

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS | UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**MONITORIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE  
EFAVIRENZ: CRITÉRIOS DE APLICABILIDADE À PRÁTICA  
CLÍNICA E EFEITOS DO FÁRMACO A LONGO TERMO**

*Sofia de Azeredo Pereira*

2009

# **MONITORIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE EFAVIRENZ: CRITÉRIOS DE APLICABILIDADE À PRÁTICA CLÍNICA E EFEITOS DO FÁRMACO A LONGO TERMO**

Prova para obtenção de grau de Doutor em Ciências da Vida, especialidade de Farmacologia orientada pela Sra. Professora Doutora Emília Monteiro na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

# Agradecimentos

À Directora do Departamento de Farmacologia, Sra. Professora Doutora Emília Monteiro, expresso um profundo agradecimento pela oportunidade concedida ao poder integrar a equipa de investigação do departamento de Farmacologia e toda a compreensão e confiança que me tem depositado ao longo destes anos. Orgulho-me em especial pela Amizade que me tem dedicado e agradeço por tantos conselhos, retoma de rotas perdidas e abertura de muitas portas. O meu muito obrigado revela-se muito limitado para agradecer toda a orientação, crescimento profissional e pessoal, transmissão de saber, apoio e estímulo que me tem dedicado.

Às Sras. Mestres Umbelina Caixas, Teresa Branco, Isabel Germano e Fátima Lampreia por acreditarem no trabalho e pela sua disponibilidade total para a sua concretização. Tem sido para mim, simultaneamente um enriquecimento e um privilégio trabalhar com esta equipe, composta por elementos de formação académica diferente da minha, mas com partilha dos mesmos critérios de rigor, honestidade e humildade.

À Sra. Dra. Joana Batuca e Sra. Dra. Marta Amaral ficam as merecidas palavras de reconhecimento pela colaboração na execução de algumas experiências e ao Senhor Professor Doutor José Alves pela disponibilidade total em facultar a discussão oportuna e pertinente.

À Sra. Professora Doutora Sílvia Conde, pelo exemplo de perseverança, auto-confiança e capacidade de trabalho pelo crescimento do laboratório de Farmacologia, pelo qual nutrimos tanto orgulho, pelas longas horas de discussão e horas extra no laboratório, por estar sempre presente e pela consolidação de uma grande Amizade. A ela e à Sra. Dra. Joana Batuca, minhas colegas e grandes Amigas, pela partilha do entusiasmo, objectivos, de uma crença de crescimento, "amor à camisola" e muitas "conversas de miúdas"!

À Sra. Dra. Teresa Lopes uma palavra de reconhecimento pelo apoio e Amizade tão oportunamente demonstrados, salientado eficiência e disponibilidade sempre presentes e por partilhar a sua constante boa disposição.

À Sra. D. Silvina Lopes, Sra. D. Eunice Silva e mais recentemente à Dra Inês Faustino agradeço a diária preparação do laboratório, manutenção do material de apoio às experiências e auxílio na preparação de amostras.

À Sra. Professora Ana Luísa Papoila apresento o meu reconhecimento por toda a transmissão de saber na análise estatística dos resultados.

Uma palavra de apreço aos restantes membros do departamento de Farmacologia pelo ambiente de trabalho que me têm proporcionado e serviu de estímulo para a concretização do trabalho.

O meu reconhecimento dirige-se também aos que detendo a responsabilidade institucional na Faculdade de Ciências Médicas, UNL, me concederam o seu voto de confiança e me proporcionaram esta oportunidade única.

Finalmente, aos meus pais Maria Odete e Albertino, à minha querida irmã Rita e ao Michael. Aos meus pais e a minha irmã pela disponibilidade total, pela oportunidade e apoio incondicionais e porque em qualquer situação sempre sinto o quanto gostam de mim. Ao meu pai por toda a atenção dedicada e por tudo o que aprendeu sob VIH/SIDA nestes últimos anos, sempre atento às novidades, garantindo que me chegaria toda a informação disponível nos meios de comunicação social sob o tema. Pelos valores humildade, honestidade, dedicação e persistência "...porque desistir não é uma opção!". À minha mãe pela sua atitude na vida, a sua força e optimismo que me servem de exemplo a cada dia da minha vida. Pelas longas horas de conselhos e incentivos. Ao Michael, em especial nesta última fase, na permanente luta por me agarrar ao planeta Terra. Pela compreensão das ausências e do coeficiente de partilha vida/trabalho, por toda a paciência com horários, fins-de-semana e muitos dias de mau humor. A minha enorme gratidão pelo Amor e Harmonia que me rodeiam, que me permitem a estabilidade necessária à concretização de mais um sonho!

Aos meus tios Isabel e António Domingos pelos quais fui adoptada! Aos meus amigos, que felizmente são muitos para mencionar, mas com um carinho especial ao Frederico, Paula, ao Ricardo... e a todos os que, "involuntariamente", ficaram a saber a importância de monitorizar as concentrações plasmáticas do efavirenz... e que me fazem sentir útil, mesmo que se apesar de tanta vontade, não consegui fazer melhor... MUITO OBRIGADA!

## **Instituições onde o trabalho foi realizado**

A inclusão dos doentes participantes nos diferentes estudos foi realizada pelas Sras. Mestres Maria Teresa Branco, Umbelina Caixas, Isabel Germano e Fátima Lampreia e efectuada nas consultas de Imunodeficiência do Hospital Fernando da Fonseca e Centro Hospitalar de Lisboa – Central após a aprovação do estudo pela Comissão de Ética Local.

O desenho dos estudos, quantificação das concentrações plasmáticas, análise e tratamento dos dados foi efectuado no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas.

## **Financiamento do trabalho**

Entidades que contribuíram para o financiamento deste projecto:

- Fundação para Ciência e Tecnologia (POCTI/FCB/42664/2001)
- Comissão Nacional de Luta Contra a Sida (protocolo CNLCS/FCM 2002)
- Faculdade de Ciências Médicas

As amostras de efavirenz puro foram cedidas gratuitamente pela Merck Sharp & Dohme.

## Artigos científicos com origem na tese de dissertação

O trabalho descrito na tese deu origem aos artigos científicos seguintes:

Pereira SA, Batuca JR, Caixas U, Branco T, Delgado-Alves J, Germano I, Lampreia F, Monteiro EC. Effect of efavirenz on high-density lipoprotein antioxidant properties in HIV-infected patients. *Br J Clin Pharmacol*. (In press).

Pereira SA, Caixas U, Branco T, Germano I, Lampreia F, Papoila AL, Monteiro EC. Efavirenz Concentrations in HIV-Infected patients with and without viral hepatitis. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66: 551-5 (Factor de impacto: 3,128).

Pereira SA, Branco T, Caixas U, Côrte-Real RM, Germano I, Lampreia F, Monteiro EC. Intra-individual variability in efavirenz plasma concentrations supports therapeutic drug monitoring based on quarterly sampling in the first year of therapy. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2008; 30: 60-66 (Factor de impacto: 2,41).

Pereira SA, Branco T, Côrte-Real RM, Germano I, Lampreia F, Caixas U, Monteiro EC. Long-term and concentration-dependent beneficial effect of efavirenz on HDL-cholesterol in HIV-infected patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2006; 61: 601-604. (Factor de impacto: 3,128).

Os artigos indicados foram citados (excluindo auto-citações) nas revistas: *The Lancet Infectious Diseases* (2007), *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* (2007), *Current Opinion in HIV & AIDS* (2008), *AIDS PATIENT CARE and STDs* (2009), *Antiviral Therapy* (2009) e *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (2009).

## Contextualização histórica

Há mais de duas décadas, foram descritos, no *Morbidity and Mortality Weekly Report* (Gottlieb e col, 1981), casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* em cinco jovens adultos do sexo masculino que tinham em comum o facto de serem homossexuais e de apresentarem um quadro de imunodeficiência celular. Por de trás do título *Pneumocystis pneumonia – Los Angeles*, nem o leitor mais pessimista teria antecipado a comunicação à comunidade científica de uma das mais mortais doenças infecciosas da História: a síndrome da imunodeficiência adquirida. Se a identificação dos primeiros casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) conta mais de 25 anos, a cura para esta infecção é ainda hoje desconhecida.

Nos primeiros anos a epidemia foi considerada uma doença aguda, com implicações arrasadoras na esperança média de vida dos indivíduos, mas a introdução da terapêutica anti-retroviral de elevada eficácia em 1996, mais recentemente referida como terapêutica anti-retroviral combinada, permitiu a esta doença um curso crónico, a diminuição da mortalidade e morbilidade e um acréscimo da qualidade de vida destes indivíduos (Palella e col, 1998).

A introdução da terapêutica anti-retroviral combinada aliada à maior compreensão da dinâmica e patologia da infecção motivaram estudos que vieram revolucionar o seu curso. Após o tratamento de 20 indivíduos infectados foi observado um decréscimo acentuado dos níveis plasmáticos de ácido ribonucleico viral (carga viral), reflectindo uma interrupção abrupta do elevado grau de replicação do VIH e um aumento do número de linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> plasmáticos, o que revelou a capacidade regenerativa desta população de células (Ho, 1996). Estas observações causaram grande impacto no tratamento destes indivíduos: a contagem de linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> (marcador imunológico) e a carga viral (marcador virulógico) são informações fundamentais para decisões relativas ao início ou alteração do tratamento.

Ao realizarmos uma revisão dos trabalhos publicados em 1996 e 1997, onde o optimismo com a preconização da terapêutica anti-retroviral combinada é notório, facilmente se avalia que este optimismo esmoreceu com o aparecimento de novos problemas condicionados pelo próprio tratamento (Hirschel e Francioli, 1998). Entre eles, a necessidade de manter uma adesão absoluta e continuada a uma terapêutica por vezes complicada na sua posologia; o aparecimento de efeitos secundários a curto e a longo prazo; o tratamento de indivíduos com tuberculose ou co-infecções, *eg.* pelo vírus da hepatite B e/ou C; e as inúmeras interacções medicamentosas possíveis. O frequente aparecimento de fenótipos virais resistentes aos fármacos e de novas infecções por estirpes já seleccionadas com resistências implicava elevada frequência de insucesso terapêutico. A necessidade de novas moléculas e ferramentas para o combate à infecção era premente.

A resposta óptima ao tratamento da infecção pelo VIH representa um grande desafio do ponto de vista Clínico e Farmacológico. A presente panóplia de opções terapêuticas não é suficiente, dada a natureza da terapêutica anti-retroviral, que requer tratamento crónico com vários fármacos e cuja eficácia pode estar comprometida pelo desenvolvimento de resistências e pela toxicidade. Dadas as consequências de uma terapêutica sub-óptima no desenvolvimento de resistências, todas as ferramentas com potencial para decretar o seu sucesso devem ser exploradas. A melhor maneira de lidar com as resistências: é evitá-las!

Com o conhecimento de que a dose *standard* de um fármaco pode não ser apropriada para todos os indivíduos, a quantificação da exposição aos anti-retrovirais necessária para promover uma supressão viral mantida, tornou-se uma área de investigação de particular interesse. No virar do século, com o crescente número de novas moléculas disponíveis, a comunidade científica identificou uma nova ferramenta para minimizar resistências e efeitos secundários: a aplicação da monitorização terapêutica (TDM – *Therapeutic Drug Monitoring*) aos anti-retrovirais (Back e col, 2001; Khoo e col, 2001; Telenti, 2002).

Em 2007, indicava-se a existência de aproximadamente 33 milhões de indivíduos infectados pelo VIH a nível mundial (*UNAIDS/WHO AIDS epidemic report: 2008*; disponível em [www.unaids.org](http://www.unaids.org)) e de 3 milhões de novas infecções por ano. Em Portugal, nos últimos anos, o número total de casos de infectados pelo VIH tem aumentado: de 23 374 casos notificados em 2003 para 34 888 casos notificados até 31 de Dezembro de 2008 (Relatórios anuais da Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA; disponível em [www.sida.pt](http://www.sida.pt)).

O sucesso da terapêutica anti-retroviral passa pela investigação e pela abordagem multidisciplinar desta doença. Neste trabalho, cabe à Farmacologia Clínica debruçar-se sobre os aspectos farmacocinéticos dos anti-retrovirais e, concretamente, avaliar o interesse da TDM destes fármacos na optimização desta terapêutica (Back e Khoo, 2003).

O objectivo geral deste trabalho foi contribuir para otimizar a terapêutica anti-retroviral e o seu impacto na qualidade de vida do indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana. Pretendia-se definir se o análogo não-nucleósido inibidor da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana, efavirenz, cumpria os requisitos para ser monitorizado na prática clínica, estabelecer as condições para a sua eventual monitorização e, simultaneamente, investigar outras acções farmacodinâmicas do efavirenz em terapêuticas prolongadas.

Os critérios que fundamentam a indicação da monitorização das concentrações plasmáticas de fármacos, em geral, incluem: correlação entre a concentração do fármaco e a eficácia/toxicidade; variabilidade inter-individual elevada; variabilidade intra-individual e janela terapêutica reduzidas e ainda a elevada probabilidade de interacções medicamentosas. A correlação entre concentração plasmática de efavirenz e eficácia/toxicidade era conhecida e o facto de o efavirenz ser substrato, indutor e inibidor do sistema enzimático citocromo P450 e ser utilizado em terapêuticas crónicas e nunca em monoterapia, constituíam fortes argumentos para a aplicação da monitorização terapêutica ao efavirenz. O presente trabalho contribuiu para o conhecimento de outros critérios, nomeadamente, a variabilidade nas concentrações plasmáticas deste fármaco, entre indivíduos e no mesmo indivíduo, e permitiu definir diferentes aspectos para a prática da monitorização terapêutica deste fármaco, entre eles, o volume de plasma necessário, o parâmetro farmacocinético a avaliar e a periodicidade das quantificações. Para se atingirem os objectivos definidos foi necessário, em primeiro lugar, proceder à instalação e validação de um método de quantificação de concentrações de efavirenz, em plasma de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana: ficou disponível no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, um método que permite a monitorização das concentrações plasmáticas de nove fármacos anti-retrovirais (nevirapina, indinavir, amprenavir, atazanavir, ritonavir, efavirenz, lopinavir, saquinavir e nelfinavir). O método desenvolvido está presentemente a ser utilizado na monitorização terapêutica destes fármacos e em estudos Farmacológicos. Esta quantificação é realizada numa única corrida analítica de cromatografia líquida de elevada eficiência, a partir de 0,4 mL de plasma de cada indivíduo e a sua qualidade é avaliada, bianualmente, por uma entidade externa. Posteriormente, com o objectivo de as comparar, procurou-se conhecer a variabilidade entre indivíduos e intra-individual das concentrações plasmáticas do fármaco e

concluiu-se que a variabilidade entre indivíduos é superior à intra-individual, o que suporta a monitorização das suas concentrações. Uma vez encontrada uma variabilidade inter-individual elevada, surgiu um outro objectivo específico, que consistiu na identificação de possíveis factores a justificassem. Na presente dissertação foi mostrado que o sexo, idade, peso e etnia não justificam por si só esta variação, não sendo possível o ajuste de dose com base nestas variáveis. Esta conclusão constitui um factor adicional que reforça que a toma da dose recomendada de efavirenz poderá não ser apropriada para todos os indivíduos.

A co-infecção pelos vírus da hepatite B e/ou C é comum nesta população e poderia ser um dos factores implicados nesta variabilidade farmacocinética. A realização do presente trabalho permitiu sugerir que a presença desta co-infecção *per se* não contribui para o aumento das concentrações plasmáticas do fármaco; que, em indivíduos co-infectados com função hepática normal, não há um risco acrescido de toxicidade dependente da concentração e que as indicações para a monitorização terapêutica de efavirenz em indivíduos co-infectados, com função hepática normal, são semelhantes aquelas descritas para indivíduos mono-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana.

Um outro objectivo específico deste trabalho surgiu quando foi descrito que os efeitos dos análogos não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa no perfil de lípidos e lipoproteínas dos indivíduos pareciam diferir dos efeitos descritos para os inibidores de protease, que eram frequentemente associados a deslipidémia. Os análogos não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa tinham sido associados a aumentos nos níveis de colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade. Esta observação, além de não ser consensual, podia ser imputada ao decréscimo na carga viral dos indivíduos em terapêutica e correspondia a estudos observacionais de curta-duração. Estes factos estimularam a realização de uma análise prospectiva dos valores de concentração de lípidos e lipoproteínas em doentes medicados com efavirenz e à avaliação da sua eventual relação com a concentração deste anti-retroviral, a curto e a longo-termo. Pela primeira vez, foi demonstrado que o efeito do efavirenz no colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade permaneceu durante 36 meses, que o aumento é dependente do valor basal destas lipoproteínas e da concentração plasmática do fármaco. Mostrou-se também que, em associação a este aumento quantitativo, o efavirenz estava associado a um aumento qualitativo, com uma melhoria da função antioxidante destas lipoproteínas, avaliada pela actividade do enzima paraoxonase-1.

Em resumo, os diferentes estudos incluídos na presente dissertação têm como conclusão geral que é possível otimizar a resposta à terapêutica com efavirenz através da monitorização das suas concentrações plasmáticas. A realização deste trabalho contribuiu para o conhecimento científico através:

1. Da instalação e validação de um método de quantificação de concentrações de análogos não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa e inibidores da protease em plasma de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana.
2. Do estudo da variabilidade inter e intra-individual nas concentrações plasmáticas de efavirenz. A superioridade da variabilidade inter-individual relativamente à associada ao mesmo indivíduo comprova a importância de monitorizar as concentrações plasmáticas deste fármaco.
3. Da definição de procedimentos operativos para a monitorização terapêutica do efavirenz em geral e numa população particular: os indivíduos co-infectados pelos vírus da hepatite B e/ou C com função hepática normal.
4. Da descoberta de acções farmacodinâmicas do efavirenz, a longo prazo, nomeadamente o efeito benéfico (quantitativo e qualitativo) no colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade. Este efeito é mantido durante três anos e é dependente da concentração plasmática do fármaco, o que salienta a importância de monitorizar as suas concentrações.

The main goal of the present work was to contribute towards the optimization of antiretroviral therapy and its impact in the quality of life of the individuals infected by human immunodeficiency virus. The present work aimed at defining if therapeutic drug monitoring could be considered for the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, efavirenz, establishing the conditions for its practical implementation as well as ascertaining other long-term pharmacodynamic properties of efavirenz.

The rationale for therapeutic drug monitoring to be considered includes: drug concentration - efficacy/toxicity relationship; high inter-patient variability; low intra-individual variability; narrow therapeutic window and also a high potential of drug-interactions. The correlation between efavirenz plasma concentrations and efficacy/toxicity has been recognized. Furthermore, the role of efavirenz as a substrate, inhibitor and inducer of cytochrome P450 enzymatic system and the fact that it is used chronically and never used in monotherapy, strongly supports the need for its therapeutic drug monitoring. The main contributions of the present work were the establishing of intra- and inter-individual variability of the plasma concentrations of this drug which has enabled the definition of several practical issues of therapeutic drug monitoring, chiefly the necessary plasma volume, the pharmacokinetic parameter to be measured and the necessary timeframe of the efavirenz concentration quantification. In order to achieve the goals set for this work, a method for the quantification of efavirenz plasma concentrations had to be developed and validated. As a result of this, the laboratory of Pharmacology of the Faculty of Medical Sciences has a method for the quantification of the concentration of nine antiretrovirals (nevirapine, indinavir, amprenavir, atazanavir, ritonavir, efavirenz, lopinavir, saquinavir and nelfinavir). This method is now successfully applied for routine therapeutic drug monitoring and pharmacological studies in human immunodeficiency virus infected patients. This quantification, done in the same run of high performance liquid chromatography, using 0.4 mL of plasma, is biannually quality controlled by an external validation program. Secondly, the intra-individual and inter-individual variability in efavirenz plasma concentrations were investigated. It was concluded that the variability between individuals highly exceeds the intra-individual variability, thus supporting the application of therapeutic drug monitoring. Upon coming across this high inter-individual variability in efavirenz concentrations, the identification of possible factors underlying it

became a further aim. It has been shown that gender, age, weight and ethnicity do not justify this variation per se. Hence, the recommended dose does not fit all. Moreover, dose adjustments based on these factors are not appropriate.

The co-infection by hepatitis B and C viruses is common in these individuals and could be one of the factors implied in the pharmacokinetic variability of this drug. In the present work it was suggested that, in human immunodeficiency virus infected individuals, this co-infection has not been implicated in higher efavirenz concentrations. Moreover, the risk of efavirenz concentration-dependent toxicity is not increased in co-infected patients with normal hepatic function. Thus, therapeutic drug monitoring indications for these co-infected patients and in human immunodeficiency virus mono-infected patients are the same.

