box 6111, 13081-970, Campinas (SP), Brazil.

Lonomia obliqua Caterpillar Spicules Trigger Human Blood Coagulation via Activation of Factor X and Prothrombin

José L. Donato¹, Ronilson A. Moreno¹, Stephen Hyslop¹, Alaor Duarte²,
Edson Antunes¹, Bernard F. Le Bonniec³, Francine Rendu³, Gilberto de Nucci¹

From the ¹Department of Pharmacology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

²Nephrology Clinic, Passo Fundo University, Passo Fundo, RS, Brazil;

³U428 INSERM, Université de Formation et de Recherches de Pharmacie, Paris V, France

Summary

In southern Brazil, envenomation by larvae of the moth *Lonomia obliqua* (Walker) may result in blood clotting factor depletion, leading to disseminated intravascular coagulation with subsequent haemorrhage and acute renal failure which may prove fatal. We have examined the effect of a crude extract of spicules from these caterpillars on *in vitro* hemostasis. The extract alone did not aggregate platelets and had no detectable effect on purified fibrinogen, suggesting that extract induces clot formation by triggering activation of the clotting cascade. In agreement with the presence of thrombin-mediated activity, hirudin prevented clot formation. The extract was found to activate both prothrombin and factor X, suggesting that the depletion of blood clotting factors results from the steady activation of factor X and prothrombin. Heating and diisopropylfluorophosphate abolished the procoagulant activity of the extract, indicating that the active component involved is a protein that may belong to the serine protease family of enzymes. The ability of hirudin to inhibit this coagulant activity suggests that this inhibitor could be beneficial in the treatment of patients envenomed by *L. obliqua* caterpillars.

Introduction

Skin contact with the larvae of certain insect species, such as moths belonging to the Family Saturniidae, results in allergic reactions, fever, necrosis, and haemorrhage (1). In South America, severe cases of such envenomation arise from contact with the caterpillars of moths belonging to the genus *Lonomia* (2, 3). Most studies published to date have reported envenomation by *L. achelous* (Cramer), distributed in the Guyano-Amazonian region where various cases have been observed over the last 25 years (2-5). Envenomation results in pain, urticaria, and a moderate disseminated intravascular coagulation which can trigger an acquired haemorrhagic syndrome. Clinical reports indicate that bleeding originates from a low plasma concentration of fibrinogen, factor V, factor XIII and plasminogen, which severely afflicted individuals also experiencing prothrombin consumption. Two distinct prothrombin activators have been characterized in *L. achelous* (Cramer) hemolymph (6), and two isoenzymes with strong fibrinolytic activity (achelase I and II) have been isolated, and their amino acid sequence determined (7).

The related species, *L. obliqua* (Walker), which differs from *L. achelous* in the organization of the male genitalia (8), is found prin-

cipally in the southern Brazilian states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, but also occurs in the states of Paraná and São Paulo. In the last five years, numerous cases of envenomation resulting from contact with *L. obliqua* have been reported (3). In addition to the haemorrhagic syndrome observed in accidents involving *L. achelous*, victims of *L. obliqua* frequently develop acute renal failure which, together with intracranial haemorrhage, may lead to fatal outcomes. We report here that an extract from the spicules of *L. obliqua* caterpillars activates factor X and prothrombin, accounting for the procoagulant activity of the venom.

Materials and Methods

Preparation of spicule extract. *L. obliqua* caterpillars were collected near the city of Passo Fundo (Rio Grande do Sul, Brazil), rapidly frozen in liquid nitrogen, and the spicules harvested by cutting at their base. Proteins were extracted by grinding the spicules with a mortar and pestle in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Following centrifugation at 2000 × g for 25 min at 4° C, the resulting supernatant was filtered through a 0.32 µm filter, and stored in small aliquots at -20° C, until use. The total protein content of the extract was determined by a modification of the Lowry assay, using bovine serum albumin as the standard (9).

Inactivation of the enzymatic activity of the extract was achieved by adding 25 µl of diisopropylfluorophosphate (DFP, 200 mM in isopropyl alcohol) to 500 µl extract (≈ 1.5 mg/ml). Following a 30 min incubation at room temperature, unreacted DFP was removed by ultrafiltration through a 3 kDa exclusion membrane. The treated extract was washed once with 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 and resuspended in 500 µl of the same buffer.

Functional studies. Human prothrombin, thrombin, factor X, and fibrinogen were purified as previously described (10, 11). Clotting times were recorded at 37° C after the addition of various amounts of extract (100 µl diluted in 150 mM Tris-imidazole-saline buffer, pH 7.4) to a mixture of 100 µl of citrated plasma and 100 µl of either CaCl₂ (25 mM) or EDTA (15 mM). Clotting times of factor V and factor X deficient plasmas (Diagnostica Stago, Asnières, France) were recorded under the same conditions. Alternatively, 100 µl of highly purified fibrinogen (6 µM) was used in the place of plasma. Inhibition of the procoagulant activity was determined as above after a 30 s preincubation of the spicule extract with Hirulog (up to 0.2 µM; kindly provided by Dr. J. M. Maraganore, Biogen, Cambridge, MA, U.S.A.) or recombinant hirudin (up to 0.5 µM; Ciba-Geigy, Basel, Switzerland).