Whereas many of the protease inhibitor-based regimens are often associated with dyslipidemia, the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens differ importantly, as they have been associated with increases in high-density lipoprotein cholesterol. However, this is not consensual and could be associated to a decrease in the viral load in patients under treatment and has been supported by short-term studies. Thus, a prospective analysis of lipid and lipoprotein value on patients on efavirenz has been conducted over a long-term follow-up period and its eventual relationship with this drug plasma concentration was investigated. This was considered to be another of the specific aims of the present work. For the first time it had been shown that the effect of efavirenz on high-density lipoprotein cholesterol is maintained over a 36 months period. Nevertheless, this increase is dependent on the baseline value of this lipoprotein. Moreover, in association with a higher quantity of high-density lipoprotein cholesterol, a higher quality of these lipoproteins was also observed in those patients on efavirenz, with a better antioxidant function evaluated by the enzymatic activity of the paraoxonase-1.

To sum up, the foremost conclusion of the present thesis is that it supports the use of therapeutic drug monitoring of efavirenz as a tool to optimize therapeutic response. This work has contributed to scientific knowledge by:

1. Developing and optimizing a method suitable for the quantification of non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitors in the plasma of individuals infected by human immunodeficiency virus.
2. Studying inter and intra-individual variability in efavirenz plasma concentrations. The higher variability between patients comparatively to the variability in the same individual supports the utility of the therapeutic drug monitoring of efavirenz.

3. Defining standard procedures to perform the therapeutic drug monitoring of efavirenz in general and in a particular population: the individuals co-infected by hepatitis virus type B and/or C.
4. Finding long-term effects of efavirenz, namely its positive (quantitative and qualitative) role on high density lipoproteins. This effect is sustained for 3 years and drug-concentration dependent, foremost supporting the therapeutic drug monitoring of efavirenz.

## Conteúdos

<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>Introdução geral</b>	<b>3</b>
Os fármacos anti-retrovirais e o ciclo de replicação viral	3
A terapêutica anti-retroviral	4
A monitorização terapêutica de fármacos anti-retrovirais	6
Ciclo geral do medicamento e factores implicados na variabilidade farmacocinética	7
Curvas concentração vs. tempo – parâmetros farmacocinéticos	12
Características farmacológicas do efavirenz	14
CrITÉrios para a monitorização terapêutica de fármacos e aplicabilidade ao efavirenz	17
Limitações da aplicabilidade da monitorização terapêutica de fármacos	24
Potenciais cenários da aplicabilidade da monitorização terapêutica ao efavirenz	27
<hr/>	
<b>Objectivos</b>	<b>29</b>
Objectivos geral	29
Objectivos específicos	29
<hr/>	
<b>Capítulo 1</b>	<b>30</b>
<b>Desenvolvimento, optimização e validação de métodos para a quantificação de fármacos anti-retrovirais</b>	
1.1 Introdução	30
1.2 Enquadramento e Objectivos	31
1.3 Métodos e Resultados	31
1.4. Discussão	35
1.5. Conclusão	38
<hr/>	
<b>Capítulo 2</b>	<b>39</b>
<b>Estudo da variabilidade inter-individual das concentrações plasmáticas de efavirenz</b>	
2.1 Introdução	39
2.2 Enquadramento e Objectivos	39
2.3 Métodos	40
2.4 Resultados	40
2.5 Discussão	48
2.6 Conclusão	54
<hr/>	
<b>Capítulo 3</b>	<b>55</b>
<b>Estudo da variabilidade intra-individual das concentrações plasmáticas de efavirenz</b>	
3.1 Introdução	55
3.2 Enquadramento e Objectivos	55

3.3 Métodos	56
3.4 Resultados	57
3.5 Discussão	60
3.6 Conclusão	64
<b>Capítulo 4</b>	<b>65</b>
<b>Concentrações de efavirenz em indivíduos co-infectados pelos VHB/C sem alteração da função hepática</b>	
4.1 Introdução	65
4.2 Enquadramento e Objectivos	67
4.3 Métodos	67
4.4 Resultados	68
4.5 Discussão	71
4.6 Conclusão	73
<b>Capítulo 5</b>	<b>74</b>
<b>Estudo da alteração dos níveis de HDL-c ao longo de 36 meses em doentes medicados com efavirenz</b>	
5.1 Introdução	74
5.2. Enquadramento e Objectivos	77
5.3 Métodos	78
5.4 Resultados	78
5.5 Discussão	85
5.6 Conclusão	91
<b>Capítulo 6</b>	<b>92</b>
<b>Actividade PON-1 em indivíduos medicados com efavirenz</b>	
6.1 Introdução	92
6.2 Enquadramento e Objectivos	93
6.3 Métodos	93
6.4 Resultados	95
6.5 Discussão	97
6.6 Conclusão	100
<b>Considerações finais</b>	<b>101</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>103</b>

## Figuras

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico do vírus da imunodeficiência humana e possíveis locais de acção para os fármacos anti-retrovirais.	3
<b>Figura 2</b>	Curvas concentração – resposta.	7

<b>Figura 3</b>	Conceito de janela terapêutica.	7
<b>Figura 4</b>	Esquema ilustrativo do percurso dos anti-retrovirais de administração oral no organismo e principais factores responsáveis pela variabilidade nas concentrações de fármaco disponíveis na célula alvo.	8
<b>Figura 5</b>	Representação gráfica da concentração plasmática de um fármaco ao longo do tempo e principais parâmetros farmacocinéticos.	12
<b>Figura 6</b>	Cromatograma-tipo obtido a partir de soluções padrão para a quantificação de anti-retrovirais.	33
<b>Figura 7</b>	Resultados anuais da avaliação externa da qualidade.	34
<b>Figura 8</b>	Variabilidade inter-individual das concentrações plasmáticas de efavirenz.	41
<b>Figura 9</b>	Concentrações plasmáticas de efavirenz quantificadas em amostras obtidas entre as 8 e 16 horas pós toma do fármaco.	42
<b>Figura 10</b>	Concentrações plasmáticas de efavirenz quantificadas em homens e mulheres.	42
<b>Figura 11</b>	Concentrações plasmáticas de efavirenz em amostras obtidas entre as 8 e 16 horas pós toma de efavirenz sem ou com ingestão de alimentos.	42
<b>Figura 12</b>	Concentrações plasmáticas de efavirenz quantificadas em indivíduos sem e com experiência anti-retroviral prévia.	43
<b>Figura 13</b>	Concentrações plasmáticas de efavirenz em amostras obtidas entre as 8 e 16 horas pós toma de efavirenz em indivíduos Caucasianos ou Negros.	43
<b>Figura 14</b>	Efeito da duração do tratamento com efavirenz nas concentrações do fármaco.	43
<b>Figura 15</b>	Efeito da idade dos indivíduos nas concentrações plasmáticas de efavirenz.	44
<b>Figura 16</b>	Efeito do peso dos indivíduos nas concentrações de efavirenz.	44
<b>Figura 17</b>	Variabilidade inter-individual nas concentrações de efavirenz – influência dos fármacos anti-retrovirais concomitantes.	46
<b>Figura 18</b>	Variabilidade inter-individual nas concentrações plasmáticas de efavirenz em homens Caucasianos com idade inferior ou superior ou igual a 40 anos.	47

<b>Figura 19</b>	Variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas de efavirenz.	59
<b>Figura 20</b>	Influência do índice de massa corporal na concentração plasmática de efavirenz.	60
<b>Figura 21</b>	Concentrações plasmáticas de efavirenz ao longo do tempo, em indivíduos mono-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana e em indivíduos co-infectados pelos vírus da hepatite B e/ou C.	70
<b>Figura 22</b>	Efeito da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana no transporte reverso de colesterol.	75
<b>Figura 23</b>	Frequência de indivíduos com valores recomendados, pelo NECP ( <i>National Cholesterol Education Program</i> , 2001), de colesterol, total e associado as lipoproteínas de baixa e elevada densidade, e de triglicéridos.	80
<b>Figura 24</b>	Variação nos valores de colesterol, total e associado às lipoproteínas de elevada e de baixa densidade, e os valores de triglicéridos ao longo do tempo de terapêutica anti-retroviral com efavirenz.	81
<b>Figura 25</b>	Efeito ao longo do tempo da terapêutica anti-retroviral com efavirenz no colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade médio e estratificado por valor basal.	81
<b>Figura 26</b>	Dependência do valor basal observada na variação dos valores de colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade aos 12 meses de terapêutica com efavirenz.	82
<b>Figura 27</b>	Correlação entre variação dos valores de lipoproteínas de elevada densidade (HDL-c) e do índice aterogénico colesterol total:HDL-c	83
<b>Figura 28</b>	Correlação entre as concentrações plasmáticas de efavirenz e as alterações nos valores de colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade.	84
<b>Figura 29</b>	Actividade paraoxonase-1 (PON-1) em indivíduos infectados pelo VIH.	95

<b>Tabela 1</b>	Resumo dos resultados obtidos em diferentes ensaios clínicos relativos à percentagem de indivíduos cujo primeiro esquema terapêutico incluiu Efavirenz (EFV) e que apresentaram carga viral < 50 cópias/mL num determinado período do tratamento.	15
<b>Tabela 2</b>	Resumo de estudos aleatorizados que visaram avaliar o benefício da monitorização terapêutica de fármacos anti-retrovirais que incluíram efavirenz	25
<b>Tabela 3</b>	Resumo das características das diferentes metodologias desenvolvidas para a quantificação das concentrações plasmáticas de fármacos anti-retrovirais.	32
<b>Tabela 4</b>	Combinações de anti-retrovirais que em adição ao efavirenz constituíram o esquema terapêutico anti-retroviral dos indivíduos incluídos.	44
<b>Tabela 5</b>	Comparação da frequência de concentrações tóxicas e sub-terapêuticas classificadas com base nos diferentes valores propostos na literatura para a concentração eficaz mínima e concentração tóxica mínima.	46
<b>Tabela 6</b>	Comparação da variabilidade inter-individual encontrada entre diferentes grupos de indivíduos e frequência de concentrações tóxicas e sub-terapêuticas de efavirenz.	48
<b>Tabela 7</b>	Características dos doentes e coeficientes de variação observados durante 3 anos no índice de massa corporal e tempo entre a toma de efavirenz e a colheita da amostra.	58
<b>Tabela 8</b>	Comparação entre os resultados obtidos em cada ano do estudo: concentração de efavirenz, variabilidade intra e inter-individual e percentagem de concentrações tóxicas e sub-terapêuticas.	59
<b>Tabela 9</b>	Resumo dos principais trabalhos publicados que descrevem concentrações e efavirenz na co-infecção e suas principais conclusões.	66
<b>Tabela 10</b>	Marcadores bioquímicos utilizados na avaliação da função hepática.	68
<b>Tabela 11</b>	Associação entre o aumento da razão AST:ALT e o progresso no desenvolvimento de insuficiência hepática.	68
<b>Tabela 12</b>	Comparação entre os marcadores de integridade do hepatócito e colestase entre o co-infectado pelo vírus da hepatite B e/ou C e o grupo mono-infectado pelo vírus da imunodeficiência humana no início do estudo e após dois anos de terapêutica com efavirenz.	70
<b>Tabela 13</b>	Alterações no valor de colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade em indivíduos medicados com efavirenz como primeiro esquema anti-retroviral ou como substituição de inibidores de protease.	77
<b>Tabela 14</b>	Comparação entre variáveis demográficas e clínicas entre os grupos de indivíduos, sem tratamento e tratados com efavirenz.	96
<b>Tabela 15</b>	Comparação a actividade da Paraoxonase (PON-1) e razão actividade PON-1:HDL-c entre indivíduos sem tratamento e tratados com efavirenz.	97

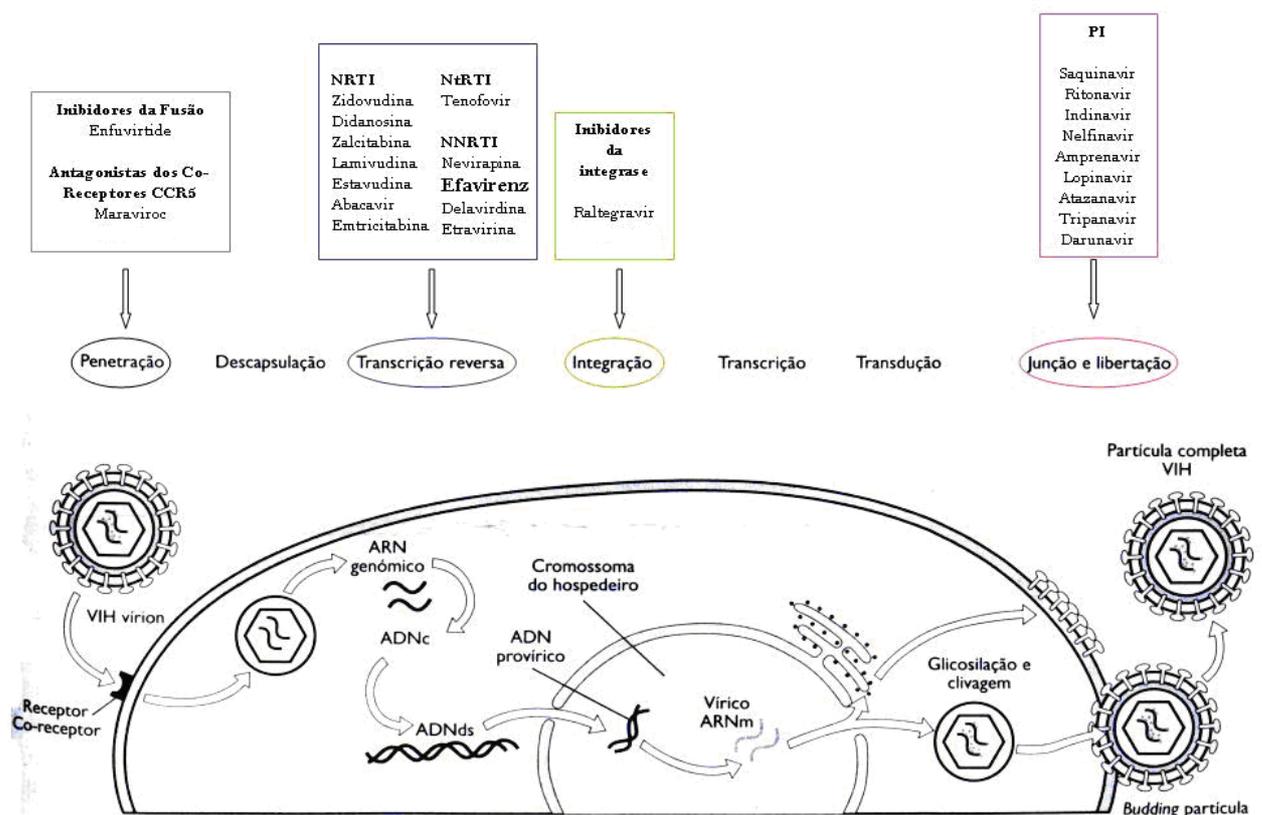
## Lista de Abreviaturas

3TC	Lamivudina
AAG	$\alpha_1$ -glicoproteína ácida
ABC	Transportadores <i>ATP binding cassette</i>
ABV	Abacavir
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AP	Fosfatase alcalina
Apo	Apoproteína
APV	Amprenavir
ARV	Anti-retroviral
AST	Aspartato aminotransferase
ATZ	Atazanavir
AUC	Área sob a curva concentração vs. tempo
AZT	Zidovudina
BMI	Índice de massa corporal
CCR5	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CEM	Concentração eficaz mínima
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
CTM	Concentração tóxica mínima
$C_{max}$	Concentração máxima
$C_{min}$	Concentração mínima
Col	Colaboradores
CI	Intervalo de confiança
CV	Coeficiente de variação
$C_{vale}$	Concentração vale
CYP	Sistema enzimático citocromo P450
d4T	Estavudina
ddl	Didanosina
EFV	Efavirenz
Eg	<i>Exempli gratia</i>
FCT	Emtricitabina
GGT	$\gamma$ -glutamilttransferase
HAART	<i>Highly active anti-retroviral therapy</i>
HDL-c	Colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência

IDV	Indinavir
KKGT	<i>Association for quality assessment in TDM and clinical toxicology</i>
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL-c	Colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade
LPV	Lopinavir
Ly	Linfócitos
MDR-I	Gene <i>multidrug resistance</i> do tipo I
NFV	Nelfinavir
NNRTI	Análogo não-nucleósido inibidor da transcriptase reversa
NRTI	Análogo nucleósido Inibidor da transcriptase reversa
NVP	Nevirapina
OD	Toma única diária
P-gP	Glicoproteína-P
PD	Farmacodinâmica
PI	Inibidores da protease
PK	Farmacocinética
PON-I	Paraoxonase do tipo I
RTV	Ritonavir
SD	Desvio padrão
SEM	Erro padrão da média
SLC	Tansportador <i>solute carrier</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> classe B do tipo I
SQV	Saquinavir
$t_{1/2}$	Tempo de semi-vida
TC	Colesterol total
TDF	Tenofovir
TDM	Monitorização terapêutica de fármacos
TG	Triglicéridos
$t_{max}$	Tempo a que é atingida a concentração máxima
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
Vs.	Versus

## Os fármacos anti-retrovirais e o ciclo de replicação viral

Os indivíduos imunocomprometidos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) requerem tratamento crónico com fármacos anti-retrovirais (ARV). Os principais passos do ciclo de replicação do VIH são os alvos dos ARV (Figura 1) que, com base nos seus mecanismos de acção se distribuem nas quatro classes: inibidores da transcriptase reversa - que podem ser análogos nucleósidos (NRTI), nucleótidos (tenofovir, TDF) ou não-nucleósidos (NNRTI) - os inibidores da protease (PI), da integrase, e da entrada - que se dividem nos sub-grupos inibidores da fusão e antagonistas dos co-receptores CCR5 (para revisão ver Warnke e col, 2007; Clumeck e col, 2008; Gazzard e col, 2008; Hammer e col, 2008).



**Figura 1.** Ciclo biológico do vírus da imunodeficiência humana (VIH) e possíveis locais de acção para os diferentes fármacos anti-retrovirais (ARV). Os fármacos ARV actualmente disponíveis inibem a actividade dos enzimas transcriptase reversa, protease, integrase e os passos de fusão e entrada inibindo, consequentemente, o ciclo de replicação viral. As células infectadas pelo VIH são células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> do sistema nervoso central, tracto intestinal e genital, sangue, tecido linfóide, pulmão, glândulas salivares, fígado e rins (adaptado de Vaz da Silva e col, 2001). NNRTI: inibidores da transcriptase reversa não-nucleósidos NRTI: inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleósidos. NtRTI: inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleótidos. PI: inibidores de protease.

A replicação do VIH ocorre nas células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> do sistema nervoso central (SNC), do tracto

intestinal, sangue e tecido linfóide, tracto genital, pulmão, glândulas salivares, fígado e rins.

## **A terapêutica anti-retroviral**

A terapêutica anti-retroviral de elevada eficácia (HAART - *highly active anti-retroviral therapy*) actualmente recomendada resulta da combinação diária de três ou mais ARV (Clumeck e col, 2008; Gazzard e col, 2008; Hammer e col, 2008). Uma resposta eficaz à HAART permite obtenção e manutenção de níveis plasmáticos de RNA viral (carga viral) inferiores aos limite mínimo de quantificação dos métodos actualmente disponíveis (normalmente, 50 cópias RNA VIH/mL a 400 cópias RNA VIH/mL). No entanto, a terapêutica anti-retroviral não permite erradicar o VIH, pelo que uma vez suspensa é observado o reactivar da replicação viral (Chun e col, 2000). A razão desta infecção persistente é multifactorial (para uma revisão Pomerantz e col, 2003): a existência de *células santuários* onde o vírus pode persistir e replicar-se mesmo após erradicação do plasma (*eg*, células SNC e testículos), a manutenção de carga viral plasmática residual e a constituição de reservatórios de células TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> memória que alojam formas latentes do VIH, com possibilidade de permanecer longos períodos neste estado de latência e de fornecer uma memória de genótipos virais.

Dado que a erradicação é impossível, os objectivos da terapêutica anti-retroviral actualmente disponível são prolongar e melhorar a qualidade de vida do indivíduo, procurando que a supressão viral (normalmente definida como uma carga viral inferior a 50 cópias RNA VIH/mL) seja alcançada o mais rápido possível e mantida o máximo de tempo possível. Com estes objectivos é esperado minimizar o risco de desenvolvimento de resistências, preservar/reconstituir o sistema imunitário e não limitar as opções terapêuticas subsequentes.

A indicação para o início do tratamento do VIH deve ser cuidadosamente ponderada, tendo em consideração o estado clínico do infectado, a contagem linfócitos (Ly) TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, a carga viral e a capacidade de adesão ao tratamento (Clumeck e col, 2008; Hammer e col, 2008; Gazzard e col, 2008). Um clínico tem a necessidade de planear e manter opções terapêuticas para um indivíduo cujo período de tratamento é indefinido e que provavelmente se prolongará para a vida. Considerando o primeiro esquema ARV como o que melhor garante uma resposta de sucesso e o que potencialmente oferece uma melhor relação custo/benefício é indispensável que todos os esforços sejam feitos no sentido de procurar a sua optimização e, por conseguinte, a monitorização terapêutica das concentrações destes fármacos surge como uma ferramenta útil nesta optimização.

Actualmente, o esquema HAART de primeira linha no adulto, isto é, o primeiro esquema usado para o tratamento do indivíduo, é constituído por dois NRTI juntamente com um NNRTI ou com um PI associado ao ritonavir (RTV) (Clumeck e col, 2008; Gazzard e col, 2008; Hammer e col, 2008). Nesta última opção, o PI RTV é administrado em dose não terapêutica e actua como *booster*.

Uma vez instituída a HAART, a carga viral e contagem Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> são considerados marcadores do efeito da terapêutica (Gazzard e col, 2008). Com uma terapêutica eficaz, as cargas virais diminuem rapidamente à medida que a replicação viral é inibida, sendo esperadas uma queda de 1 log<sub>10</sub> (10 vezes) após quatro semanas de HAART e uma descida da carga viral para níveis plasmáticos indetectáveis (geralmente inferiores a 50 cópias/mL) às 24 semanas (Hammer e col, 2008). Uma vez conseguida a supressão viral, a carga viral deve ser monitorizada em intervalos regulares (cada 3 a 4 meses) e elevações consistentes no seu valor são definidoras de falência virológica.

Uma vez suprimida a carga viral, podem ocorrer aumentos transitórios do seu valor ligeiramente acima do limite inferior detectável (denominados *blips*) ou aumentos mantidos (falência virológica).

O limite para considerar níveis significativos de replicação viral que vão decretar alterações à HAART é variável: foi aceite a repetição de valor superior a 400 cópias/mL no espaço de 4 semanas, ou um valor inferior a este se é detectada resistência (Gazzard et al, 2008). Outros autores consideram o limite de 150 cópias/mL (Josephson e col, 2009) ou superior a 50 cópias/mL (Clumeck e col, 2008), em indivíduos em terapêutica há mais de 6 meses.

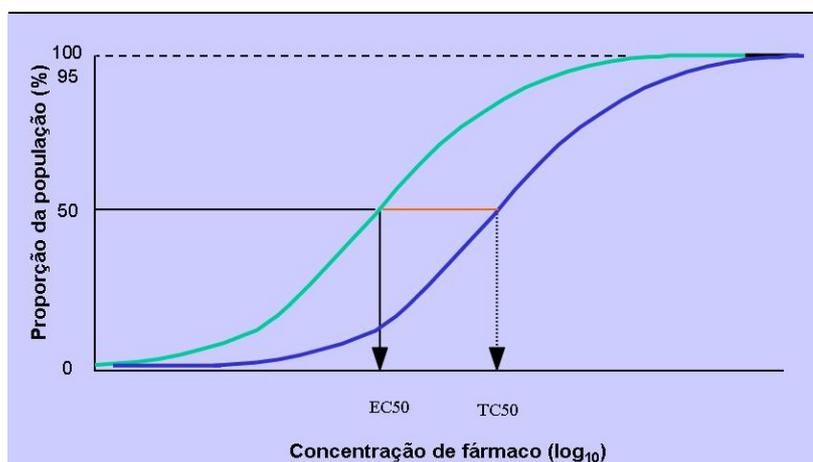
A selecção e transmissão de estirpes do VIH resistentes podem ser minimizadas se a adesão à terapêutica for maximizada. Procuram-se assim, esquemas terapêuticos mais simplificados com menor número de comprimidos, maior intervalo de dosagem, sem interferência com a alimentação e dos quais resultem menos efeitos tóxicos e menos interacções medicamentosas. Os estudos farmacocinéticos surgem como uma ferramenta que permite avaliar esquemas terapêuticos mais simplificados, desenvolver alternativas para os indivíduos em falência terapêutica e diminuir o grande leque de efeitos secundários (Back e col, 2001). Mesmo quando existe adesão completa, a variabilidade interindividual nas propriedades farmacocinéticas (PK) dos ARV pode condicionar a resposta à terapêutica e a monitorização terapêutica das concentrações do fármaco (TDM) surge como uma tentativa de minimizar esta variabilidade.

## A monitorização terapêutica de fármacos anti-retrovirais

Nesta introdução geral segue-se uma breve revisão de alguns conceitos Farmacológicos utilizados na TDM. Posteriormente, apontam-se os principais requisitos que conferem a um ARV a indicação para TDM, salientando os principais trabalhos que visaram estudar a sua aplicação ao EFV e indicando a contribuição do presente trabalho, a ser desenvolvida nos capítulos que sucedem esta introdução geral, para o estudo de alguns desses requisitos.

A **monitorização terapêutica de um fármaco (TDM)** é uma estratégia multidisciplinar, baseada em medições repetidas das suas concentrações associadas a uma resposta farmacodinâmica, que visa a optimização da resposta à terapêutica e fornecer, a um clínico, informação para um tratamento individualizado (Back e col, 2002; Ivanovic e col, 2008).

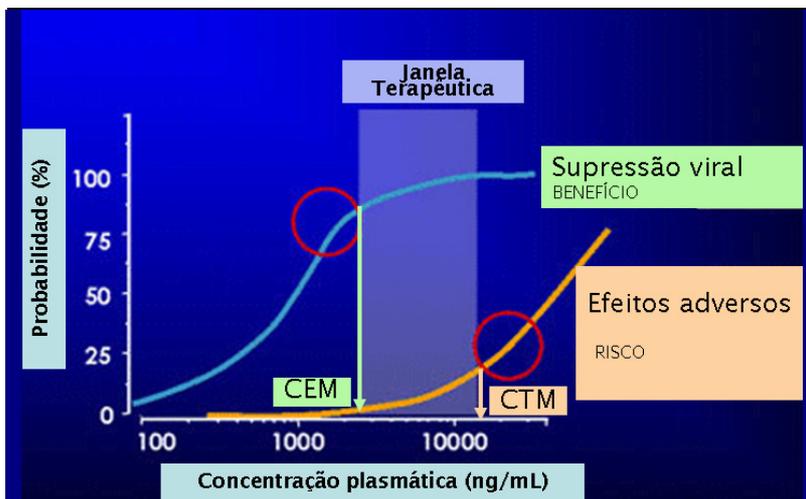
A associação entre a dose (concentração) de um fármaco e a sua eficácia e/ou toxicidade é um dos princípios da Farmacologia. O ramo da Farmacologia que estuda a relação entre a dose (concentração) e o efeito é denominado Farmacodinâmica (PD). Quando existe uma relação PD entre a concentração plasmática de um fármaco e a resposta terapêutica (Figura 2), esta concentração pode ser manipulada através de um ajuste de dose, ou outras formas de intervenção, para obter concentrações óptimas. Para que um fármaco com interesse terapêutico possa ser útil, é necessário que a sua concentração eficaz mínima (CEM - a mais baixa concentração capaz de produzir o efeito desejado) seja inferior à concentração tóxica mínima (CTM - a menor concentração que origina efeitos tóxicos) (Figura 3) (Back e col, 2002). O intervalo de concentrações associado à melhor razão eficácia/toxicidade, que é limitado pela CEM e CTM e que corresponde a concentrações óptimas, é denominado por janela terapêutica.



**Figura 2.** Curvas concentração-resposta (adaptado de Back e col, 2002). A análise de curvas concentração-resposta permite a definição de um intervalo de concentrações óptimas.

EC<sub>50</sub> Concentração que permite uma resposta máxima em 50% dos indivíduos.

TC<sub>50</sub> Concentração responsável por reacções tóxicas em 50% dos indivíduos.



**Figura 3.** A janela terapêutica é limitada pela concentração eficaz mínima (CEM) e pela concentração tóxica mínima (CTM).

O ramo da Farmacologia, complementar à PD, é a PK – do greco *pharmakon* (fármaco) + *kinesis* (movimento) – que descreve o efeito do organismo sobre fármaco ou o movimento do fármaco no organismo. Este percurso dinâmico denomina-se ciclo do medicamento no organismo e inclui a absorção, a distribuição, a biotransformação (ou metabolismo) e eliminação do fármaco (Figura 4). Este percurso e todas as etapas que o representam constituem factores de variabilidade nos parâmetros PK.

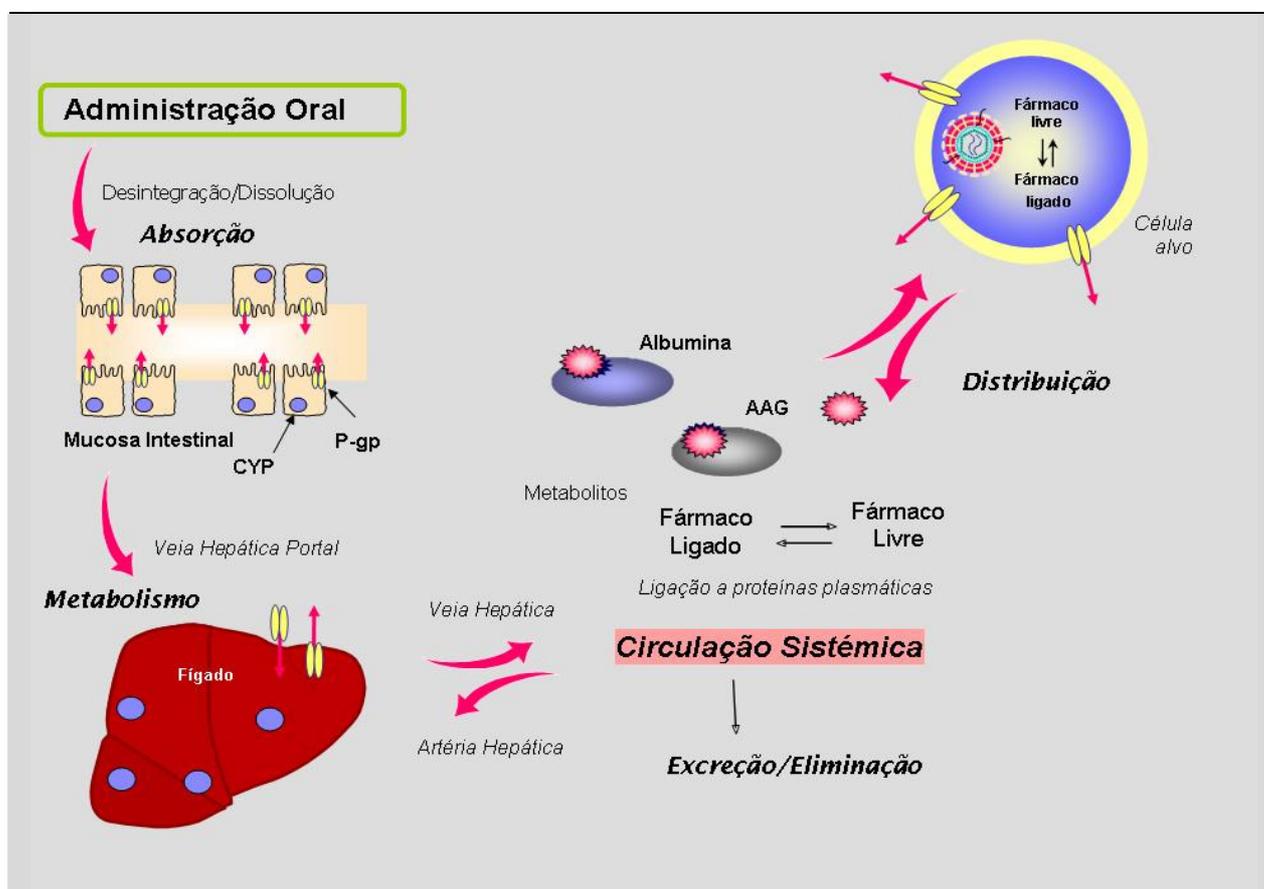
### **Ciclo geral do medicamento e factores implicados na variabilidade farmacocinética**

Uma vez administrado por via oral, o fármaco vai penetrar no tracto gastrintestinal, ser absorvido via mucosa intestinal, passar pela veia porta, fígado e entrar na circulação sistémica (Figura 4) - este processo recebe o nome de absorção do fármaco. O fármaco que entra no enterócito e não se difunde na circulação portal é biotransformado (*eg.*, acção do sistema enzimático citocromo P450 - CYP), ou volta para o lúmen intestinal por acção de transportadores (*eg.*, glicoproteína-P - P-gP).

Do intestino, o fármaco passa ao fígado. Apesar da biotransformação ocorrer em diversos órgãos, o fígado é o local de maior relevo. No fígado, os enzimas responsáveis pela biotransformação, a presença de transportadores de influxo e efluxo e a excreção contribuem para a quantidade de dose oral do fármaco que não atinge a circulação sistémica. Esta fracção ou percentagem do fármaco administrado que é removida antes de atingir circulação sistémica, pela passagem através da parede gastrintestinal e do fígado, é denominada efeito de primeira passagem.

Quando atingida a circulação sanguínea, o fármaco vai ser distribuído pelos diversos tecidos do organismo, processo designado por distribuição. Também a distribuição do fármaco é afectada por diferentes factores, *eg.*, a percentagem de massa gorda e a captação por eritrócitos, aliados à existência de arranjos morfofuncionais especiais (*eg.*, a barreira hemato-encefálica e placentária) e a possibilidade do fármaco se ligar a proteínas (principalmente às plasmáticas).

Neste contexto, a albumina e a  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AAG) assumem particular importância, encontrando-se a fracção do fármaco ligada às proteínas em equilíbrio reversível com a fracção livre. Uma vez que a fracção ligada é incapaz de atravessar a parede capilar esta vai condicionar as concentrações tecidulares atingidas em equilíbrio e, por outro lado, não pode ser excretada, nem biotransformada e é farmacologicamente inactiva. No entanto, apesar de farmacologicamente inactiva, a fracção ligada actua como um depósito para protecção de biotransformação ou excreção, ou seja prolonga a permanência da forma livre do fármaco. Como demora algum tempo até se atingir o equilíbrio fracção ligada/livre, a concentração



**Figura 4.** Esquema ilustrativo do percurso dos anti-retrovirais (ARV) de administração oral no organismo e principais factores responsáveis pela variabilidade nas concentrações de fármaco disponíveis na célula alvo. Após a toma da dose prescrita é atingida uma determinada concentração do fármaco no plasma que depende principalmente do efeito de primeira passagem. Uma vez no plasma, o ARV circula associado a proteínas como albumina e a  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AAG). O fármaco é posteriormente distribuído pelos diferentes tecidos. No local de acção farmacológica, o ARV (onde a sua acção vai depender do transporte do fármaco livre para, e no, interior da célula e, nos NRTI, também da activação intracelular) vai permitir a inibição da replicação viral, o que se traduz num decréscimo das cargas virais plasmáticas e um aumento no número de células CD<sub>4</sub><sup>+</sup> em circulação. CYP: sistema enzimático citocromo P450. P-gP: glicoproteína-P.

plasmática para TDM não deve ser colhida antes do fármaco estar completamente distribuído. Porém, as concentrações plasmáticas exprimem o seu valor total (livre mais ligado).

Os fármacos, uma vez absorvidos e distribuídos, não se mantêm nos mesmos tecidos e órgãos, nem se fixam permanentemente ao organismo. Os processos de excreção encarregam-se de os eliminar, na forma intacta ou como metabolitos. Assim, na fase de distribuição há passagem do fármaco do sangue para os tecidos de acordo com o débito sanguíneo de cada um, gradientes de concentração, características do fármaco e barreiras biológicas. Subsequentemente, ocorre o oposto: o gradiente é agora favorável à passagem do fármaco do tecido para o sangue, a biotransformação e excreção mantêm esse gradiente e o fármaco, ao fim de um certo tempo, é eliminado.

A biotransformação visa facilitar a excreção dos metabolitos resultantes em detrimento dos fármacos originais. Na biotransformação, o fármaco sofre acção de enzimas que catalisam a modificação da sua estrutura e, conseqüentemente, as suas propriedades físico-químicas e farmacológicas, devendo salientar-se dois aspectos fundamentais: em primeiro lugar, os fármacos podem ser activados ou inactivados pela biotransformação. Por outro lado indução/inactivação de enzimas biotransformadores podem ter um impacto significativo na sua concentração. Pode ainda referir-se que cada enzima pode estar envolvido no metabolismo de mais que um fármaco e que mais que um enzima podem estar envolvidos no metabolismo de um mesmo fármaco, aumentando a imprevisibilidade no efeito sob as concentrações dos fármacos. Estes enzimas têm um espectro largo de substratos, podendo apresentar diferentes isoformas e diferenças interindividuais na sua actividade. A natureza polimórfica dos genes que codificam para estes enzimas pode resultar numa menor expressão do enzima ou na ausência de uma isoforma particular. Alguns destes enzimas são constitutivos, ou seja, têm uma presença e actividade contínuas, noutros a sua expressão é influenciada principalmente por factores externos (*eg* álcool, tabaco, factores dietéticos). Adicionalmente, também os fármacos podem estimular a actividade dos enzimas biotransformadores de fármacos - indução enzimática - incluindo a sua própria biotransformação, podendo resultar numa síntese enzimática aumentada ou numa diminuição da sua degradação (menos frequente). Os fármacos com capacidade de induzir o seu próprio metabolismo são denominados auto-indutores. Na inibição enzimática, diferentes fármacos substratos do enzima, podem competir para a sua actividade, reduzindo a biotransformação de um deles ou de ambos - inibição enzimática competitiva - ou um dos fármacos pode inibir o metabolismo por ligação a um centro não catalítico, diminuindo a actividade do enzima para a biotransformação do outro fármaco - inibição não-competitiva.

As reacções envolvidas na biotransformação podem implicar alteração ou exposição de grupos funcionais (reacções de Fase I) ou podem levar à formação de conjugados com os grupos funcionais expostos (reacções de Fase II). A maioria das vias de biotransformação de fármacos envolve reacções de oxidação, redução, hidrólise e conjugação. O CYP é uma superfamília de isoformas enzimáticas envolvida na biotransformação de numerosas substâncias. Estes isoenzimas são reconhecidos como os predominantes das reacções de Fase I e, provavelmente, os catalisadores mais importantes entre todos os enzimas envolvidos na

biotransformação (para revisão recente ver Wang e Tompkins, 2008). No Homem, estão agrupados em 18 famílias e 42 sub-famílias e consistem em 59 genes activos. Entre estes, as famílias 1 a 4 incluem mais de 90% das reacções de Fase I do metabolismo dos fármacos, com o CYP3A4 a representar a maior fatia (50%), seguido do CYP2D6 (30%) (para revisão recente ver Wang e Tompkins, 2008). Relativamente à expressão hepática dos diferentes isoenzimas, o CYP 3A4 tem a maior importância quantitativa (40% do conteúdo relativo).

O metabolismo dos ARV é dominado pelo CYP e os diferentes ARV comportam-se como indutores e inibidores de enzimas responsáveis pela biotransformação e transportadores de fármacos (para uma revisão ver Walubo, 2007). No contexto dos inibidores enzimáticos, um dos exemplos mais interessante é o RTV. O princípio da adição de RTV é usar a combinação de dois fármacos em que um deles, o *booster*, que é dado em doses menores, inibe o metabolismo do outro, permitindo manter as suas concentrações plasmáticas mais elevadas ao longo do intervalo de dosagem. A interacção farmacológica entre o RTV e os outros PI é útil terapêuticamente porque prolonga o tempo de exposição ao fármaco, permitindo a redução da dose e/ou número de doses diárias e minimizando a interferência da alimentação (Moyle e Back, 2001). Este aumento da exposição fornece uma margem de segurança em caso de falha ou atraso na toma de uma dose. Embora a adição de RTV permita aumentar a concentração de um segundo PI, não há indicações de que a variabilidade interindividual na concentração seja diminuída. Por outro lado, pode apresentar como desvantagem, o facto de existir um maior risco de ocorrerem reacções secundárias a longo-termo. O RTV é um inibidor do CYP3A4 e a sua adição resulta na modificação do perfil da curva concentração versus (*vs.*) tempo (Figura 5A), dependendo da contribuição relativa dos dois processos PK inibidos pelo RTV: o efeito de primeira passagem ou a excreção hepática (Back e col, 2002). Recentemente, foi também descrito o efeito inibitório do RTV no CYP2D6. Apesar do RTV ser conhecido como *booster*, este fármaco, em dose *boosting*, induz os CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e enzimas responsáveis pela glucuronocjugação, aumentando o seu potencial para interacções, que podem ser responsáveis por concentrações sub-terapêuticas de outros ARV (Foisly e col, 2008).