Factor X activation was followed at 25° C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 100 mM NaCl and 0.2% (w/v) poly(ethylene)glycol (Mr 6000). The reactions were initiated at appropriate intervals by mixing 10 µl of factor X (2 µM) with 10 µl of extract (≈ 60 µg/ml) in multiwell plates. Following incubation, activated factor Xa was detected by monitoring the increase in absorbance at 405 nm (A₄₀₅) with time after the addition of 100 µl (100 µM) of Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S2222, Chromogenix, Mölndal, Sweden). The absorbance was read using a Thermomax microplate reader (Molecular Devices). Prothrombin activation (2 µM) was assayed under similar conditions.

Correspondence to: Dr. G. de Nucci, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Caixa Postal 6111, 13081-970, Campinas, SP, Brasil - Tel.: +55 19 251 6928; FAX Number: +55 19 252 1516

except that H-D-Phe-pipecolyl-Arg-*p*-nitroanilide (S2238) was used instead of S2222 in order to detect the resulting thrombin activity.

Factor X and prothrombin activation was also investigated by following the time-dependent formation of reaction product at 37°C in a Perkin Elmer lambda 14 spectrophotometer. Cuvettes (1 cm path length) were filled with 990 µl of a mixture of either prothrombin (2 µM) and S2238 (≈200 µM) or factor X (1 µM) and S2222 (≈200 µM) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 100 mM NaCl, 0.2% (w/v) poly(ethylene)glycol (Mr 6000) and CaCl₂ (2 mM). The mixture was incubated in the thermostatted cell holder of the spectrophotometer for 10-15 min until equilibrium was attained, and the increase in A₄₀₅ with time was then monitored for up to 3 h after the addition of 10 µl of extract (≈60 µg/ml).

Platelet preparation and stimulation. Blood from healthy donors who had not taken any medication for at least ten days was collected into 0.1 vol of citric acid/citrate/dextrose solution and the platelets were isolated as previously described (12). Prior to aggregation, 0.5 ml of washed platelets (1.5 × 10⁹/ml) were prewarmed for 1 min at 37°C with stirring (900 rpm). Calcium was added to a final concentration of 1 mM immediately before the assay. Aggregation was initiated by the addition of up to 50 µl of spicule extract (or thrombin, 1 nM) and monitored for 5 min in a two channel Payton aggregometer (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY).

Results

Spicule extract triggers blood coagulation. Since skin contact with *L. obliqua* caterpillars induces disseminated intravascular coagulation which can lead to haemorrhage, we examined the effect of a spicule extract on *in vitro* haemostasis. The addition of increasing amounts of

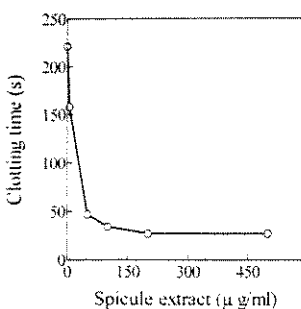


Fig. 1 Blood coagulation in the presence of *L. obliqua* spicule extract. Clotting time of recalcified human citrated plasma (in seconds) in the presence of increasing amounts of *L. obliqua* spicule extract. Each data point represents the mean of four determinations.

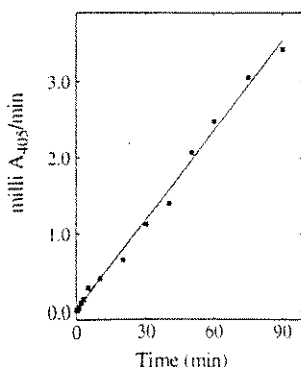


Fig. 2 Factor X activation by *L. obliqua* spicule extract. The concentration of factor Xa (expressed in milli A₄₀₅/min) versus time when 1 µM of factor X was incubated with 0.6 µg of spicule extract. Less than 10% of the initial factor X concentration was activated after 90 min. The solid line represents the initial velocity of factor X activation, obtained by linear regression analysis. Extract alone steadily hydrolyzed S2222 in the absence of factor X (2.8 milli A₄₀₅/min). This factor Xa-independent hydrolysis was subtracted from each data point of factor X activation to yield the rate of pNA release attributable to factor Xa only.

Table 1 Clotting times of factor V- and X-depleted plasmas in the presence of *L. obliqua* spicule extract (60 µg/ml)

Plasma	Extract	Clotting time (s)	SD	n
Normal	-	182	18	5
	+	25	2	5
Factor V-deficient	-	>900	-	4
	+	35	2	5
Factor X-deficient	-	454	52	4
	+	28	3	5

extract to recalcified plasma markedly decreased the clotting time (Fig. 1). This acceleration was dose-dependent at extract concentrations of up to 150 µg/ml (maximum acceleration of about 10-fold). To investigate whether the procoagulant activity resulted from a direct hydrolysis of plasma fibrinogen and/or from the activation of one (or more) component(s) of the clotting cascade, we attempted to clot highly purified fibrinogen (2 µM) with spicule extract (20 µg/ml) but no clot formation was observed, even after a 3 h incubation. When thrombin was added to this 3 h incubation mixture, a clot formed within 10 s, suggesting that the extract alone had little or no effect on fibrinogen and that clot formation was mediated through the action of thrombin rather than induced directly by the extract. Consistent with this hypothesis was the observation that when extract was added to recalcified plasma in the presence of 0.2 µM Hirulog, clotting time increased to ≈ 600 s and no clot formation occurred within 900 s in the presence of 0.5 µM hirudin. Addition of 10 to 300 µg of extract/ml failed to provoke a detectable response in platelets and did not accelerate or interfere with thrombin-induced aggregation.

Heating at 60°C for 30 min or treating with DFP abolished the procoagulant activity of the extract, suggesting that the active component is a protein which may belong to the serine protease family of enzymes.

Spicule extract contains a factor X activator. The above observations suggested that the addition of spicule extract to plasma could lead to thrombin formation, either by initiating the clotting cascade or by directly activating prothrombin. We first investigated whether the extract contained a factor X activator by evaluating its ability to form factor Xa. The concentration of newly formed factor Xa was determined from the rate of hydrolysis of S2222 (a relatively specific *p*-nitroanilide substrate for factor Xa). Factor X on its own was stable in the kinetic buffer no S2222 hydrolysis was detected even after a 3 h incubation at 37°C. The extract by itself slowly hydrolyzed S2222 at a rate which remained constant over a 3 h period. Thus, while a background hydrolysis was observed, the rate of S2222 hydrolysis was constant suggesting that the incubation conditions did not cause detectable zymogen activation or enzyme depletion within the extract. When factor X was incubated with the extract in the absence of added calcium, the rate of S2222 hydrolysis increased dramatically with time (Fig. 2). Consistent with a direct activation of factor X, the generation of factor Xa proceeded without a discernible lag phase and the increase in activity was linear with time up to 10% of full factor X activation.

Spicule extract contains a calcium-dependent prothrombin activator. To investigate whether the procoagulant activity of the extract acts via the prothrombinase complex alone, we examined the influence of extract on the clotting times of factor V- or X-depleted plasma. In both cases, the extract dramatically reduced the clotting times of the two deficient plasmas (Table 1), implying that direct factor X activation was not the only trigger for thrombin formation in plasma. Prothrombinase is the only prothrombin activator in the clotting cascade, and the

activation complex includes both factor Xa and Va. Thus, in addition to direct factor X activation, the spicule extract also directly activates prothrombin. We investigated the capacity of the extract to generate thrombin activity based on the hydrolysis of S2238 (a relatively specific substrate for thrombin). Prothrombin was incubated with the extract for different lengths of time, and the thrombin concentration was evaluated from the rate of S2238 hydrolysis. However, our attempts to detect extract-induced prothrombin activation failed until we realized that, in contrast to factor X activation, the reaction was calcium-dependent. When calcium (2 mM) was added to the assay buffer, prothrombin activation was readily detectable (Fig. 3). As with factor X, prothrombin on its own was stable for 3 h in the assay buffer, since no hydrolysis of substrate was observed. A slow hydrolysis of S2238 by the extract alone was detectable in the absence of prothrombin. In the presence of extract, calcium, and prothrombin, the time course of S2238 hydrolysis exhibited an upward curvature typical of coupled reactions in which the first reaction (i.e. prothrombin activation by the extract) is rate-limiting.

Discussion

Several cases of generalized haemorrhage following contact with larvae of the moth *L. obliqua* have recently been reported (13). The symptoms of envenomation are very similar to those observed following *L. achelous* envenomation in Venezuela, even though the two species have different geographical distributions. In spite of the similarities in the clinical aspects of envenomation, caterpillars from the two species may differ not only genetically (8), but also toxinologically. Our data suggest that the spicules of *L. obliqua* larvae contain at least two activities: a factor X activator and a calcium-dependent prothrombin activator.

The active component of the spicule extract is likely to be a protein belonging to the serine protease family. The inability of the *L. obliqua* extract to trigger plasma coagulation in the presence of the specific thrombin inhibitor hirudin indicates the presence of a thrombin-mediated activity. However, from our *in vitro* investigation, three observations exclude the presence of a thrombin-like enzyme: (i) highly purified fibrinogen was not degraded by the extract alone, (ii) the spicule extract did not induce platelet aggregation, and (iii) hirudin had no effect on the extract-induced hydrolysis of S2238. The extract stimulated factor X as well as prothrombin activation. In a very similar form, the hemolymph of *L. achelous* does not have a thrombin-like activity. In addition, this hemolymph was able to hydrolyse S2222 and contains a direct prothrombin activator (6). In this case, thrombin formation occurred in the absence of calcium, but this activity was greatly enhanced by the presence of phospholipids, calcium plus factor V.