Por outro lado, os transportadores da família *ATP binding cassette* (ABC) e *solute carrier* (SLC) actuam como uma barreira na absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos. Dentro destas proteínas, a melhor estudada é a P-gP um transportador da família *ATP binding cassette* (ABC) também denominada ABCB-1 ou *Multidrug Resistance* do tipo 1 (MDR-1), estrategicamente localizada no intestino, fígado, barreira hemato-encefálica, tracto genital masculino, placenta e tecido linfóide (Jones e col, 2001a). A expressão destes transportadores limita a penetração de alguns ARV, alterando as suas concentrações intracelulares e a sua presença nas células alvo pode ser determinante para a manutenção de santuários virais (Jones e col, 2001b; Sun e col 2004). Tal como o CYP, também os transportadores podem ser inibidos e induzidos por anti-retrovirais (Störmer e col, 2002; Chandler e col 2003; Weiss e col, 2007) a expressão da P-gP, *eg.*, é superior nos indivíduos infectados, relativamente aos indivíduos não infectados (Sun e col, 2004).

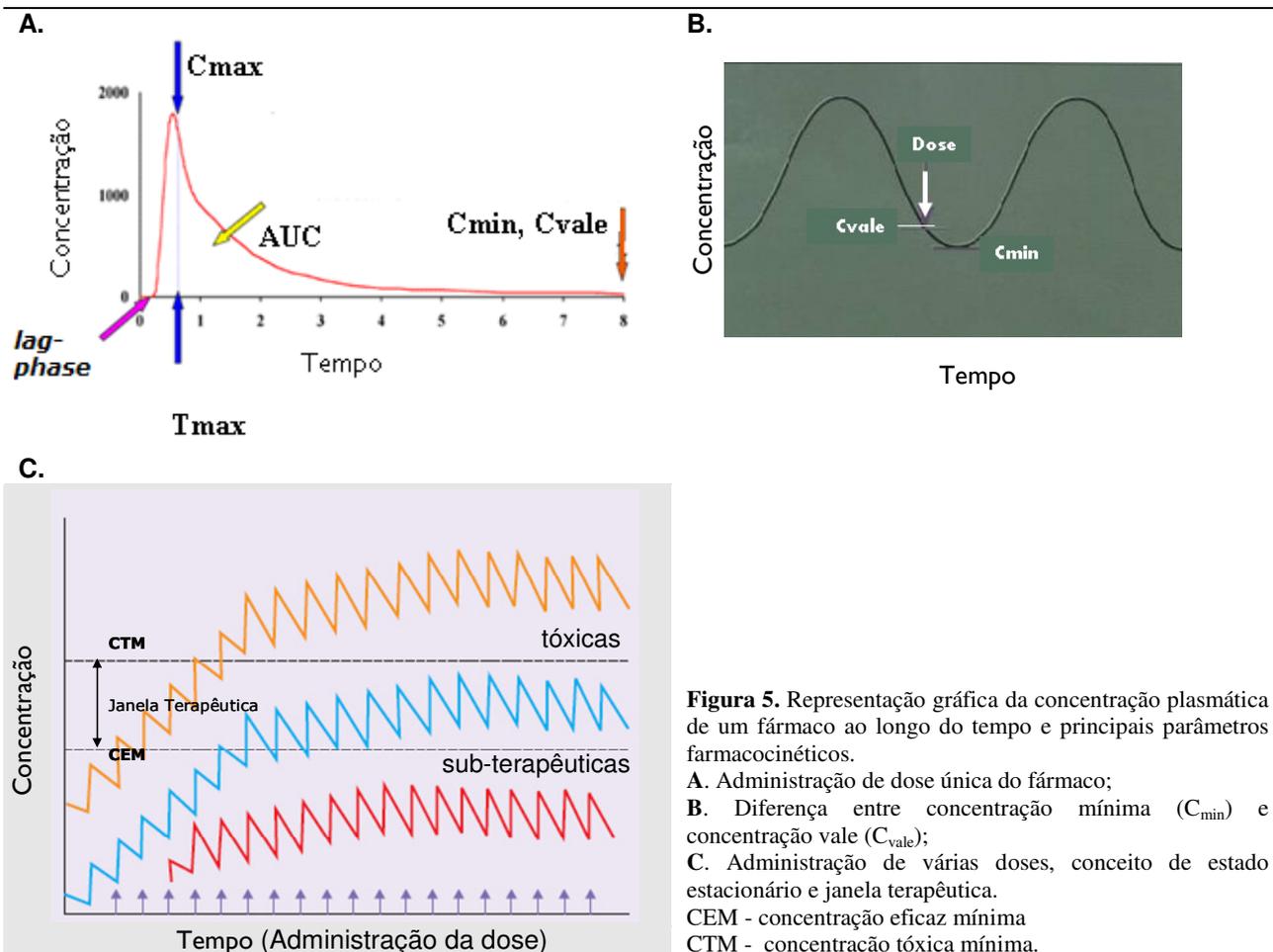
Esta panóplia de efeitos traduz-se numa variabilidade imprevisível nas concentrações de ARV, salientando a relevância da TDM.

Em associação com a biotransformação, a excreção é o segundo processo que elimina o fármaco do organismo: entenda-se excreção como a saída do fármaco do plasma e eliminação como a saída do fármaco do organismo. Ao ser biotransformado, a forma original do fármaco deixa de existir e o fármaco é eliminado. Os processos de excreção biliar e renal eliminam o fármaco pelas fezes e urina. Assim, na designação de eliminação incluem-se os processos que levam ao desaparecimento do fármaco do organismo, quer seja real ou apenas resultante da biotransformação.

Diferentes factores estão subjacentes às variações nas diferentes etapas do ciclo do geral do fármaco no organismo, *eg.*, os de carácter genético (Rotger e col, 2006; Cressey e Lallemand, 2007), factores patológicos como a insuficiência hepática e renal (Frye e col, 2006; McCabe e col, 2008), a infecção/inflamação pelo VIH e co-infecções (Lee e col, 1993; Slain e col, 2000; Renton, 2004; Petrovic e col, 2007). As variáveis fisiológicas podem conduzir a diferenças nas concentrações plasmáticas entre homens e mulheres; crianças, adultos e idosos e inter-étnicas (Fraaij e col, 2004; Mirochnick e Capparelli, 2004; Rotger e col, 2006; Rhee e Greenblatt, 2008). Entre os factores externos, um bom exemplo são as interacções com outros fármacos que podem estar presentes em todas as etapas deste ciclo (para uma revisão Walubo, 2007; Robertson e col, 2007).

## Curvas concentração vs. tempo – parâmetros farmacocinéticos

Se a concentração plasmática do fármaco for quantificada ao longo do tempo é obtida uma curva semelhante à apresentada na Figura 5A. O patamar (*lag-phase*), no início da curva, corresponde ao tempo necessário para ocorrer o processo de absorção. A absorção do fármaco é o processo mais importante para influenciar a sua concentração plasmática. No entanto, o fármaco está simultaneamente a entrar e a sair do plasma. No momento em que a velocidade de entrada no plasma e a velocidade de saída do plasma sejam iguais é atingida a concentração máxima ( $C_{max}$ ) e o momento no tempo a que isto ocorre é chamado tempo máximo ( $t_{max}$ ) (Figura 5A). A partir deste momento, a velocidade de saída do plasma excede a velocidade de absorção do fármaco e a sua concentração plasmática começa a diminuir. Se a velocidade de excreção é mais rápida que a velocidade de eliminação assiste-se a um declínio bifásico. Primeiro ocorre um decréscimo mais rápido, que é principalmente resultado da distribuição do fármaco a partir do plasma para outros compartimentos (saída do plasma - excreção). A segunda fase do decréscimo da concentração, mais lenta, resulta da eliminação contrabalançada com a redistribuição do fármaco a partir dos tecidos para o plasma.



**Figura 5.** Representação gráfica da concentração plasmática de um fármaco ao longo do tempo e principais parâmetros farmacocinéticos.

**A.** Administração de dose única do fármaco;

**B.** Diferença entre concentração mínima ( $C_{min}$ ) e concentração vale ( $C_{vale}$ );

**C.** Administração de várias doses, conceito de estado estacionário e janela terapêutica.

CEM - concentração eficaz mínima

CTM - concentração tóxica mínima.

A concentração de um fármaco no organismo é geralmente menor que a necessária para saturar a capacidade de eliminar um fármaco e, portanto, a capacidade de eliminação é proporcional à sua concentração no plasma (cinética de eliminação de primeira ordem). O parâmetro PK que se relaciona com este processo é o tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) plasmático. O  $t_{1/2}$  traduz o tempo necessário para eliminar 50% do fármaco do organismo.

No fim do intervalo de dosagem, no momento anterior à ingestão da próxima dose, é atingida a concentração vale ( $C_{v\text{ale}}$ ), que pode ser distinta da concentração mínima ( $C_{\text{min}}$ ) (Figura 5B): a  $C_{\text{min}}$  é definida como a menor concentração do fármaco no intervalo de dosagem e a  $C_{v\text{ale}}$  é definida como a concentração do fármaco imediatamente antes da toma da dose seguinte. Estes valores não são obrigatoriamente idênticos, *eg.*, atrasos na absorção podem levar a que a concentração continue a diminuir mesmo após a toma da dose seguinte. Contudo, os seus valores são geralmente muito próximos. Do ponto de vista prático, para a obtenção da  $C_{\text{min}}$  é necessária a recolha intensiva de amostras no final do intervalo de dosagem, uma vez que o momento exacto a que a  $C_{\text{min}}$  ocorre pode variar. A  $C_{v\text{ale}}$  é mais facilmente obtida, uma vez que é necessária a recolha de apenas uma única amostra, o que leva a que seja mais usada em detrimento da  $C_{\text{min}}$ . A área sob a curva concentração plasmática vs. tempo (AUC) indica a exposição total ao fármaco durante o intervalo de dosagem, após uma dose única, sem fornecer outras informações acerca do perfil PK, *eg.*, se existe uma grande diferença entre o  $C_{\text{min}}$  e o  $C_{\text{max}}$ .

O perfil PK é habitualmente diferente após a administração de uma única dose ou após a administração de múltiplas doses (Figura 5C). Após a administração de doses repetidas de um fármaco, quando é atingido um ponto em que a concentração plasmática média não varia com a administração da dose seguinte, diz-se que é atingido o estado estacionário, o que ocorre, normalmente, após cinco  $t_{1/2}$ . A importância deste factor traduz-se, do ponto de vista prático, em que a colheita de amostras para TDM não deve ser realizada num período anterior a cinco  $t_{1/2}$  para um indivíduo que *eg.*, inicia o tratamento, após mudança de dose ou após suspeita de interacção. Para um fármaco cujo metabolismo é induzido, *eg.*, este factor deve ser considerado uma vez que há uma alteração da concentração plasmática em equilíbrio. O *gold standard* seria monitorizar a AUC, mas na maioria dos casos é extremamente penoso do ponto de vista do indivíduo, impraticável dos pontos de vista de recursos humanos e monetário. O  $C_{v\text{ale}}$  permite normalmente uma estimacão adequada da exposicão (Hoetelmans, 1999, Villani e col, 1999) e tem sido o parâmetro principalmente recomendado para a TDM de ARV (La Porte, 2006; Josephson e col, 2009). A TDM não deve ser realizada antes de o fármaco ser completamente absorvido e distribuído, o fármaco deve estar em estado estacionário e tem por objectivo manter a sua concentração plasmática em estado estacionário entre as CEM e CTM (Figura 5 C).

## **Características farmacológicas do efavirenz**

O efavirenz (EFV) tem actividade anti-VIH-1, mas não inibe o VIH-2. Relativamente aos subtipos do VIH-1, o tratamento com este ARV foi predominantemente estudado para o seu subtipo B. Este subtipo é o mais comum nos países desenvolvidos (Thomson e Najera, 2007), apesar de globalmente cerca de 50% dos indivíduos estarem infectados com o subtipo C (Hemelaar e col, 2006). No entanto, a resposta virológica ao EFV parece ser semelhante nos subtipos B e C (Brenner e col, 2003; Grossman e col, 2004).

Em associação com outros fármacos NRTI, o EFV é o ARV de eleição em esquemas HAART de primeira linha que contenham NNRTI (Clumeck e col, 2008; Gazzard e col, 2008; Hammer e col, 2008). Nalgumas *guidelines*, os esquemas com EFV são apontados como os preferenciais na primeira linha (Gazzard e col, 2008; Josephson e col, 2009).

A resposta a esquemas HAART primeira linha com EFV foi estabelecida em vários ensaios clínicos. Estes estudos compararam os esquemas HAART incluindo EFV com outros esquemas triplos (Maggiolo e col, 2003; DeJesus e col, 2004; Gallant e col, 2004; van Leth e col, 2004a; Saag e col, 2004; Moyle e col, 2005; Gulick e col, 2006; Arribas e col, 2008; Riddler e col, 2008). Na tabela 1 resumem-se os resultados obtidos relativamente ao braço de estudo em que os indivíduos receberam EFV de modo a permitir uma apreciação global da percentagem de indivíduos a receber este tratamento que têm carga viral < 50 cópias num momento do estudo pré-definido (*eg.*, 48 semanas) (Tabela 1).

A transmissão de vírus resistentes aos NNRTI está documentada (Wensing e col, 2005). A barreira genética para o EFV é considerada baixa, já que uma única mutação no gene que codifica para o enzima transcriptase reversa do VIH-1 pode induzir resistência fenotípica, *eg.* a K103N é a mais comum (Adkins e Noble, 1998; Bacheler e col, 2000). O perfil de resistências do EFV é coincidente com o ARV da mesma classe nevirapina (NVP) (resistência-cruzada) (Antinori e col, 2002), podendo também ser acompanhado do aparecimento de mutações que conferem resistência aos NRTI, reduzindo o número de opções terapêuticas destas classes (Gazzard e col, 2008).

**Tabela 1.** Resumo dos resultados obtidos em diferentes ensaios clínicos relativos à percentagem de indivíduos cujo primeiro esquema terapêutico incluiu Efavirenz (EFV) e que apresentaram carga viral < 50 cópias/mL num determinado período do tratamento.

Autores	Número de indivíduos	Período de tratamento (semanas)	Indivíduos com carga viral <50 cópias/mL (%) <sup>1</sup>	Aumento da contagem de Ly TCD4 <sup>+</sup> (células/mm <sup>3</sup> )	HAART
DeJesus e col, 2004 <sup>A</sup>	324	48	70	155	EFV+3TC+ ZDV
	325	48	69	209	EFV+3TC+ABV
Van Leth e col, 2004 <sup>a</sup> <sup>B</sup>	400	48	70	160	EFV+3TC+d4T
Moyle e col, 2005 <sup>C</sup>	384	48	66	188	EFV+3TC+ABV
Saag e col, 2004 <sup>D</sup>	268	60	76	153	EFV+ddl+FTC
	285	60	54	120	EFV+ddl+d4T
Riddler e col, 2008 <sup>E</sup>	250	96	89	230	EFV+2 NRTIs
Gallant e col, 2004 <sup>F</sup>	299	144	68	263	EFV+3TC+TDF
	301	144	63	283	EFV+3TC+d4T
Arribas e col, 2008 <sup>G</sup>	243	144	64	271	EFV+ZDV/3TC
	244	144	76	312	EFV+FCT/TDF
Gulick e col, 2006 <sup>H</sup>	382	192	85	310	EFV+ZDV/3TC

3TC: Lamivudina. ABV: abacavir. d4T: estavudina. ddl: didanosina. HAART: esquema antiretroviral. FCT emtricitabina. NRTI: análogo nucleósido inibidor da transcriptase reversa. TDF: tenofovir. ZDV: zidovudina. <sup>1</sup>Resultado de análise intent-to-treat.

Falência virológica: **A:** 6% no grupo ABV e 4% no grupo ZDV; **B:** 15,7%; **C:** 10%; **D:** falência virológica: 4% no grupo FCT e 12% no grupo d4T. **E:** 24%; **F:** 16% no grupo TDF e 16% no grupo ZDV **G:** 6% no grupo ZDV/3TC e 3% FCT/TDF e **H:** 26%.

O EFV é o ARV com reacções adversas no SNC mais relevantes (Cespedes e Alberg, 2006), sendo esta uma das suas maiores limitações. Estes efeitos nem sempre são reconhecidos e/ou associados ao fármaco e podem mascarar o diagnóstico ou a adesão ao tratamento. Entre eles, incluem-se tonturas, insónias, depressão, ansiedade (superior a 10%, valor muito variável entre diferentes estudos) desconcentração, fadiga, sonolência, dor de cabeça, sonhos alterados, depressão grave e alucinações (1 a 10% dos indivíduos) (Adkins e Noble, 1998; Marzolini e col, 2001; Csajka e col, 2003; Lochet e col, 2003; Duong e col, 2004; Gallego e col, 2004; Gutiérrez e col, 2005; Rendón e col, 2005; Takahashi e col, 2007; Muñoz-Moreno e

col, 2009). Dado que estes sintomas ocorrem normalmente várias horas após a toma, aconselha-se que esta seja feita antes de deitar, de modo a reduzir o desconforto do indivíduo. Estes efeitos estão indicados como responsáveis por 4 a 10% de descontinuação ao ARV (Maggiolo, 2007), apesar de outros autores terem descrito percentagens superiores (Gutiérrez e col, 2005; Muñoz-Moreno e col, 2009). Estes efeitos ocorrem normalmente nas 2 a 4 primeiras semanas de exposição ao fármaco, mas podem também manifestar-se vários meses depois de iniciar o tratamento ou persistir durante vários meses, o que acontece numa minoria de indivíduos (Lochet e col, 2003; Gutiérrez e col, 2005; Maggiolo, 2007; Muñoz-Moreno e col, 2009).

Outras reacções adversas que podem manifestar-se (inferior a 10% dos indivíduos) são o *rash* cutâneo, náuseas, diarreia, alterações de lípidos e lipoproteínas e elevação das transaminases (Bossi e col, 2000; Kontorinis e Dieterich, 2003; Martin-Carbonero e col, 2003; Fortin e Joly, 2004; Kappelhoff e col, 2005; Nolan, 2005; Rivero e col, 2007).

A administração de EFV a grávidas não é recomendada (De Santis e col, 2002; Clumeck e col, 2008; Gazzard e col, 2008; Hammer e col, 2008).

A sua administração em toma única diária (OD) de 600 mg facilita a adesão e consequentemente a eficácia, sendo necessários 6 a 10 dias para se atingir o estado estacionário (Smith e col, 2001). Em voluntários saudáveis a  $C_{max}$  de EFV (aproximadamente 4,1 mg/L), em estado estacionário, é obtida 3 a 5 horas pós toma e o  $C_{vale}$  e a AUC médios descritos são 1,8 mg/L e 58,1 mg/L.h, respectivamente (Adkins e Noble, 1998).

Aumentos da dose de EFV conduzem a aumentos não proporcionais da sua  $C_{max}$ , sugerindo uma absorção reduzida para doses mais elevadas.

O EFV circula ligado às proteínas do plasma humano (>99%), principalmente à albumina. O fármaco é bem distribuído pelos diferentes tecidos (Tashima e col, 1999; Taylor e col, 2001). A concentração plasmática total relaciona-se com a concentração intracelular total (Almond e col, 2005), mostrando que a concentração plasmática é um bom marcador da concentração intracelular.

O  $t_{1/2}$  plasmática do fármaco obtido em indivíduos saudáveis é 52 a 76 h após dose única e 40 a 55 h após administração a longo-termo devido a auto-indução do seu metabolismo (Smith e col, 2001). No entanto, o  $t_{1/2}$  plasmática obtido em indivíduos VIH<sup>+</sup> foi menos de metade (Csajka e col, 2003).

O fármaco é predominantemente metabolizado no fígado, principalmente pelos isoenzimas CYP2B6 e CYP3A4 (Smith e col, 2001; Ward e col, 2003) e são produzidos metabolitos

hidroxilados, sem actividade antiviral (Mutlib e col, 1999; Smith e col, 2001), que são posteriormente glucuronoconjugados. Os metabolitos são eliminados nas fezes e na urina. Menos de 1% do fármaco aparece inalterado na urina (Mutlib e col, 1999; Smith e col, 2001), pelo que ajustes de dose em indivíduos com disfunção renal não são antecipados.

O EFV é um inibidor competitivo do CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4. No entanto, o decréscimo na AUC observado nas primeiras semanas de tratamento é devido da auto-indução do seu metabolismo, nomeadamente da actividade CYP3A4 (Smith e col, 2001). Este efeito indutor é preponderante ao inibidor (Maggiolo, 2007) e dependente da concentração do fármaco no fígado (Hariparsad e col, 2004), mas não no intestino (Mouly e col, 2002). Como consequência da complexidade de efeitos inibitórios e indutores podem ocorrer interacções PK clinicamente significativas difíceis de prever (para uma revisão ver Ma e col, 2005).

Diferentes estudos mostram que o EFV não é substrato da P-gP (Störmer e col, 2002; Almond e col, 2005; Dirson e col, 2006). Esta conclusão pode parecer contraditória com outros trabalhos que estudaram a influência de polimorfismos no gene que codifica para este transportador e a resposta à terapêutica com EFV. O polimorfismo mais estudado é o C3435T e o genótipo TT tem sido associado a uma perda de função do transportador (Pauli-Magnus e Kroetz, 2004). Todavia, apesar das associações serem pouco consensuais (Nasi e col, 2003; Winzer e col, 2005), o genótipo TT parece motivador de uma melhor resposta ao tratamento com EFV (Fellay e col, 2002, Haas e col, 2003) e estar relacionado com menores níveis circulantes do fármaco (Fellay e col, 2002). No entanto, esta contrariedade pode apenas indicar que a entrada e acumulação de um fármaco na célula pode não depender do controlo de uma só proteína transportadora.

Também o efeito do EFV como modulador da p-gP é controverso: foi descrito como não sendo modulador (Berruet e col, 2005), como indutor (Chandler e col, 2003, Weiss e col, 2008) e como inibidor (Storch e col, 2007).

### ***Critérios para a monitorização terapêutica de fármacos e aplicabilidade ao Efavirenz***

Os critérios que adjudicam a TDM a um fármaco, à optimização da resposta terapêutica e individualização da sua dose estão bem definidos. Nesta secção enumeram-se estes critérios e resumem-se alguns estudos que contribuíram para avaliar a importância da TDM na optimização da resposta ao EFV.

1. **Relação PK/PD** A concentração do fármaco (PK) está associada com o seu efeito (PD) que pode ser eficácia ou toxicidade.

Para a maioria dos fármacos ARV é hoje consensual que a relação concentração plasmática vs. eficácia existe e que os valores de CEM, acima dos quais a concentração plasmática de cada fármaco deve ser mantida, estão estabelecidos (para uma revisão ver La Porte e col, 2006). Esta correlação pode ser mascarada pela influência de outros factores, *eg.* uma adesão incompleta, outras co-patologias ou o desenvolvimento de resistências. A concentração necessária para a inibição de um vírus *wild-type*, *eg.*, pode ser menor que para uma estirpe com susceptibilidade inferior. A terapêutica combinada pode também dissimular esta relação: o indivíduo é medicado com pelo menos três fármacos e poderá estar a responder à terapêutica, pelo menos a curto prazo, e, ainda assim, um dos fármacos poderá não estar em concentrações óptimas.

### **Existe uma correlação entre a concentração plasmática do EFV e a resposta à terapêutica?**

O aparecimento de estirpes de VIH resistentes ao EFV é facilitado pela exposição a níveis plasmáticos sub-terapêuticos, inferiores a 1 mg/L (Marzolini e col, 2001). Estes autores relacionaram a concentração plasmática deste ARV com o número de falências num grupo de 130 indivíduos. As amostras foram colhidas 8 a 20 horas após a toma do fármaco e avaliadas durante 2 a 18 meses após início de EFV, com um total de 226 amostras analisadas. Uma continuação deste trabalho foi publicada posteriormente pelo mesmo grupo, que incluiu 235 indivíduos, no total de 719 amostras recolhidas num período de 28 meses (Csajka e col, 2003). Apenas 2 indivíduos receberam 800 mg OD de EFV. Aos restantes foram prescritos 600 mg OD e a supressão viral (definida  $\leq 400$  cópias/mL) foi conseguida em 67% dos indivíduos. Os autores provaram a existência de correlação entre a concentração do fármaco e carga viral ( $p=0,003$  e  $r=0,14$ ) e corroboraram o valor para a CEM descrito em 2001.

Langmann e colaboradores (2002) monitorizaram as concentrações plasmáticas de EFV em 33 indivíduos com experiência ARV (pelo menos 3 esquemas HAART anteriores), durante 3 meses. Neste estudo, as amostras de sangue para a quantificação de EFV foram colhidas 8 a 20 horas após a toma. A concentração plasmática mediana do fármaco nos indivíduos que mantiveram supressão viral (carga viral  $< 20$  cópias/mL) (72%) foi 2,168 mg/L. Os autores sugeriram que uma única determinação inferior a 1 mg/L parece preditivo de falência terapêutica e desenvolvimento de resistência genotípica.

Outros autores observaram um maior número de falências com valores de  $C_{min}$  inferiores a 1,1 mg/L (Van Leth e col, 2006).

Um estudo prospectivo em 68 indivíduos (44 eram homens e a idade média foi  $40 \pm 9$  anos) investigou a relação entre as concentrações plasmáticas de EFV e os efeitos clínicos (Stähle e col, 2004). As amostras foram colhidas 10 a 24 horas após a toma de EFV. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos, respondedores e não-respondedores: o critério carga viral  $\geq 50$  cópias/mL ditou os não-respondedores. A concentração de 7  $\mu\text{mol/L}$  (2,2 mg/L) de EFV permitiu uma separação máxima ( $p < 0,05$ ) entre respondedores (30 em 45 indivíduos tinham concentrações superiores a 2,2 mg/L) e não respondedores (10 em 13 indivíduos tinham concentrações inferiores a 2,2 mg/L). Os autores sugeriram o valor 2,2 mg/L para a CEM.

González de Requena e colaboradores (2004) apresentaram um estudo prospectivo, conduzido em 48 indivíduos que não responderam ao esquema HAART incluindo NVP. A NVP foi substituída por EFV, mantendo o esquema concomitante de 2 NRTIs. A carga viral e as concentrações plasmáticas de EFV (tempo mediano de colheita de amostras de 12 horas após a toma do fármaco) foram analisadas nos 3 meses seguintes. Num sub-grupo de 35 indivíduos foram realizados testes genotípicos, sendo que 83% apresentavam uma ou mais mutações que conferem resistência aos NNRTI. Os autores mostraram que os objectivos da terapêutica foram atingidos (queda na carga viral superior a 1  $\log_{10}$  ou carga viral inferior a 50 cópias/mL) em 43% dos indivíduos; apesar da elevada frequência de mutações. A concentração plasmática do fármaco nos respondedores (3,6 mg/L) foi superior ( $p=0,027$ ) aos não respondedores (2,7 mg/L). Entre indivíduos infectados com estirpes virais com mutações que conferem resistência aos NNRTI, a frequência de respondedores foi superior nos indivíduos com concentrações de EFV superiores a 3 mg/L (75%), comparativamente com aqueles em que as concentrações não ultrapassaram os 3 mg/L (22%). Estes resultados permitiram aos autores questionar a importância de aumentar a concentração plasmática na presença de uma ou mais mutações que conferem resistência ao EFV, apesar da sua baixa barreira genética.

### ***A toxicidade do SNC está relacionada com a concentração plasmática do EFV?***

A concentração plasmática de EFV na perspectiva da sua associação com manifestações de toxicidade a nível do SNC foi motivo de diferentes estudos (Marzolini e col, 2001; Núñez e col, 2001; Csajka e col, 2003; Gallego e col, 2004; Haas e col, 2004; Stähle e col, 2004; Clifford e col, 2005; Fúmaz e col, 2005; Gutiérrez e col, 2005; Kappelhoff e col, 2005; Mathiesen e col, 2006; Moltó e col, 2007; Takahashi e col, 2007).

Cerca de 20-40% dos indivíduos tratados com EFV apresentam efeitos secundários a nível do SNC associados a níveis plasmáticos elevados (superiores a 4,0 mg/L) do fármaco (Marzolini e col, 2001). Reacções de toxicidade a nível do SNC foram descritas por 15% dos indivíduos

no trabalho de Csajka e colaboradores (2003). No entanto, apesar de não encontrarem qualquer correlação com as concentrações plasmáticas do fármaco, os autores reafirmaram o intervalo de concentrações entre 1 e 4 mg/L como janela terapêutica para o EFV, como sugerido anteriormente pelo mesmo grupo em 2001 (Marzolini e col, 2001).

Também Núñez e colaboradores (2001) seleccionaram indivíduos tratados com EFV que apresentavam distúrbios a nível do SNC e mediram as concentrações plasmáticas do fármaco. Neste grupo de indivíduos, o valor de concentração média de EFV (4,9 mg/L) e a frequência de valores de concentração  $\geq 3,5$  mg/L (87%) foram superiores aos encontrados em indivíduos medicados com EFV mas sem manifestar sintomas de toxicidade (média 3,7 mg/L, 47% com concentração  $\geq 3,5$  mg/L). Os autores sugeriram que concentrações  $\geq 3,5$  mg/L representam um factor de risco para o desenvolvimento de toxicidade a nível do SNC.

No estudo do grupo de Gallego (2004) foram diagnosticadas insónias em 13 dos 18 indivíduos medicados com EFV há mais de 12 semanas. Neste grupo, a concentração plasmática do fármaco ( $4,3 \pm 2,9$  mg/L), aproximadamente 12 horas após a toma, foi superior à encontrada nos restantes indivíduos ( $2,7 \pm 0,7$  mg/L). Os autores concluíram que o ajuste da dose de EFV, para manter valores de concentração do fármaco inferiores a 4,0 mg/L, pode atenuar os distúrbios do sono associados à sua utilização.

Clifford e colaboradores (2005) estabeleceram, num período de seguimento de 24 semanas em que 6% dos indivíduos descontinuaram EFV por efeitos neurológicos, uma associação entre a manifestação destes efeitos e a concentração de EFV. Esta associação foi apenas observada na primeira semana de tratamento ( $p=0,04$ ).

Fúmaz e colaboradores (2005) estudaram a frequência de desordens neuropsiquiátricas e a sua relação com as concentrações plasmáticas de EFV e não encontraram qualquer associação.

Ainda no mesmo ano, foi apresentado à comunidade científica por Gutiérrez e colaboradores (2005), um estudo longitudinal (18 meses) em indivíduos com carga viral inferior a 50 cópias/mL. Treze indivíduos, entre os 17 que foram incluídos, completaram o estudo. A concentração plasmática nos 10 indivíduos que apresentaram manifestações de sintomas neuropsiquiátricos ( $5,10 \pm 2,15$  mg/L) foi superior ( $p=0,025$ ) aos que não as manifestaram ( $2,79 \pm 1,31$  mg/L). Os autores concluíram que indivíduos com concentrações de EFV elevadas têm um risco acrescido de efeitos adversos a nível do SNC, a longo-termo, e sugerem a realização de novos estudos para determinar se a TDM decresce o número de indivíduos que manifestam estes efeitos adversos, mantendo as respostas eficazes.

Apesar da controvérsia (Csajka e col, 2003; Stähle e col, 2004; Fúmaz e col, 2005; Kappelhoff e col, 2005; Moltó e col, 2007), devendo salientar-se que alguns destes autores auto-criticam o trabalho por serem estudos não desenhados para aceder a este objectivo (Fumáz, 2005; Moltó e col, 2007), a importância da TDM na diminuição de manifestações de toxicidade em

indivíduos com concentrações plasmáticas de EFV elevadas por reduções de dose, foi demonstrada nos anos posteriores (2007) por Gatanaga e colaboradores. Neste estudo prospectivo foram seleccionados indivíduos com concentrações plasmáticas de EFV superiores a 6 mg/L e foi observada uma melhoria dos efeitos adversos relacionados com o SNC com a redução da dose. Este estudo mostra, de uma forma elegante, a interligação entre farmacogenética e PK/PD: indivíduos que, pela presença de um polimorfismo no isoenzima CYP2B6, apresentavam concentrações plasmáticas de EFV elevadas e manifestações de efeitos tóxicos a nível do SNC associados a estas concentrações.

O estudo 2NN com inclusão de 65 centros ocorreu entre Fevereiro de 2000 e Junho de 2001 com o objectivo de comparar a eficácia e segurança de esquemas contendo NVP, EFV ou ambos e estavudina (d4T) + lamivudina (3TC) (Kappelhoff e col, 2005; van Leth e col, 2006). Não foi encontrada correlação entre a concentração de EFV e efeitos secundários no SNC.

***2. A janela terapêutica do fármaco deve estar definida e ser um intervalo estreito, ou seja, deve existir uma diferença pequena entre a CEM e CTM.***

Na aplicação da TDM, a concentração obtida num indivíduo é comparada com um valor ou um intervalo de referência (janela terapêutica). Se a janela terapêutica de um fármaco for abrangente, todos os indivíduos, alcançarão uma concentração considerada óptima após a toma da mesma dose de fármaco, apesar da variabilidade interindividual nas concentrações.

Como referido anteriormente, no estudo observacional de Marzolini e colaboradores (2001), as concentrações plasmáticas de EFV foram associadas com a probabilidade de conseguir supressão viral e ocorrerem efeitos secundários, o que permitiu aos autores construir curvas concentração-eficácia e concentração-toxicidade e definir a janela terapêutica 1-4 mg/L. Apesar da controvérsia a respeito de que valor utilizar como CEM e CTM, como foi discutido nos dois pontos anteriores, esta é a janela terapêutica aceite pelas recomendações internacionais para a TDM de ARV (Kappelhoff e col, 2004; La Porte, 2006).

Vários estudos observacionais, que visaram conhecer a importância da TDM de NNRTI e PI, mostram a frequência de valores sub-terapêuticos (12-30%) (Alexander e col, 2003; de Maat e col, 2003; Moltó e col, 2007; Ren e col, 2007). No estudo de Moltó e colaboradores (2007) foi sugerido que apenas 36% dos casos se podem explicar por falta de adesão e de Maat e colaboradores apontaram 76% dos casos como sendo injustificáveis (de Maat e col, 2003). Entre os indivíduos com carga viral detectável foram encontrados valores sub-terapêuticos em 32 a 50% dos indivíduos (Marzolini e col, 2001; Duong e col, 2004; Rendón e col, 2005).

Entre os pedidos de TDM por suspeita de reacção tóxica associada à concentração de NNRTI, 24% (Duong e col, 2004) a 36% (Rendón e col, 2004) tinham concentração elevada.

A frequência de concentrações de ARV fora da janela terapêutica variou entre os 26% (Duong e col, 2004) e 32% (Moltó e col, 2007), sendo mais comum para os NNRTI (48%) que para PI (14%) (Moltó e col, 2007).

**3. *A variabilidade interindividual nas concentrações do fármaco deve ser maior que a janela terapêutica.***

A existência de uma grande variabilidade nas concentrações plasmáticas alcançadas por diferentes indivíduos após a exposição ao fármaco em estado estacionário foi uma das grandes impulsionadoras da aplicação da TDM aos ARV (Back e col, 2002). A concentração plasmática quantificada em indivíduos a receber a mesma dose de um ARV pode variar mais de 10 vezes (Back e col, 2002; de Maat e col, 2003; Moltó e col, 2007; Ivanovic e col, 2008). Dado que esta variabilidade nas concentrações entre os diferentes indivíduos conduz a variabilidade no efeito observado, o sucesso terapêutico não é alcançado por todos os indivíduos.

A variabilidade interindividual nas concentrações de EFV e os factores que podem estar na sua origem foram objecto de estudo nesta dissertação (Capítulo 2).

**4. *Variabilidade intra-individual nas concentrações do fármaco: se a concentração de um fármaco no mesmo indivíduo varia sem motivo aparente, torna-se pouco exequível o ajuste da dose com base numa única medição, pelo que, para um fármaco em estado estacionário, se espera que a variação intra-individual nas concentrações seja baixa.***

Uma variabilidade intra-individual elevada pode reduzir o valor preditivo das concentrações. Uma adesão inconstante (o fármaco não está em estado estacionário), interacções com outros fármacos ou alimentos e imprecisões na indicação da hora da última toma do fármaco podem contribuir para o seu aumento. Por outro lado, alguns fármacos ARV exibem um efeito circadiano significativo, sendo as concentrações da manhã diferentes das do final da tarde, e a PK pode variar ao longo do ciclo menstrual (Back e col, 2002). A variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas é superior nos PI (44 a 48%, Khoo e col, 2006; Nettles e col, 2006) que nos NNRTI (25%, Khoo e col, 2006; Nettles e col, 2006).

O estudo da variabilidade intra-individual das concentrações de EFV foi objecto de estudo do Capítulo 3 desta dissertação.

**5. Não existem outros parâmetros clínicos ou laboratoriais de quantificação mais simples que permitam o acesso ao efeito.**

A monitorização da infecção é crítica no auxílio da interpretação de um clínico no porquê de uma não resposta à HAART e na optimização do tratamento. No que respeita à eficácia da terapêutica, a carga viral e a contagem de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> permitem monitorizar e guiar a terapêutica: definir início e a necessidade de considerar alterações. A redução da carga viral e o aumento do número de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, ou ambos, estão associadas a um retardar da progressão clínica da doença. Isto implica que se possa aceder ao prognóstico, usando a resposta dos marcadores virológicos e imunológicos. Os indivíduos em tratamento com HAART devem monitorizar as cargas virais e a contagem de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> em intervalos regulares. Estas afirmações incitam a questão: Se existe uma forma de medir e avaliar o efeito para quê medir a concentração do fármaco?

De facto, existe uma forma simples de avaliar o efeito e uma concentração por si só não tem grande significado, *eg.*, o indivíduo não responde à terapêutica e se ajusta a dose por suspeita de exposição sub-óptima, para se avaliar a resposta após o ajuste é necessário avaliar estes marcadores. No entanto, uma limitação destes marcadores é a sua variação lenta. Pode demorar meses para que o efeito esperado do tratamento (ou a sua ausência) seja observado. Os efeitos na carga viral ou na contagem de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> obtidos numa fase inicial do tratamento não são garantia de uma resposta a longo termo e a concentração necessária para o decréscimo inicial da carga viral pode não ser suficiente para uma resposta mantida (Le Moing e col, 2003). Nalguns casos, um indivíduo pode ter concentrações sub-óptimas durante meses e as consequências serem apenas contabilizadas quando ocorre falência (Le Moing e col, 2003). Este facto mostra, por si só, que estes marcadores estão longe de conseguir uma boa monitorização da terapêutica e justificam a necessidade de monitorizar as concentrações do fármaco. Esta variação lenta não é o único factor. Estes marcadores não dão indicação sobre a possibilidade de se desenvolverem resistências por subexposição, não têm potencial preventivo, nem permitem avaliar a possibilidade de diminuir a dose em caso de toxicidade associada a concentrações tóxicas.

**6. Possibilidade de intervenção:** *a capacidade de intervir em casos de concentração insuficiente ou excessiva é essencial.*

O EFV apresenta-se em cápsulas de 50 mg e 200 mg, comprimidos de 600 mg e suspensão oral 30 mg/mL, o que permite o ajuste de dose.

7. **Métodos analíticos para a quantificação das concentrações de ARV** por técnicas *standard* e na matriz desejada, rápidos e sem custos excessivos são necessários para a realização da TDM. A qualidade dos resultados obtidos por estes métodos deverá ser assegurada por um programa de Avaliação Externa da Qualidade realizado por entidades reconhecidas e acreditadas.

O Capítulo 1 desta dissertação aborda o desenvolvimento e a validação de métodos utilizados para a quantificação da concentração plasmática de ARV.

## **Limitações da aplicabilidade da monitorização terapêutica ao Efavirenz**

Apesar da TDM para o EFV ser hoje considerada um *standard of care* em alguns países (Burger e col, 2006; Yeni e col, 2006; Gazzard e col, 2008; Josephson e col, 2009) existem alguns motivos de discussão ou limitações a respeito da sua relevância que passamos a referir.