During normal blood coagulation, factor X is activated by factor IXa within the Tenase complex (14). Thus, the presence of factor X and prothrombin activators are clearly sufficient to trigger blood coagulation and the subsequent fibrinogen depletion reported in *L. obliqua* victims. Thrombin produced either directly or through factor Xa activation cleaves fibrinogen, factor V and factor XIII, resulting in the consumption of these factors. The inoculation of even a very small amount of venom is enough to trigger a long-term coagulation defect, principally though the slow but continuous activation of the clotting cascade. Ultimately, the levels of several blood clotting factors fall below their physiological limit, and result in the paradoxical haemorrhagic syndrome. Human plasma seems unable to neutralize this venom, which appears to have a long half-life in the blood stream. That hirudin and hirulog neutralize the coagulant activity may suggest at first that

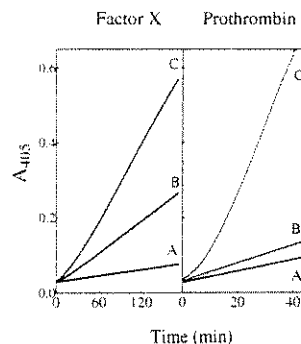


Fig. 3 Factor X and prothrombin activation by the *L. obliqua* spicule extract in the presence of 2 mM calcium. Factor X (left panel) and prothrombin (right panel) activation after the addition of 0.6 μ g of spicule extract in the presence of 2 mM calcium. The chromogenic substrates S2222 and S2238 (200 μ M) were used to detect factor X (1 μ M) and prothrombin (2 μ M) activation, respectively. In each panel, curve A represents the background hydrolysis of the pNA substrate by factor X or prothrombin (in the absence of extract), curve B represents the background hydrolysis of the pNA substrate by the extract alone, and curves C represents the hydrolysis by a mixture of extract and either factor X or prothrombin. The experiment was performed at 37°C

these very efficient thrombin inhibitors (15) could be beneficial in the treatment of patients envenomed by *L. obliqua* caterpillars. However, if coagulation is continuously activated, hirudin, and most other anti-coagulants (including heparin) are likely to be of limited benefit, and antibody therapy designed to neutralize the persisting activator would be preferable. An antiserum for this purpose has recently been described (16).

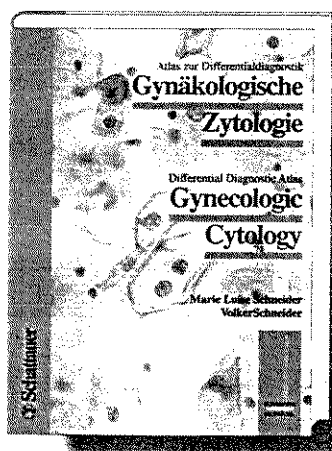
References

1. Kawamoto F, Kumada N. Biology and venoms of lepidoptera. In: Handbook of Natural Toxins (vol. 2). Insect Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms. Tu AT, ed. Marcel Dekker Inc, New York, 1984; pp 291-330.
2. Arocha-Piñango CL, de Bosch NB, Torres A, Goldstein C, Nouel A, Argüello A, Carvajal Z, Guerrero B, Ojeda A, Rodríguez A, Rodríguez S. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. *Thromb Haemost* 1992; 67: 402-7.
3. Pinto Moraes RH. Acidentes por lepidópteros. In: Plantas venenosas e animais peçonhentos. Schwartsman S, ed. Sarvier, São Paulo, SP 1992; 233-44.
4. Arocha-Piñango CL, Blumenfeld-Bosch et al. Fibrinolytic and procoagulant agents from a Saturniidae moth caterpillar. In: Hemostasis and animal venoms. Pirkle H, Markland FS, eds. Marcel Dekker, New York, NY 1988; pp 220-40.
5. Arocha-Piñango CL, Layrisse M. Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *Lancet* 1969; 1: 810-2.
6. Guerrero B, Arocha-Piñango CL. Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thromb Res* 1992; 66: 169-77.
7. Amarant T, Burkhart W, LeVine H, Arocha-Piñango CL, Parikh I. Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic saturniid caterpillar *Lonomia achelous*. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1079: 214-21.
8. Lemaire C. Revision du genre *Lonomia* Walker. *Ann Soc Entomol Fr* 1972; 8: 767-861.
9. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346-56.

10. Le Bonniec BF, MacGillivray RTA, Esmon CT. Thrombin Glu-39 restricts the P3 specificity to nonacidic residues. *J Biol Chem* 1991; 266: 13796-803.
11. Le Bonniec BF, Guinto ER, Esmon CT. The role of calcium ions in factor X activation by thrombin E192Q. *J Biol Chem* 1992; 267: 6970-6.
12. Rendu F, Lebreu M, Tenza D, Levy-Toledano S. How does fluoroaluminate activate platelets. *Biochem J* 1990; 265: 3439.
13. Kelen EMA, Picarelli ZP, Duarte AC. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). *J Toxinol Toxin Rev.* 1995; 14: 283-308.
14. Davie EW, Fujikawa K, Kiesel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-70.
15. Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW. Design and characterization of Hirulogs: A novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry* 1990; 29: 7095-101.
16. Dias da Silva W, Rocha Campos ACM, Gonçalves LRC, Souza e Silva MCC, Higashi HG, Yamaguchi IK, Kelen EMA. Development of an anti-venom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 1996; 34: 1045-9.