**A TDM não beneficia o tratamento para os NRTI.** Os NRTI são pró-fármacos: a fracção activa dos NRTI é obtida por fosforilação intracelular, podendo as concentrações plasmáticas não estar necessariamente relacionadas com a eficácia. Todos os processos metabólicos necessários à activação intracelular representam uma fonte de variabilidade na concentração associada à célula. Estas concentrações intracelulares não se correlacionam normalmente com as concentrações plasmáticas (Burger e col, 2002), o que retira a importância da quantificação das últimas, apesar de alguns autores terem sugerido o benefício do seu controlo (Fletcher e col, 2000). O benefício de TDM com concentrações intracelulares de NRTI foi sugerido por vários autores, no entanto, os métodos para a sua aplicação não são compatíveis com uma rotina (Fletcher e col, 2000). Contudo, a relação entre a concentração de EFV e a resposta à terapêutica descrita, permite sugerir que medição de um único componente do esquema HAART contribui para uma melhor resposta.

**Na TDM são medidas as concentrações plasmáticas totais, não discriminando a fracção livre.** Contudo, é a fracção não ligada que exerce o efeito terapêutico. O fármaco disponível para o local de acção depende da ligação às proteínas plasmáticas.

**O número de estudos controlados aleatorizados para atestar a utilidade da TDM destes fármacos é diminuto.** Estes trabalhos têm limitações e os resultados são contraditórios. O número de indivíduos medicados com EFV incluídos é muito reduzido e não existe nenhum estudo desenhado com o objectivo de avaliar o benefício do TDM de EFV.

O conceito de ensaios com concentrações controladas foi introduzido para limitar a influência da variabilidade nas concentrações plasmáticas, na variabilidade da resposta (Sanathan e

Peck, 1991). Em oposição aos ensaios *standard*, em que todos os indivíduos recebem uma dose fixa, nos ensaios com concentrações controladas, os indivíduos podem receber ajustes de dose, caso apresentem concentrações fora de um intervalo de concentrações previamente estabelecido. Por outras palavras, os indivíduos são distribuídos aleatoriamente para uma gama de concentrações em vez de para uma determinada dose.

Não existe nenhum estudo desenhado com o objectivo de avaliar o benefício da TDM para a resposta à terapêutica com EFV: apenas quatro estudos incluíram indivíduos medicados com este ARV (Tabela 2). As conclusões destes estudos não foram retiradas por fármaco, mas sim ao conjunto de ARV incluídos. O número de indivíduos medicados com EFV é muito reduzido e as concentrações alvo estabelecidas e o parâmetro PK usado são muito variáveis (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resumo de estudos aleatorizados que visaram avaliar o benefício da monitorização terapêutica (TDM) de fármacos anti-retrovirais e que incluíram Efavirenz (EFV).

Autores	Nº total indivíduos	Experiência Anti-retroviral anterior	Nº de indivíduos EFV +TDM	CEM para EFV (mg/L)	CTM para EFV (mg/L)	Parâmetro PK
Bossi e col, 2004	134	Sim	4	1,1	6	Amostra de sangue obtida 12 horas após toma de EFV ( $C_{12}$ )
Torti e col, 2005	230	Sim	16	2,2	NE	$C_{\text{vale}}$
Khoo e col, 2006	122	Não	51	1,2	4	Amostra colhida mais de 4 horas após toma e $C_{\text{vale}}$ projectado a partir desta amostra aleatória usando regressão linear baseada num tempo de semi-vida de eliminação de 36 h
Best e col, 2007	199	Não	43	2,3	NE	$C_{\text{vale}}$ , $C_2$ e $C_4$

CEM: concentração eficaz mínima. CTM: Concentração tóxica mínima. Nº: número. NE: não especificado.

Existem descritos sete ensaios clínicos aleatorizados e controlados desenhados para avaliar o benefício da TDM de ARV na resposta à terapêutica. Estes estudos foram realizados entre 2002 e 2007 em vários países: Holanda (Burger e col, 2003; Crommentuyn e col, 2005), França (Clevenbergh e col, 2002; Bossi e col, 2004), Estados Unidos da América (Fletcher e col, 2002; Best e col, 2007) e Itália (Torti e col, 2005).

Na maioria dos estudos referidos, à data da inclusão dos indivíduos, as *guidelines* com o melhor método para a medição das concentrações de fármacos, com a definição de janelas terapêuticas e parâmetro PK a medir não existiam e por isso os diferentes estudos usaram diferentes janelas terapêuticas e diferentes parâmetros PK. As primeiras *guidelines* para a monitorização terapêutica de ARV foram apresentadas por David Back em 2003. Estas *guidelines* são baseadas em dados PK/PD para indivíduos a receber tratamento pela primeira vez. Os estudos para a definição de janelas terapêuticas para indivíduos com experiência ARV prévia são ainda hoje muito reduzidos.

Entre os ensaios que não viram benefício da TDM para resposta à terapêutica, dois deles são franceses (Clevenbergh e col, 2002; Bossi e col, 2004), onde as *guidelines* encorajam a realização de TDM (Yeni e col, 2006), sendo a comunidade científica deste país das mais entusiastas e participativas. Ambos os estudos tiveram uma curta duração, de apenas 12 semanas, e neste intervalo de tempo é difícil avaliar a resposta à terapêutica, não reflectindo um período com grande significado clínico para aceder a resposta virológica. No entanto, foi considerado não ético manter os indivíduos privados de TDM por um período superior a 12 semanas, o que mostra a dificuldade de estudar o TDM em países que já incorporaram esta intervenção na sua prática clínica.

Os dois estudos favoráveis ao TDM (Fletcher e col, 2002; Burger e col, 2003) foram realizados em indivíduos a receber HAART pela primeira vez, medicados com os PI indinavir (IDV) ou nelfinavir (NFV), na altura em que os esquemas não incluíam o RTV como *booster* e não se podem transpor para a actualidade.

A terapêutica ARV é uma intervenção eficaz e como tal, qualquer outra intervenção para a melhorar, *eg.* a TDM, requer estudos de grande dimensão para mostrar adequadamente o seu benefício. Khoo e col (2006) estimaram um número de 1000 indivíduos necessário de forma a obter poder estatístico para mostrar os benefícios do TDM. Este número foi calculado com uma estimativa de 30% de indivíduos com concentrações indesejáveis, assumindo que a modificação da dose é bem sucedida em 100% dos indivíduos e que a adesão dos clínicos à recomendação do ajuste de dose é superior a 75%.

A adesão por parte dos clínicos às recomendações da avaliação de TDM foi também uma limitação na maioria dos estudos. O estudo inglês (Khoo e col, 2006) auto-critica a falta de poder estatístico da sua amostra e aponta para uma baixa adesão dos clínicos ao ajuste de

dose. No estudo mais recente (Best e col, 2007) as recomendações foram seguidas pelos clínicos em 76%, mas foi inferior a 35% noutros estudos (Clevenbergh e col, 2002; Bossi e col, 2004; Torti e col, 2005; Khoo e col, 2006). Este factor associado ao número de indivíduos que realmente apresentam concentrações não-óptimas, à indefinição de aspectos práticos relativos *eg.* a concentrações alvo, à dimensão da amostra necessária, ao custo inerente, mostram a dificuldade de comprovar a eficácia da TDM num estudo aleatorizado, mesmo em países onde ainda não exista uma indicação estrita para a aplicação da TDM aos ARV.

Estes factores têm, recentemente, direccionado os estudos para mostrar o benefício do TDM através da identificação de populações com maior risco de alcançar concentrações muito elevadas ou muito baixas (Best e col, 2007; Gatanaga e col, 2007; Katsounas e col, 2007; Ren e col, 2007). O estudo BEST, *eg.*, foi desenhado para identificar indivíduos com maior propensão para adquirir concentrações fora da janela terapêutica e identificou o uso de EFV, do PI boosted lopinavir e o peso dos indivíduos como factores preditivos independentes de concentrações indesejáveis (Best e col, 2007).

### ***Potenciais cenários de aplicabilidade da monitorização terapêutica de fármacos ao Efavirenz***

Apesar das questões em aberto, a aplicação clínica da TDM ao EFV foi-se definindo ao longo do tempo de elaboração desta dissertação e é actualmente recomendada nas seguintes situações:

**Populações especiais.** Estudos recentes indicam claramente a necessidade de aplicação da TDM ao fármaco em crianças (von Hentig e col, 2006; Ren e col, 2007). Também sub-grupos de indivíduos, com doença hepática podem estar em risco de sobre-exposição ao fármaco (Katsounas e col, 2007). Os indivíduos com disfunção hepática ou enzimas hepáticas elevados são muitas vezes excluídos dos ensaios clínicos e, portanto, pouco é conhecido sob o comportamento do EFV nestes indivíduos. Por outro lado, mais de 1/3 dos indivíduos VIH positivos são co-infectados por vírus da hepatite C (VHC). A presença deste vírus é uma das maiores causas de doença hepática e a disfunção hepática conduz a alterações na actividade enzimas envolvidos no metabolismo destes fármacos (Frye e col, 2006), que varia mediante o enzima envolvido e que pode levar a toxicidade dependente da concentração. Este assunto será abordado no Capítulo 5 desta dissertação.

**Ausência de resposta à terapêutica.** Indivíduos com elevada adesão à terapêutica e que apresentam um efeito deficitário, ou que, apresentando uma boa resposta inicial, esta não se mantém podem também beneficiar da TDM. No caso dos NNRTI, uma única mutação pode

conferir resistência, o aumento da dose nestas situações pode não ser de grande benefício, apesar deste hipótese ter sido questionada por González de Requena e colaboradores (2004).

**Interações medicamentosas.** A quantificação da concentração do ARV é recomendada quando um novo fármaco é adicionado ou retirado para evitar concentrações sub-ótimas ou toxicidade. Como referido anteriormente, o EFV é substrato dos CYP2B6 e 3A4 e indutor do seu próprio metabolismo (Adkins e Noble, 1998; Smith e col, 2001; Ward e col, 2003). Estes isoenzimas incluem cerca de 60% das reações de fase I do metabolismo dos fármacos (Wang e Tompkins, 2008), o que mostra o potencial para interações clinicamente significativas (Ma e col, 2005; Walubo, 2007). Algumas destas interações ultrapassam o controlo da actividade assistencial, como os fármacos sem prescrição e os produtos naturais (Ivanovic e col, 2008) e as interações com alimentos (Nerad e col, 2003). O impacto das interações medicamentosas tende, provavelmente, a alargar-se num futuro próximo, dado o envelhecimento destes indivíduos e o facto de na população geriátrica a polimedicação ser mais frequente (Justesen, 2006).

**A TDM pode revelar situações de não-adesão.** A estrutura complexa destes esquemas HAART envolve um elevado risco de interações medicamentosas e efeitos secundários, o que pode reduzir drasticamente a qualidade de vida destes indivíduos e a possibilidade de sucesso terapêutico (Trotta e col, 2002), tornando-se um factor decisivo na interrupção da terapêutica. Uma vez diminuída a adesão a possibilidade de ocorrência de concentrações sub-terapêuticas é acrescida o que, aliado à rápida cinética da replicação viral combinada com a grande taxa de erros de transcrição cometidos pelo transcriptase reversa pode garantir o aparecimento de vírus resistentes ao fármaco. A TDM foi apontada como um dos métodos para avaliar a adesão à terapêutica, ao fornecer uma prova concreta da presença do fármaco em circulação (Hugen e col, 2002). No entanto, ao usar a TDM para investigar a adesão é importante reconhecer que a concentração não indica necessariamente um bom grau de adesão, mas apenas que o fármaco foi tomado recentemente. Se um indivíduo sabe que vai ser monitorizada a concentração do fármaco adere à terapêutica nos dias anteriores, embora possa não o fazer regularmente (Podsadecki e col, 2008). As concentrações baixas do fármaco podem ter causas comportamentais ou PK, ou ambas, mas o relevante é que permitem avançar a possibilidade de falência terapêutica (Back e col, 2002).

## ***Objectivo geral***

O objectivo geral deste trabalho foi contribuir para otimizar a resposta à terapêutica anti-retroviral e o seu impacto na qualidade de vida do indivíduo infectado pelo VIH. Pretendeu-se definir se o NNRTI, EFV, cumpria os requisitos para ser monitorizado na prática clínica, estabelecer as condições para a sua eventual monitorização e simultaneamente investigar outras acções farmacodinâmicas do EFV em terapêuticas prolongadas.

## ***Objectivos específicos***

1. Instalação e validação de um método de quantificação de concentrações de PI e NNRTI em plasma de indivíduos infectados pelo VIH com vista à sua monitorização.
2. Propor procedimentos operativos para a monitorização terapêutica do EFV, em geral e em grupos particulares de indivíduos. Investigar qual a variabilidade inter e intra-individual nas concentrações plasmáticas de EFV, análise de eventuais factores que poderiam justificar essa variabilidade e contribuir para a definição da janela terapêutica deste fármaco.
3. Estudar acções farmacodinâmicas do EFV, a longo prazo, em doentes infectados pelo VIH e da sua eventual relação com as concentrações plasmáticas do fármaco.

# Desenvolvimento, otimização e validação de métodos para a quantificação de fármacos anti-retrovirais

## 1.1 Introdução

A realização de estudos PK dos ARV e o crescente interesse na TDM destes fármacos conduziu inevitavelmente à necessidade da sua bio-análise. O crescente investimento na quantificação das concentrações destes fármacos pela comunidade científica pode ser expresso pelo número de publicações posteriores ao trabalho de Moyer e colaboradores (1999): *Drug Monitoring of Anti-retroviral Therapy for HIV-1 infection: Method Validation and Results of a Pilot Study*. Nos 7 anos posteriores, uma pesquisa realizada na biblioteca *PubMed.com* com os termos *anti-retroviral plasma concentrations* forneceu-nos 503 artigos e 62 revisões e seleccionando os termos *HIV therapeutic drug monitoring*: 640 manuscritos e 190 artigos de revisão.

Na introdução geral foram revistos os critérios que adjudicam a TDM aos fármacos ARV, com especial ênfase destinado ao EFV. Entre eles, englobam-se os de teor analítico: é necessária a disponibilidade de um método sensível e selectivo, com exactidão e precisão maximizadas, que requeira pequenos volumes de amostra e associado a baixos custos e tempo de execução.

O método deve permitir a quantificação simultânea de fármacos que se associam ao EFV. Em indivíduos com experiência terapêutica prévia, para obter uma supressão viral mantida, são muitas vezes prescritas combinações que englobam 2 PI ou 1 PI + 1 NNRTI. Bons exemplos são os esquemas HAART que incluem LPV/RTV + EFV. Perante a necessidade recorrente de avaliar a concentração destas associações de PI ou PI + NNRTI pode assumir-se que, se for utilizada uma única corrida de HPLC, o tempo gasto para estas determinações é inferior ao necessário para medir cada um destes fármacos individualmente. Dado o número crescente de combinações de fármacos passíveis de serem administradas, a disponibilidade de um método capaz de quantificar as concentrações plasmáticas dos PI e dos NNRTI numa só corrida analítica surge como uma ferramenta de importância vital.

Como referido na introdução geral, os NRTI requerem activação por fosforilação intracelular e a sua actividade anti-VIH relaciona-se preferencialmente com a concentração intracelular. A quantificação intracelular dadas as técnicas e custos envolvidos não é compatível com a TDM.

## **1.2 Enquadramento e Objectivos**

Este capítulo consiste na descrição sucinta das metodologias desenvolvidas e validadas para a quantificação de concentrações de PI e NNRTI, em plasma de indivíduos infectados pelo VIH. Cada um destes métodos, devido à elevada exactidão exigida pela sua futura aplicação clínica, quer em estudos PK, quer na TDM, requer ser optimizado e validado através de um controlo de qualidade interno e uma avaliação externa por um laboratório conceituado que vise o controlo da qualidade deste tipo de análises.

## **1.3 Métodos e Resultados**

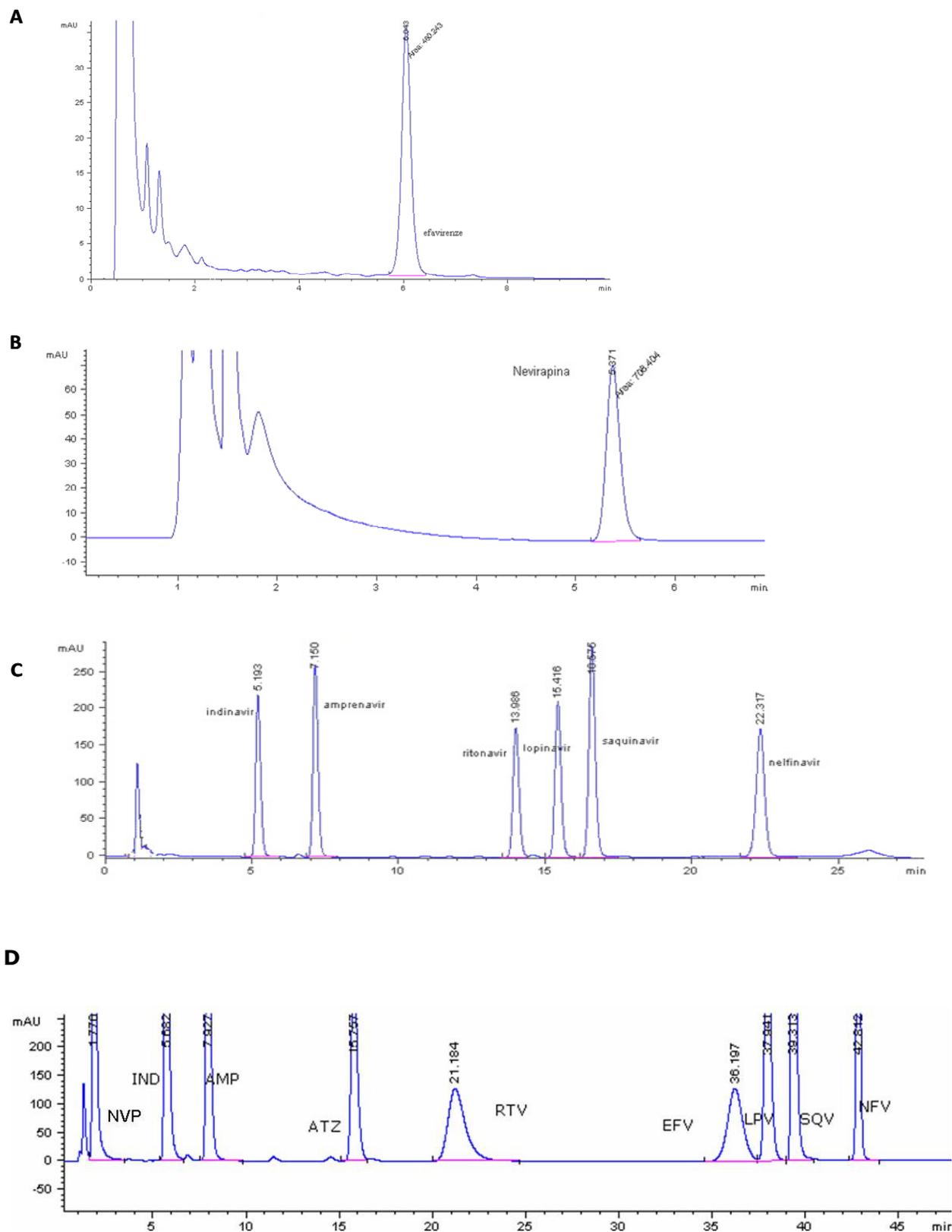
O trabalho apresentado neste capítulo consistiu no desenvolvimento de métodos para a quantificação das concentrações plasmáticas de ARV por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC): 1) para quantificação de EFV; 2) para a quantificação de NVP e 3) para a quantificação de seis PI: amprenavir (APV), IDV, RTV, LPV, saquinavir (SQV) e NFV. No ano de 2005, foi desenvolvido um método que permitiu a quantificação dos PI e NNRTI comercializados à data, incluindo de novo o PI atazanavir (ATZ), num total de 9 fármacos numa única corrida analítica.

A Tabela 3 apresenta uma descrição sumária do modo de preparação das amostras e alguns parâmetros cromatográficos de cada uma das metodologias que, no âmbito da presente dissertação, foram desenvolvidas, optimizadas e validadas no Laboratório de Farmacologia. Estas metodologias foram utilizadas nos diferentes estudos realizados (Capítulos 2 a 6) e na rotina da TDM. Todos os métodos descritos incluem um passo anterior ao tratamento da amostra, que consiste na inactivação do vírus por aquecimento a 60 °C, durante uma hora. Os padrões e controlos foram preparados por adição, ao plasma de voluntários saudáveis, de soluções *stock* obtidas por diluição de cada um dos fármacos em metanol. Estes métodos foram validados internamente, segundo critérios previamente definidos e baseados em recomendações obtidas na literatura (Shah e col, 1991). Na Figura 6 estão representados os cromatogramas-tipo obtidos para a análise de um padrão por cada um dos métodos referidos. Cada um deles foi comparado com cromatogramas de 6 amostras de plasma de seis voluntários saudáveis.

**Tabela 3.** Resumo das características das diferentes metodologias desenvolvidas no presente trabalho para a quantificação das concentrações plasmáticas de fármacos anti-retrovirais.

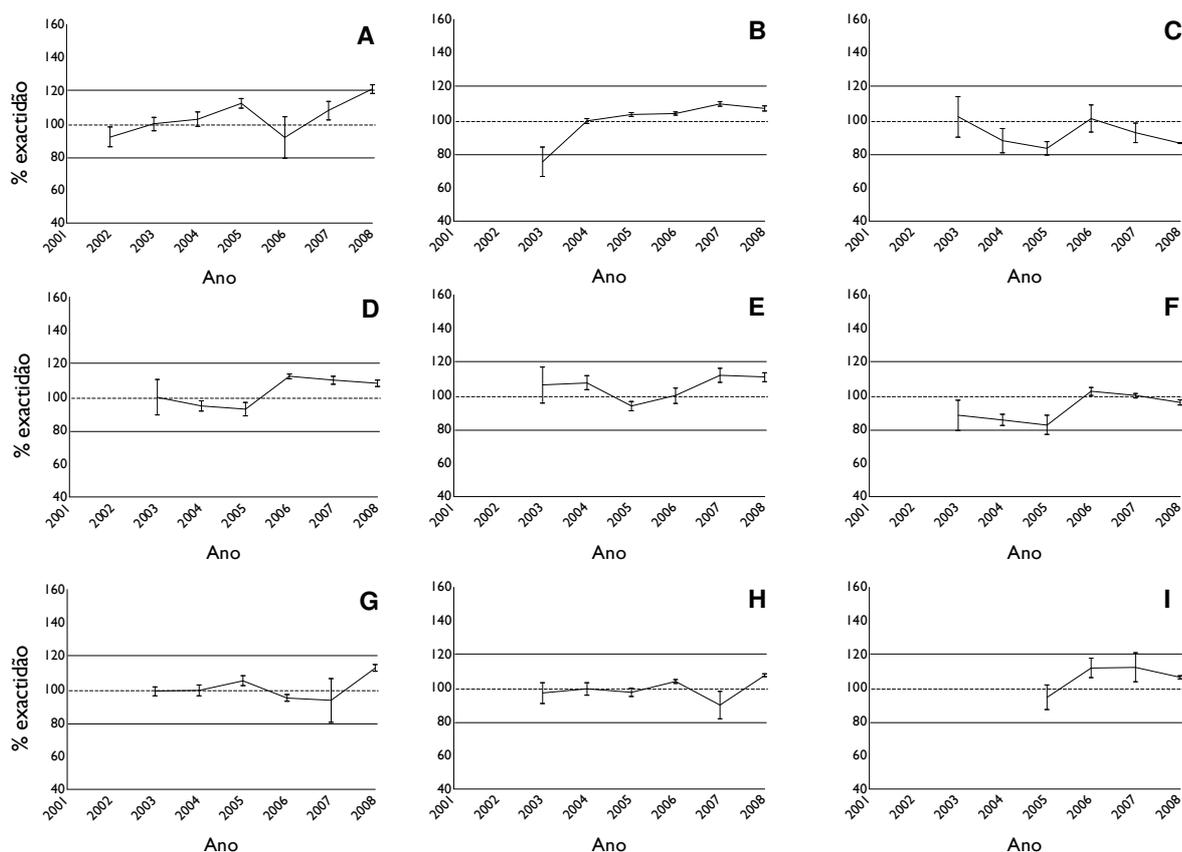
Fármaco	Plasma (mL)	Pré-tratamento da amostra	Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Tempo de corrida (min)
EFV <b>Figura 6A</b>	0,25	Precipitação (acetoneitrilo) Evaporação (N <sub>2</sub> 100%, 40 °C) Tempo de preparação de 12 amostras: 4-5 h	C18 Dimensão 125x4 mm Poros 5 µm	Isocrático 1,5 mL/min Acetoneitrilo KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM pH 7,5 50:50 (v/v)	246	10
APV IDV RTV LOP SQV NFV <b>Figura 6C</b>	0,4	Extracção Líquido-Líquido (pH básico) Lavagem (hexano) Evaporação (N <sub>2</sub> 100%, 40 °C) Tempo de preparação de 12 amostras: 3-4 h	C18 Dimensão 150x3,9 mm Poros 5 µm	Gradiente 1,0 mL/min Acetoneitrilo KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM pH 6,7	210	28
NVP <b>Figura 6B</b>	0,2	Precipitação (Ácido perclórico 3,5%) Tempo de preparação de 12 amostras: 1-2 horas	C18 Dimensão 150x3,9 mm Poros 5 µm	Isocrático 1,0 mL/min Acetoneitrilo KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM pH 6,0 20:80 (v/v)	282	7
NVP EFV APV IDV ATZ RTV LOP SQV NFV <b>Figura 6D</b>	0,4	Extracção Líquido-Líquido (pH básico) Lavagem (hexano) Evaporação (N <sub>2</sub> 100%, 40 °C) Tempo de preparação de 12 amostras: 3-4 h	C18 Dimensão 150x3,9 mm Poros 5 µm	Gradiente 1,0 mL/min Acetoneitrilo KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM pH 6,4	210	48

APV: amprenavir. ATZ: atazanavir. EFV: efavirenz. IDV: indinavir. LPV: lopinavir. NFV: nelfinavir. NVP: nevirapina. RTV: ritonavir. SQV: saquinavir. O volume de plasma corresponde ao volume de plasma de cada indivíduo necessário para a quantificação do(s) fármaco(s).



**Figura 6.** Cromatograma-tipo obtido a partir de soluções padrão para a quantificação de **A.** efavirenz, **B.** nevirapina, **C.** seis inibidores de protease e **D.** dois inibidores da transcriptase reversa (EFV: efavirenz e NVP: nevirapina) e sete inibidores de protease (IDV: indinavir, AMP: amprenavir, ATZ: atazanavir, RTV: ritonavir, LPV: lopinavir, SQV: saquinavir e NFV: nelfinavir).

Cada uma das metodologias descritas foi submetida a uma validação externa (Figura 7) realizada por uma entidade independente holandesa (KKGIT) integrada no programa *International Interlaboratory Quality Control Program for Therapeutic Drug Monitoring in HIV Infection* que se iniciou em 2001, com 17 laboratórios, e abrangia mais de 50 laboratórios em Julho de 2008. Na Figura 7 estão representados os resultados obtidos, pelo nosso Laboratório de Farmacologia, na avaliação externa de qualidade realizada pelo KKGIT desde 2002 para o EFV, desde 2005 para o ATZ e desde 2003 para os restantes fármacos. Os principais objectivos deste programa são definir as fontes de erro na quantificação dos ARVs, contribuir para a optimização de métodos bio-analíticos para a quantificação destes fármacos e possibilitar a comparação de resultados entre diferentes laboratórios. Para isso, são recebidas 3 amostras de concentração desconhecida de cada um dos fármacos, normalmente uma de concentração baixa, uma de concentração média e uma de concentração elevada, mas podendo não conter um ou alguns deles. Estas amostras-teste são recebidas bi-anualmente, analisadas e os resultados são enviados com a descrição do método usado. Na figura 7 é possível observar a elevada exactidão do método de quantificação para a quantificação simultânea dos 9 ARV utilizado desde 2005.



**Figura 7.** Resultados anuais da avaliação externa da qualidade desde de 2002: Cada barra de erro representa a média e o erro padrão da média relativa a 6 concentrações-teste de cada fármaco quantificadas na avaliação anual. A linha a tracejado representa 100% de exactidão e as linhas a cheio definem o intervalo considerado válido pela entidade avaliadora KKGIT (80 a 120%). **A.** efavirenz, **B.** nevirapina, **C.** indinavir, **D.** amprenavir, **E.** nelfinavir, **F.** saquinavir, **G.** lopinavir, **H.** ritonavir e **I.** atazanavir.

## 1.4 Discussão

Na literatura estão descritas diferentes metodologias para quantificações individuais e de combinações de ARV. No laboratório de Farmacologia foi desenvolvido e validado um método para a **quantificação das concentrações plasmáticas de 9 ARV** - 2 NNRTI e 7 PI – por HPLC numa **única corrida analítica**. Os fármacos incluídos são aqueles para os quais está disponível a avaliação externa da qualidade. Este método **cobre a gama de concentrações de interesse** e presentemente está a ser utilizado na TDM destes fármacos.

Um pré-requisito importante para a TDM é desenvolver um ensaio com pouco volume de amostra de sangue. O método actualmente utilizado necessita de um **volume de plasma de 0,4 mL** de cada indivíduo. Este método de determinação simultânea **é simples e permite reduzir tempo e custos** comparativamente a utilizar técnicas de quantificação individual.

Os primeiros métodos desenvolvidos podem à primeira vista parecer ter como vantagem rapidez e representarem um menor custo em termos de reagentes para o HPLC e consumíveis do próprio aparelho (*eg.*, horas de utilização da lâmpada de ultravioleta, coluna). No entanto, o último método, apesar de ser uma corrida com 50 minutos, permite utilizar um só grupo de reagentes, material corrente de laboratório e equipamento e as mesmas condições cromatográficas para a quantificação de todos estes fármacos. Adicionalmente permite a quantificação de mais que um ARV a partir do mesmo volume inicial de plasma. Esta possibilidade é extremamente vantajosa já que **reduz o volume de plasma** necessário em indivíduos medicados com mais que um destes fármacos. Por outro lado, minimiza o tempo do operador. Dado que os extractos são estáveis à temperatura de 22 °C, estabelecida por controlo da temperatura ambiente, possibilita a leitura completamente automatizada, sem requerer supervisão, podendo decorrer durante a noite. Ao observar o cromatograma resultante da análise de uma solução padrão (Figura 6D), dadas as diferenças nos tempos de eluição dos diferentes fármacos, podem distinguir-se facilmente aqueles com menores tempos de eluição e os de separação mais tardia. Esta diferença nos tempos de retenção possibilita organizar as amostras e agrupá-las de forma a conseguir menores tempos de corrida, mediante os fármacos que se pretendem quantificar num determinado dia.

O manuseamento de amostras de plasma de indivíduos VIH positivos tem obviamente associado um risco para o operador. A inactivação por aquecimento a 60 °C mostrou ser um método eficaz para a inactivação do vírus (para uma revisão ver Aarnoutse e col, 2001a) e a ligeira influência que possa ter na degradação dos compostos foi obviada submetendo padrões e controlos às condições de inactivação aplicadas às amostras de plasma dos indivíduos.

O pré-tratamento da amostra é imperativo e envolve passos com fins específicos: previamente a um processo de extracção líquido-líquido, a amostra é alcalinizada para que os fármacos

permanecem na sua forma não ionizada, facilitando a extracção pelo solvente orgânico. Em consequência da utilização de éter na extracção e dada a sua baixa densidade, este pode ser colhido, evaporado. O resíduo sofre um processo de lavagem com hexano e posteriormente é reconstituído em fase móvel para injeção no HPLC. A lavagem com hexano é necessária para obter cromatogramas limpos e permite medir a concentração a baixo comprimento de onda de detecção (210 nm), que como consequência faculta a utilização de menores volumes de plasma.

A eluição em gradiente é necessária para obter uma boa separação: pode parecer mais complicada que a separação isocrática, mas é eleita para amostras com muitos analitos e vasto tempo de retenção. A pureza dos reagentes, o pH do tampão e o uso de tubos de vidro são também factores importantes. Dado o carácter iónico dos compostos a necessidade de tamponar o componente aquoso da fase móvel é indubitável. O facto de utilizar tampão fosfatos é uma desvantagem dado que a formação de cristais no interior da coluna, tubagens e diversos componentes do aparelho de HPLC podem levar ao seu desgaste precoce e aumenta custos de manutenção. Esta desvantagem deve ser minimizada com limpeza cuidada posterior a cada utilização.

As amostras podem ser mantidas à temperatura ambiente durante vários dias e a -20 °C durante vários meses e a 80 °C durante pelo menos um ano. Pelo menos 3 ciclos de congelação/descongelação não afectam a estabilidade das amostras de forma significativa e as soluções *stock* em metanol são estáveis durante vários meses.

As numerosas vantagens da utilização de um sistema de HPLC na análise de misturas fazem com se torne numa técnica de eleição para a TDM de ARV: apresenta uma elevada versatilidade, selectividade, reprodutibilidade e repetibilidade indispensáveis para uma quantificação que assegure o rigor e qualidade dos resultados. O facto de requerer pequenos volumes de amostra é outra das grandes vantagens desta técnica. Uma vez que permite quantificar diferentes compostos na mesma corrida analítica e o facto de possibilitar a automatização, pode também trazer grandes vantagens, especialmente a nível de tempo para o operador e rapidez de execução.

No entanto, para que se possa usufruir destas vantagens desta técnica, é requerida uma exigente manutenção. Por vezes aparecem problemas relacionados com a definição dos picos, como fenómenos de *tailing*, *fronting*, *ghost peaks*, instabilidade a nível da linha de base, contaminação, entre outros. É necessário monitorizar a eficácia da separação, identificar anomalias e tentar encontrar a sua causa. Também a estabilidade da pressão deve ser controlada, uma vez que a sua variação é indicadora de problemas como fugas, entupimento da coluna, entupimento a nível do injector, entrada de bolhas no sistema, entre outros. Assim, muitas vezes é necessário *eg.*, abrir as válvulas, fazer a extracção de bolhas que entram no sistema, mudar filtros e outras peças, mudar pré-coluna, inverter a coluna ou substituí-la. A

temperatura é outro factor a controlar. A introdução sucessiva de amostras com elevado grau de impureza como o plasma pode ter como consequência a perda do poder de separação da coluna. Uma forma de minimizar esta perda de resolução devido a análise destas misturas complexas é a utilização de uma pré-coluna entre o injector e a coluna analítica. A pré-coluna tem o mesmo enchimento e o mesmo diâmetro interno que a coluna e foi incluída em cada uma das metodologias referidas.

Até 2004, os 2 métodos disponíveis na literatura, que quantificavam simultaneamente por HPLC o maior número de ARV, permitiam conhecer a concentração plasmática de 6 PI e 2 NNRTIs. No entanto, requeriam a utilização de um *photo diode array* que não tínhamos disponível (Tribut e col, 2002; Titier e col, 2002) e cujo custo é superior a um detector ultravioleta. Com a comercialização do ATZ, o primeiro trabalho publicado de quantificação simultânea que já englobava o ATZ surgiu, em 2005 (Poirier e col, 2005). Este método, comparativamente com o referido na presente dissertação, tem as vantagens de quantificar o M8 (metabolito activo do NFV) e ter menos um passo no pré-tratamento da amostra – não realiza o passo de lavagem adicional do extracto com solvente orgânico prior à análise cromatográfica. Como desvantagens podem salientar-se o tempo de corrida para a correcta separação dos fármacos de 60 minutos e de um volume de plasma inicial de 0,5 mL.

Diferentes autores sugerem que os critérios de validação devem ser definidos por cada laboratório mediante aplicabilidade e exigências do método. A definição destes critérios foi baseada nas recomendações obtidas na literatura (Shah e col, 1991) e foi realizado uma validação interna de cada método (avaliou-se para cada método a selectividade, limite de quantificação, precisão intra e inter-ensaio, recuperação, exactidão, linearidade, estabilidade em diferentes condições), mas cuja apresentação dos resultados, pela sua extensão, se optou por não incluir. Por outro lado, dado que a validade do método é frequentemente posta a prova no programa de avaliação externa de qualidade, optou-se por mostrar estes resultados, para assegurar a qualidade das quantificações realizadas, acreditando que a sua relevância obvia a apresentação dos resultados da validação interna. A forma de mostrar como a obtenção desta certificação não é simples pode ser feita através da análise dos resultados do programa de avaliação de qualidade de todos os participantes. Estes são apresentados em reuniões científicas por membros do KKGIT, mantendo os laboratórios participantes no anonimato. No 2º *round* do programa iniciado em 2001 apenas 1 em 17 laboratórios tinha as 3 concentrações dentro dos limites estabelecidos (Aarnoutse e col, 2001b). No 3º *round* foi conseguido por 3 em 27 laboratórios (Droste e col, 2002). Na última avaliação, Junho de 2008, participaram um total de 56 laboratórios, tendo 51 apresentado resultados para o EFV: 28 quantificaram por HPLC com detecção ultravioleta. A exactidão média dos métodos variou entre 97 e 104%, mas o intervalo de resultados apresentados foi entre 23 a 282%, sobressaindo a importância deste programa de avaliação e o rigor do nosso trabalho no contexto internacional.

## **1.5. Conclusão**

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método que permite a quantificação de 2 NNRTI e 7 PI e pode ser utilizado na TDM e em estudos PK. Esta quantificação é realizada numa única corrida analítica, a partir de 0,4 mL de plasma de cada indivíduo e a sua qualidade foi comprovada bi-anualmente por uma entidade externa.

# Estudo da variabilidade interindividual das concentrações plasmáticas de efavirenz

## 2.1 Introdução

Uma vez desenvolvido o método para a bio-análise do EFV, o objectivo seguinte deste trabalho foi estudar a variabilidade interindividual das concentrações plasmáticas deste ARV. Se a variabilidade nas concentrações de um fármaco entre indivíduos é pequena, num grupo de indivíduos medicados com a mesma dose, a concentração no plasma pode ser predita a partir da dose. Neste caso, a dose, por vez da concentração, é usada para prever o efeito (Ivanovic e col, 2008). Por outro lado, se um fármaco tem uma janela terapêutica estreita mas todos os indivíduos, medicados com a mesma dose, atingem as mesmas concentrações terapêuticas, a TDM não tem aplicação. Ou seja, a variabilidade interindividual das concentrações de um fármaco deve ser maior que a janela terapêutica, para identificar indivíduos com concentrações sub-óptimas ou tóxicas. Neste contexto, o ajuste individual da dose de um fármaco, baseado na TDM, pode contribuir para ultrapassar esta diferença entre as concentrações e a janela terapêutica, otimizando a resposta ao fármaco.

Entre as variáveis que se podem traduzir numa acentuada variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas dos ARV, com uma conseqüente heterogeneidade na resposta à terapêutica incluem-se as diferenças PK entre indivíduos infectados, a adesão à terapêutica e as interacções medicamentosas.

## 2.2 Enquadramento e Objectivos

Visando aceder a um dos critérios/requisitos para definir a indicação para TDM do EFV, os objectivos, do trabalho apresentado neste capítulo, foram o estudo da variabilidade das concentrações plasmáticas de EFV entre indivíduos, a identificação de possíveis factores que a pudessem justificar e a comparação com a janela terapêutica proposta para o fármaco.

## 2.3 Métodos

Após obtenção de consentimento informado escrito, foram incluídos os indivíduos infectados pelo VIH seguidos na Consulta de Imunodeficiência do Centro Hospitalar de Lisboa (Desterro), segundo os critérios: indivíduos adultos medicados com esquemas HAART que incluíram EFV 600 mg OD, cuja terapêutica tinha sido instituída há mais de um mês.

A adesão à terapêutica foi avaliada através de um questionário realizado pelo responsável pela colheita. Em situações de suspeita de não adesão, os indivíduos não foram incluídos.

Na consulta foram registados os seguintes dados: duração da terapêutica com EFV; hora da última toma de EFV e hora da colheita de sangue; se a toma de EFV tinha sido acompanhada pela ingestão alimentos; sexo, raça, peso, e idade dos indivíduos; presente esquema terapêutico HAART e a experiência anti-retroviral prévia. A concentração de EFV foi quantificada, segundo o método descrito no capítulo anterior.

Para converter o valor de concentração de EFV de mg/L para  $\mu\text{mol/L}$  multiplicar por 3,17.

Para a análise e tratamento dos resultados obtidos foi utilizado o programa *Graph Pad Prism*<sup>®</sup>, versão 4 (*GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA*) e as diferenças entre grupos e associações entre variáveis foram consideradas estatisticamente significativas com valor  $p < 0,05$ . A variabilidade interindividual foi apresentada como coeficiente de variação (CV) expresso em percentagem (%).