Received August 6, 1996 Accepted October 9, 1997

GYNECOLOGIC DIAGNOSIS



Schneider/Schneider
Gynecologic Cytology
Differential Diagnostic Atlas

EUROBOOK/BILINGUAL

1995. 296 pages, 199 illustrations
mostly in color, 2 tables, bd.
DM 298,-/approx. US \$ 213.00
ISBN 3-7945-1547-1

Cytology is an essential part of gynecologic diagnosis. This bilingual atlas shows typical cellular pictures of the most important pathologic conditions. The malignant and premalignant lesions of the squamous epithelium with their inflammatory, degenerative and regenerative alterations as well as the increasingly important changes of the glandular epithelium are described. The illustrations of the atlas are of special didactic value: each colour picture is combined with an explanatory schematic drawing for identification of single cells or cell elements.

This third, for the first time bilingual edition is based on the latest developments in gynecologic cytology: text and references are completely revised, several figures have been exchanged or supplemented for better explanation, and the new chapter of papilloma virus infection of the female genitals has been added. However, the proven systematic structure and excellent didactic principle have not been changed.

F. K. Schattauer Publishing Co. Stuttgart - New York

Distributors:

United States and Canada:

John Wiley & Sons, Inc., Wiley-Liss Division, 605 Third Avenue, New York, NY 10158-0012/USA

UK, Eire, Spain, France, The Netherlands and South Africa:

British Medical Journal, BMA House, Travistock Square, London WC1H 9JR

Influence of gastric acid secretion blockade and food intake on the bioavailability of a potassium diclofenac suspension in healthy male volunteers

A. POLI², R.A. MORENO¹, W. RIBEIRO¹, H.B. DIAS¹, H. MORENO JR¹, M.N. MUSCARÁ¹ and G. DE NUCCI¹

¹Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil and ²Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Abstract. The bioavailability of a single dose of a potassium diclofenac (KDIC) suspension (Flogan, Merck, 7ml, 105 mg) was studied in 13 healthy male volunteers in the fasting state (placebo phase, PLA), after gastric acid secretion blockade (subacute pretreatment with omeprazole, OME phase) and after food intake (FOOD phase). A 14-day washout period between phases was adopted. Serum samples were obtained over a 24 hour interval and the diclofenac concentrations were determined by high pressure liquid chromatography with ultraviolet detection. From the serum diclofenac concentration vs time curves, the AUC_[0-∞] (area under the concentration vs time curves from 0 to infinity), C_{max} (maximum achieved concentration), t_{max} (time to achieve C_{max}), K_e (terminal first order elimination constant), half-life values (t_{1/2}) and AUC_{[0-∞]/t_{1/2} ratio as an index of diclofenac clearance, were obtained. All these variables were analyzed using both parametric and non-parametric statistics. In the presence of food, KDIC absorption was delayed (as shown by lower C_{max} and greater t_{max} values) and decreased (as shown by lower AUC_[0-∞] values), and the serum diclofenac concentration vs time curves showed a biphasic pattern. Omeprazole pretreatment did not change the absorption parameters. Both of these treatments altered the diclofenac clearance, as assessed by the AUC_{[0-∞]/t_{1/2}, t_{1/2} and K_e values, although the changes were not considered to be clinically significant, because of the wide therapeutic range for diclofenac. The delay in the rate of diclofenac absorption produced by food intake was not due to an increase in the gastric pH, and could be of particular importance when rapid analgesia is desired.}}

Key words: potassium diclofenac suspension – human volunteer pharmacokinetics – bioavailability – gastric acid blockade – omeprazole – food intake – drug interaction

Introduction

Diclofenac ([2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetic acid) is a potent nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) belonging to the phenyl acetic group, and is widely used in its sodium salt form in cases of chronic and acute inflammation [Altman 1986, Calabro 1986, Kantor 1986, Zuckner 1986]. The potassium salt of diclofenac (KDIC) has been marketed mainly in Latin America and has been prescribed for acute conditions to provide fast analgesic and antiinflammatory effects [Bahamonde and Saavedra 1990, Verstraeten and Bakshi 1991].

The main problem associated with NSAID therapy is the ability of these drugs to induce gastrointestinal injury, most notably gastric ulceration, bleeding and perforation, as well as an increased risk of bleeding from preexisting peptic ulcers [Soll et al. 1991]. In an attempt to reduce NSAID-induced mucosal lesions and ulcer formation or exacerbation, several clinical practices have been adopted including the oral administration of the drug at mealtimes, the use of special preparations such as enteric-coated tablets or the concomitant administration of antacids [Brzozowski et al. 1993], histamine H₂ receptor antagonists [Van Berge Henegouwen and Smout 1991], prostanoids [Miller 1992] or proton-pump inhibitors [Scheiman et al. 1994].

Drugs dissolved in biological fluids exist as predominantly weak ionizable species and are absorbed across the plasma membrane in their nonpolar or unionized forms. The ionized forms cannot cross the membrane due to the hydrophobic nature of the latter. Consequently, the pH of the microenvironment is critical in determining movement across the membrane [Wilson et al. 1989].

Received March 9, 1995; accepted in revised form October 24, 1995.

Correspondence to: Dr. Gilberto de Nucci, Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111, 13084-100 Campinas, SP, Brazil.

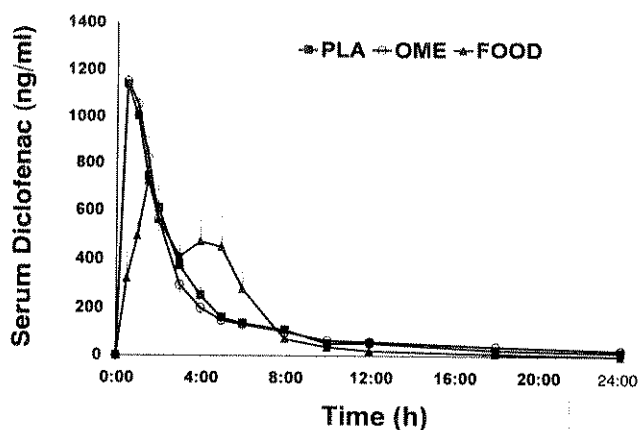


Fig. 1 Serum diclofenac concentration (mean $\pm$ SEM) versus time curves obtained in 13 healthy male volunteers following a single administration of 105 mg KDIC (7 ml of Flogon suspension) after placebo (PLA), gastric acid secretion blockade (OME) and food intake (FOOD)

Results

Diclofenac and omeprazole were well-tolerated at the administered doses and no adverse effects were reported. After omeprazole treatment, the gastric juice pH was significantly increased from 1.67 ± 0.11 (PLA phase) to 6.90 ± 0.13 ($p < 0.01$, $n = 13$; Student's paired *t*-test).

Figure 1 shows the mean serum diclofenac concentration vs time curves for the PLA, OME and FOOD phases. The major mean pharmacokinetic parameters derived from the serum diclofenac concentration vs time curves are presented in Table 1.

Parametric and non-parametric analysis of individual $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} percentual ratios and t_{max} differences between OME and PLA phases did not show any statistically significant differences, as shown by their inclusion in the 80 – 125% interval (Table 2). However, the diclofenac clearance index $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$, as well as K_e and $t_{1/2}$ were altered by the subacute treatment with omeprazole (Table 2a).

FOOD treatment altered the diclofenac pharmacokinetics, as shown by the non-inclusion of the individual $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} , $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$, K_e and $t_{1/2}$ percentual ratios from the 80 – 125% interval, and the individual t_{max} differences (Table 2b).

Discussion

Omeprazole, like diclofenac, is biotransformed in the organism [Stierlin et al. 1979, Gugler and Jensen 1985]. Apart from its inhibitory activity on proton-pump and gastric acid secretion [Lampkin et al. 1990, Scheiman et al.

Table 1 Mean KDIC pharmacokinetic parameters obtained in 13 healthy male volunteers after the ingestion of 105 mg KDIC (7 ml of Flogon suspension) under different conditions. PLA, placebo; OME, omeprazole; FOOD, food intake; CI, confidence interval

Parameter	PLA	OME	FOOD
$AUC_{[0-24]}$ (ng h ml ⁻¹)			
Geom. mean	3,459	3,564	3,114
90% CI	2,987 – 4,005	3,186 – 3,986	2,617–3,706
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng h ml ⁻¹)			
Geom. mean	3,502	3,644	3,114
90% CI	3,007 – 4,078	3,246 – 4,092	2,617–3,707
$AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$			
Geom. mean	1,897	1,643	2,023
90% CI	1,578 – 2,282	1,331 – 2,029	1,528 – 2,678
C_{max} (ng/ml)			
Geom. mean	1,330	1,276	1,052
90% CI	1,084 – 1,631	1,136 – 1,435	827–1,338
K_e (h ⁻¹)			
Geom. mean	0.37	0.32	0.45
90% CI	0.29 – 0.47	0.26 – 0.39	0.37 – 0.55
$t_{1/2}$ (h)			
Geom. mean	1.95	2.21	1.54
90% CI	1.55 – 2.47	1.80 – 2.71	1.26 – 1.88
t_{max} (h)			
Median	0.5	0.5	3.0
Range	0.5 – 4.0	0.5 – 1.0	0.5 – 5.0

1994], omeprazole may also alter drug pharmacokinetics since it inhibits hepatic microsomal enzyme activity [Rogerson et al. 1977]. Omeprazole prevents the metabolism of diazepam and phenytoin by inhibiting this enzyme system [Gugler and Jensen 1985] and this effect could account for the decrease observed in diclofenac clearance, and the consequent increase in $t_{1/2}$ (Table 2a).

Another mechanism by which omeprazole affects drug pharmacokinetics is by altering drug absorption. For instance, omeprazole increases the absorption of bismuth from tripotassium dicitrate bismuthate [Treiber et al. 1994]. Diclofenac is a weak acid ($pK_a = 4.0$) and very liposoluble (partition coefficient n-octanol/buffer, pH 7.4 = 13.4), and could be well absorbed in the low pH of the stomach. Although omeprazole significantly increased the gastric pH (from 1.67 to 6.90), it did not affect the diclofenac $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} and t_{max} , indicating that gastric pH does not alter diclofenac absorption.

The administration of the KDIC suspension in the presence of food delayed the rate of diclofenac absorption (as shown by the greater t_{max} values). Thus, KDIC should not be administered with food when rapid analgesia is desired. Food administration also reduced the absorption of diclofenac (as shown by the lower C_{max} and $AUC_{[0-\infty]}$ values) and changed the absorption pattern. However, because of the wide therapeutic range for diclofenac, the latter finding probably has little or no clinical relevance. Al-

Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers

G.B.B. MENDES¹, L.M. FRANCO¹, R.A. MORENO¹, A.G. FERNANDES², M.N. MUSCARA¹ and G. DE NUCCI¹

¹Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP and

²Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract. The bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac (Flogan, Merck and Cataflam, Ciba-Geigy) were compared in eighteen healthy male volunteers who received a single dose of 7 ml of each suspension (equivalent to 105 mg of potassium diclofenac) in an open randomized two period crossover design, with a fourteen-day washout period between doses. Serum samples were obtained over a 24 hour interval and diclofenac concentrations were determined by HPLC with ultraviolet detection. From the serum diclofenac concentration vs time curves, $AUC_{[0-24]}$ (area under the concentration vs time curves from 0–24 h), C_{max} (maximum achieved concentration), T_{max} (time to achieve C_{max}) and K_e (terminal first order elimination constant) were obtained. Overlapping of T_{max} intervals for both formulations was observed, but the important inter-subject variation observed in C_{max} ratios did not allow equivalence conclusion for the rate of absorption. Equivalence in the extent of bioavailability between both potassium diclofenac suspension brands was concluded from the analysis of $AUC_{[0-24]}$ ratios.

Key words: potassium diclofenac suspension – human volunteer pharmacokinetics – bioavailability – high-performance liquid chromatography

Introduction

Diclofenac, ([2-(2,6-dichloroanilino) phenyl] acetic acid), is a potent non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), widely used for its analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities. Its main therapeutic uses include long-term symptomatic treatment of rheumatoid arthritis [Zuckner 1986], osteoarthritis [Altman 1986], ankylosing spondylitis [Calabro 1986], and short-term treatment of acute conditions like musculoskeletal injury, postoperative pain, renal colic, biliary colic, dysmenorrhea and oral surgery [Kantor 1986].

Diclofenac is a weak acid with pK_a of 4.0, has a partition coefficient of 13.4 (n-octanol/buffer pH 7.4) and the structural elements include a phenyl acetic acid group, a secondary amino group and a phenyl ring containing 2 chlorine atoms [Sallmann 1986].

Although the drug is completely absorbed after oral administration [Todd and Sorkin 1988], almost 50% of the

administered dose does not reach the systemic circulation due to first pass hepatic metabolism [Todd and Sorkin 1988]. The drug is highly bound to serum proteins (99.7%), mostly to albumin [Riess et al. 1978] and is eliminated mainly by hepatic metabolism followed by urinary and biliary excretion of glucuronide and sulphate conjugates, with an elimination half-life of 2 hours [Willis et al. 1979]. The main metabolite is a 4'-hydroxy derivative, 30 times less active than the parent compound [Menassé et al. 1978]. An extensive clinical experience with the drug has been accumulating over the last twenty years, employing mostly the conventional oral formulation of enteric-coated tablets of the sodium salt of diclofenac (Voltaren). Following oral administration of this formulation in fasting subjects, peak plasma concentrations are obtained after 1.5–2.5 hours [Todd and Sorkin 1988]. Food may delay absorption by increasing the time to reach the site of dissolution in the small intestine [Todd and Sorkin 1988].

In order to ensure faster onset of absorption and consequently faster analgesic effect, the potassium salt of diclofenac was formulated as sugar-coated tablets [Verstraeten and Bakshi 1991, Novoa-Heckel 1984] and as suspension for oral administration. These new diclofenac potassium formulations have been marketed mainly in

Received Oktober 18, 1993

Reprint requests to Dr. G. de Nucci, Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, Unicamp, PO Box 6111, BR-13084-100 Campinas, SP, Brazil.

Material

Diclofenac (sodium salt) and indomethacin (internal standard) for HPLC analysis were supplied by Sigma Chemical Co (St Louis, USA). Analytical grade acetic acid, ammonium acetate, dichloromethane, sodium hydroxide, phosphoric acid and HPLC grade acetonitrile were purchased from Merck (RJ, Brazil). Non-commercial test diclofenac potassium suspension formulation (Flogon Suspensão, 13° pilot lot, of. 33321; FLO) was supplied by Merck S.A. Indústrias Químicas (RJ, Brazil), and the reference formulation (Cataflam Suspensão, lot No. 523902; CAT) is the commercial diclofenac potassium suspension marketed by Ciba-Geigy (SP, Brazil).

Results

Figure 1 shows that under the described chromatographic conditions, the retention times for diclofenac and internal standard were 7.0 ± 0.3 minutes and 9.4 ± 0.3 minutes, respectively. As also shown in Figure 1, no endogenous interfering peaks appeared at the retention times of the compounds of interest. The detection limit for diclofenac was set at a concentration of 10 ng/ml (signal/noise ratio = 3). The calibration curve was linear over the range 10 ng/ml to 2,000 ng/ml, with a regression coefficient ≥ 0.999 and intercept not significantly different from zero. Inter-assay variation values (as % CV) were 21.2, 12.5, 12.5, 7.7 and 7.6% for diclofenac concentrations of 66, 117, 218, 581 and 1,142 ng/ml, respectively ($n = 12$ for each concentration). The obtained intra-assay variation values were 8.2, 3.8, 3.9, 2.0 and 1.9% for diclofenac concentrations of 56, 102, 209, 506 and 1,033 ng/ml, respectively ($n = 6$ for each concentration).

Diclofenac was well tolerated at the administered dose, and no adverse effects were reported. Figure 2 shows mean diclofenac serum concentrations as a function of time after the oral administration of 105 mg potassium diclofenac of both suspensions. The major mean pharmacokinetic parameters derived from the serum concentration vs time curves are presented in Table 1. Arithmetic and geometric means ratios for $AUC_{[0-24]}$ and C_{max} of the two diclofenac potassium oral formulations are shown in Table 2, as well as the analysis of their inclusion into the interval 80–120% by different tests.

Conclusion

The HPLC method employed here, similar to that of Santos et al. [1992], introduced an additional washing with ammonium acetate after the extraction procedure with organic solvent in acid medium. This step improved the chromatograms by eliminating peaks which eluted at reten-

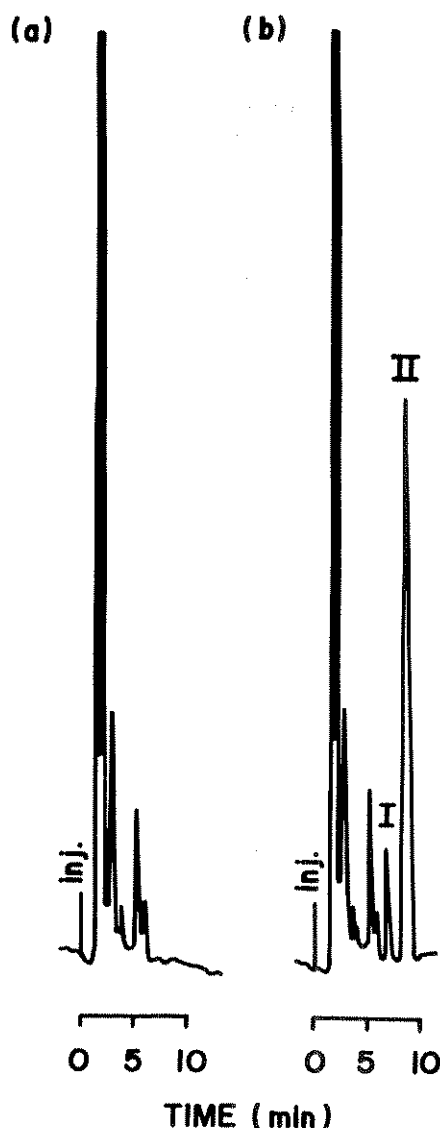


Fig. 1 HPLC chromatograms, (a): blank plasma showing the absence of peaks at the retention times of the compounds of interest; (b): plasma sample withdrawn four hours after the administration of 105 mg of potassium diclofenac. Diclofenac concentration measured in this sample was 197 ng/ml. Peak I: diclofenac; peak II: indomethacin (internal standard).

tion times very close to that of diclofenac. No loss of sensitivity was observed after the inclusion of this step, as at the neutral pH of the ammonium acetate solution re-extraction of diclofenac to the aqueous phase is avoided. This affirmation was confirmed when an aliquot of the washing ammonium acetate solution was injected into the chromatograph and no peak appeared at the retention time of diclofenac (not shown).

The present study shows that the two brands of oral suspension of potassium diclofenac are equivalent for the

- Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R, Jaques R 1978 Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol* 22 (Suppl): 5-16
- Morán M 1990 An observer blind comparison of diclofenac potassium, piroxicam and placebo in the treatment of ankle sprains. *Curr Med Res Opin* 12: 268-274
- Novoa-Heckel G 1984 Agentes analgésicos: antiinflamatorios no esteroideos. Un nuevo recurso- diclofenac potásico. *Compend Invest Clin Latinoam* 4: 24-27
- Riess W, Stierlin H, Degen P 1978 Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. *Scand J Rheumatol* 22 (Suppl): 17-29
- Sallmann AR 1986 The history of diclofenac. *Am J Med* 8 (Suppl 4B): 29-33
- Santos SRCJ, Donzella H, Bertoline MA, Pereira MD, Omosako CE, Porta V 1992 Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. *Braz J Med Biol Res* 25: 125-128
- Todd PA, Sorkin EM 1988 Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 35: 244-285
- Verstraeten A, Bakshi R 1991 Diclofenac potassium for the treatment of traumatic joint distortion: an open multicentre study. *J Int Med Res* 19: 165-170
- Willis JV, Kendall MJ, Flinn RM 1979 The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 16: 405-410
- Zuckner J 1986 International experience of diclofenac in rheumatoid arthritis. *Am J Med* 80 (Suppl 4B): 39-42