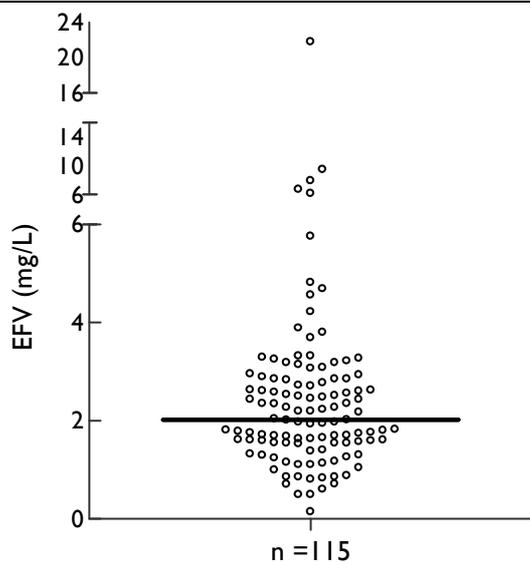
## 2.4 Resultados

### ***Variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas de efavirenz***

Este estudo incluiu 115 indivíduos. As concentrações plasmáticas de EFV variaram entre 0,14 mg/L e 21,84 mg/L, com a distribuição ilustrada na Figura 8. O valor de concentração plasmática mediana (intervalo inter-quartil) foi de 2,02 (1,54-2,85) mg/L e o CV interindividual obtido para os 115 indivíduos foi de 93% e, excluindo o valor mais elevado (21,84 mg/L), foi de 63% (Figura 8).

### ***Identificação de possíveis factores associados a diferentes concentrações plasmáticas de efavirenz***

O facto de a amostra de sangue em cada indivíduo ser colhida no intervalo entre as 8 e as 16 horas pós toma de EFV não influenciou (teste de *Spearman*) as concentrações plasmáticas do fármaco (Figura 9).



**Figura 8.** Variabilidade interindividual das concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV). A linha horizontal representa a concentração plasmática mediana (2,02 mg/L) obtida a partir da quantificação do fármaco num total de 115 indivíduos. A variabilidade interindividual foi superior a 90%.

A maioria dos indivíduos incluídos eram do sexo masculino ( $n=88$ ) e não se observaram diferenças significativas nas concentrações de EFV obtidas nos homens (mediana 2,19 mg/L) e nas 26 mulheres (1,82 mg/L) (Figura 10).

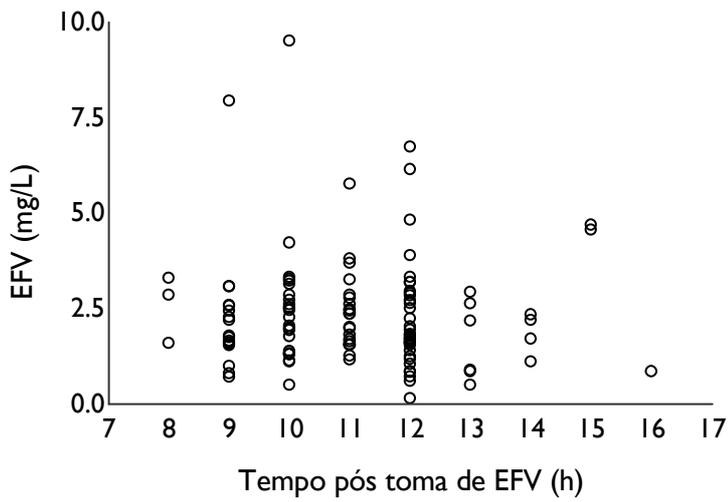
Os indivíduos que acompanharam a toma de EFV com uma refeição ( $n=41$ , 1,76 mg/L) não apresentaram concentrações diferentes dos que ingeriram o EFV sem alimentos ( $n=73$ , 2,23 mg/L) (Figura 11) e as concentrações foram semelhantes nos indivíduos a receber HAART pela primeira vez ( $n=55$ , 2,17 mg/L) ou com experiência terapêutica anterior ( $n=45$ , 2,01 mg/L) (Figura 12).

Quando se compararam as concentrações plasmáticas entre indivíduos Caucasianos ( $n=96$ , 1,97 mg/L) e Negros ( $n=18$ , 2,15 mg/L), não se encontraram diferenças significativas associadas à raça (Figura 13). No entanto, o valor excluído nesta análise (21,84 mg/L) foi quantificado numa mulher de raça Negra.

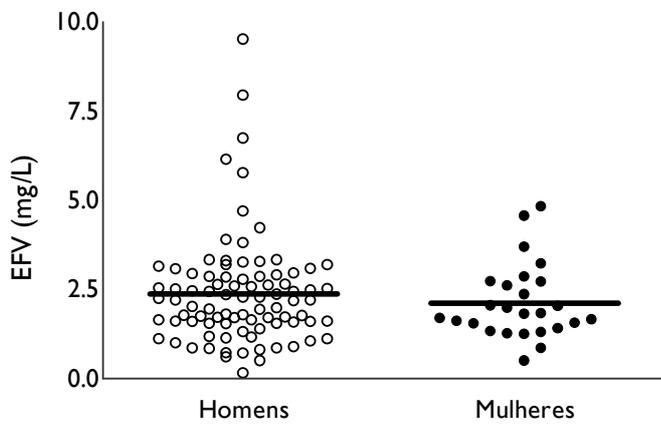
A duração da terapêutica com EFV variou entre 1 a 108 meses (mediana (IQR) 13 (4-28) meses) e os indivíduos com maior duração de tratamento com EFV apresentaram concentração do fármaco superior (Figura 14).

Os indivíduos incluídos no estudo tinham entre 18 e 67 anos (mediana 39 (33-48) anos). O estudo da influência da idade dos indivíduos nas concentrações plasmáticas de EFV permitiu observar uma associação positiva (Figura 15). Esta associação manteve-se no grupo de indivíduos Caucasianos do sexo masculino, que representaram o subgrupo com maior dimensão de amostra ( $n=65$ , Spearman  $r=0,3207$ ,  $p=0,0092$ ).

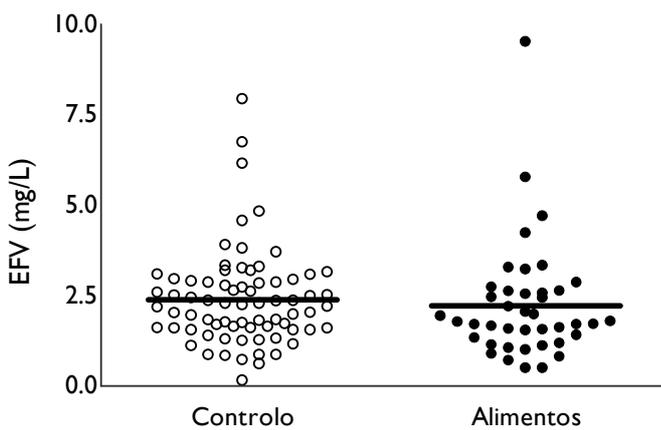
Os indivíduos pesavam entre 40 e 105 kg (63 (55-75) Kg) e não foi encontrada qualquer associação entre o peso dos indivíduos e a concentração de EFV (Figura 16).



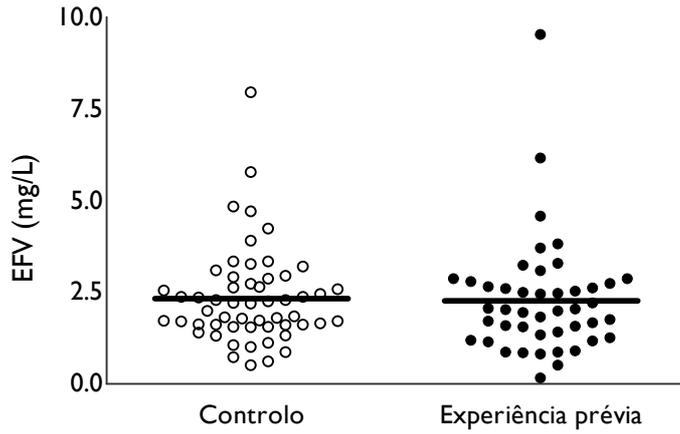
**Figura 9.** Concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) quantificadas em amostras obtidas entre as 8 e 16 horas pós toma do fármaco.



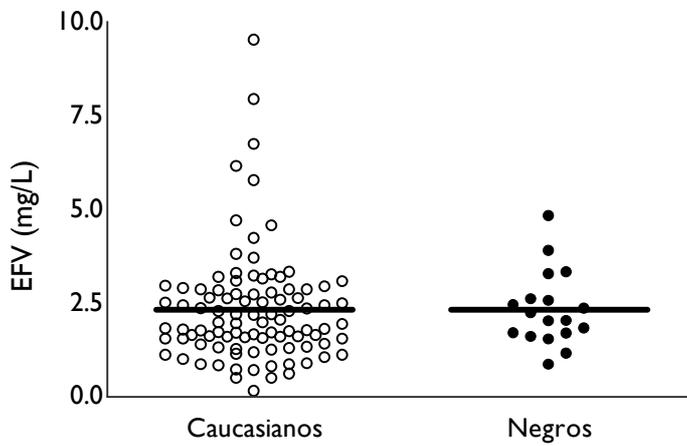
**Figura 10.** Concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) quantificadas em homens (n=88) e mulheres (n=26). As concentrações não diferem entre homens e mulheres.



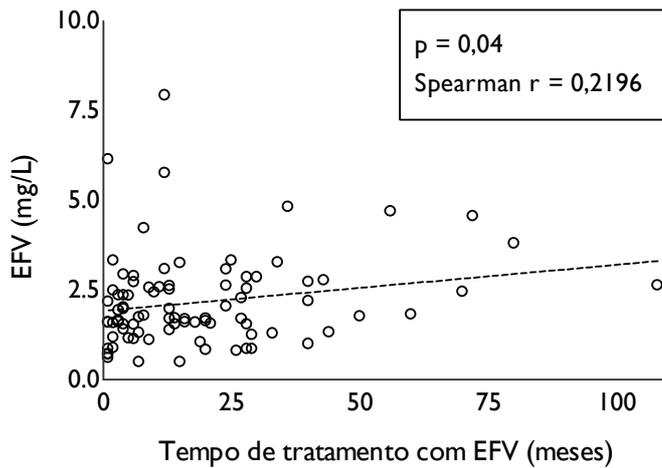
**Figura 11.** Concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) em amostras obtidas entre as 8 e 16 horas pós toma de EFV sem (controlo, n=74) ou com ingestão de alimentos (n=41). A ingestão de alimentos com a toma não influenciou as concentrações de EFV.



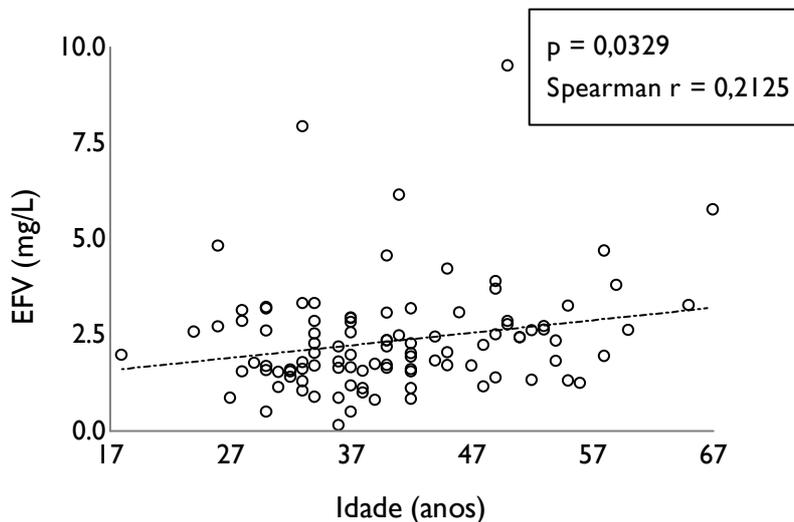
**Figura 12.** As concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) quantificadas em indivíduos sem (controlo, n=55) e com experiência anti-retroviral prévia (n=45) não foram significativamente diferentes.



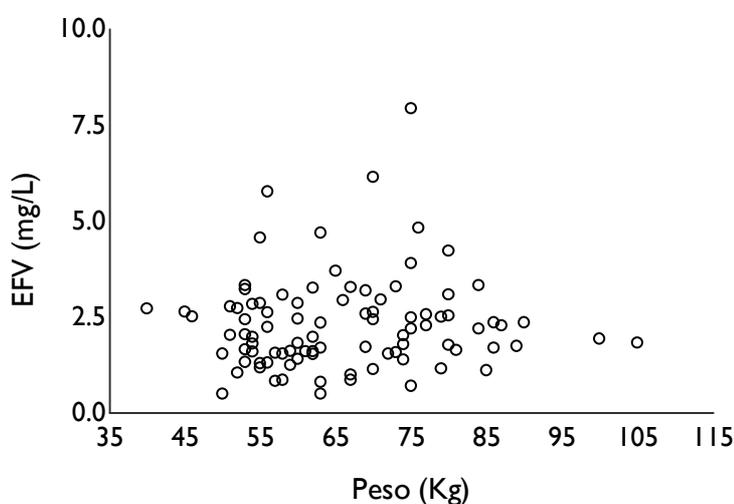
**Figura 13.** Concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) em amostras obtidas em indivíduos Caucasianos (n=96) ou de Negros (n=18).



**Figura 14.** Efeito da duração do tratamento com efavirenz (EFV) 600 mg OD nas concentrações do fármaco (n=88).



**Figura 15.** Efeito da idade dos indivíduos nas concentrações plasmáticas (n=102) de efavirenz (EFV).



**Figura 16.** Efeito do peso dos indivíduos (n=92) nas concentrações de efavirenz (EFV).

Na Tabela 4 apresentam-se os fármacos ARV que juntamente com o EFV constituíram os esquemas HAART destes indivíduos. A combinação Zidovudina (AZT) e 3TC foi a mais representativa (Tabela 4) e o 3TC foi o fármaco prescrito a mais indivíduos (ver Figura 17). Não foi encontrada uma influência dos restantes fármacos ARV nas concentrações de EFV, quando avaliada a sua contribuição individual.

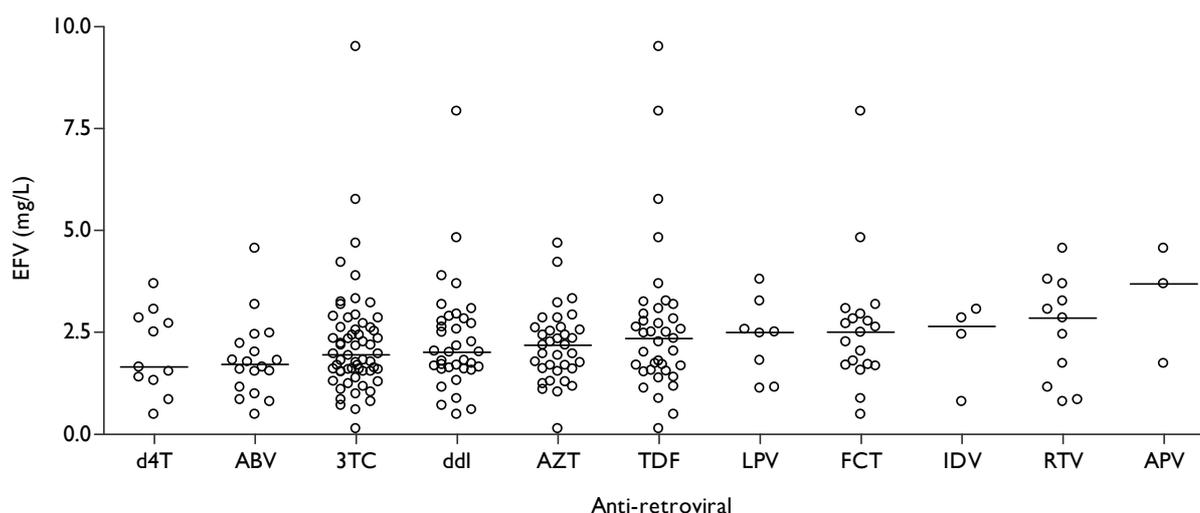
### ***Frequência de concentrações tóxicas e sub-terapêuticas***

Os valores de concentrações plasmáticas de EFV, obtidos neste trabalho, foram comparados com os propostos para os limites da janela terapêutica por diferentes autores (Tabela 5). A CEM pode variar entre 1,0 a 3,0 mg/L (Tabela 5, coluna "EFV (mg/L)"). A frequência de indivíduos com concentrações sub-terapêuticas obtidas no presente trabalho (ver Tabela 4, coluna "n (%) indivíduos"), mediante o valor de CEM seleccionado, variou entre 11 e 80%. Para a definição da CTM existe uma maior consensualidade (ver tabela 5), e foram encontrados 10% de indivíduos com concentrações tóxicas.

**Tabela 4.** Combinações de anti-retrovirais que em associação ao efavirenz constituíram o esquema terapêutico HAART dos indivíduos incluídos (n = 102).

Combinação de anti-retrovirais	n	%
Abacavir + Emtricitabina	1	< 1
Abacavir + Didanosina + Lamivudina + Lopinavir/r	1	< 1
Abacavir + Didanosina + Estavudina	1	< 1
Abacavir + Didanosina+ Lopinavir/r	1	< 1
Abacavir + Atazanavir/r	1	< 1
Abacavir + Estavudina	1	< 1
Abacavir + Lamivudina	6	6
Abacavir + Lamivudina + Zidovudina	1	< 1
Abacavir + Lamivudina + Indinavir/r	1	< 1
Abacavir + Tenofovir	1	< 1
Abacavir + Tenofovir + Lopinavir/r	1	< 1
Abacavir + Indinavir/r	1	< 1
Abacavir + Amprenavir/r	1	9
Didanosina + Estavudina	1	< 1
Didanosina + Lamivudina	9	< 1
Didanosina + Tenofovir	2	2
Didanosina + Tenofovir + Lopinavir/r	1	< 1
Emtricitabina + Tenofovir	19	18
Emtricitabina + Tenofovir + Amprenavir/r	1	< 1
Emtricitabina + Estavudina + Tenofovir + Amprenavir/r	1	< 1
Estavudina+ Tenofovir + Lopinavir/r	1	< 1
Estavudina + Tenofovir	1	< 1
Estavudina + Lamivudina	3	3
Estavudina+ Indinavir/r	2	2
Lamivudina + Tenofovir	6	6
Lamivudina + Zidovudina	32	30
Lamivudina + Zidovudina + Tenofovir	2	2
Tenofovir + Lopinavir/r	1	< 1
Tenofovir+ Lopinavir/r + Saquinavir	1	< 1
Lopinavir/r + Saquinavir	1	< 1

n: número de indivíduos. PI/r: co-administração do PI com dose *boost* de ritonavir.



**Figura 17.** Variabilidade interindividual nas concentrações de efavirenz (EFV) em indivíduos cujo esquema anti-retroviral em adição ao EFV incluiu um dos seguintes fármacos (variabilidade expressa em porcentagem, número de indivíduos, concentração mediana): estavudina (d4T; 50%; 11; 1,65 mg/L); abacavir (ABV; 52%; 18; 1,72 mg/L); lamivudina (3TC; 62%; 60; 1,95 mg/L); didanosina (ddI; 59%; 36; 2,05 mg/L); zidovudina (AZT; 42%; 35; 2,19 mg/L); tenofovir (TDF; 70%; 37; 2,35 mg/L); lopinavir (LPV; 40%; 8; 2,49 mg/L); emtricitabina (FCT; 62%; 19; 2,50 mg/L); indinavir (IDV; 45%; 4; 2,65 mg/L); ritonavir (RTV; 50%; 11; 2,85 mg/L – dose *boost*) e amprenavir (APV; 44%; 3; 3,69 mg/L).

**Tabela 5.** Comparação da frequência de concentrações tóxicas e sub-terapêuticas classificadas com base nos diferentes valores propostos na literatura para a concentração eficaz mínima (CEM) e concentração tóxica mínima (CTM).

Limite da janela terapêutica	Autores	EFV (mg/L)	n (%) indivíduos
CEM Frequência de concentrações sub-terapêuticas	Marzolini e col, 2001	1,0	13 (11)
	Van Leth e col, 2006	1,1	16 (14)
	Stähle e col, 2004	2,2	62 (54)
	La Porte, 2006	3,0	80 (80) <sup>A</sup>
CTM Frequência de concentrações tóxicas	Marzolini e col, 2001	4,0	10 (9)
	Núñez e col, 2001	3,5	13 (11)

Salvo exceções indicadas, o número total de indivíduos incluídos foi 115. <sup>A</sup>Para o cálculo foram consideradas apenas as amostras colhidas entre as 8 e as 12 horas pós toma (n=101).

### **Identificação de possíveis factores associados à variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas de EFV**

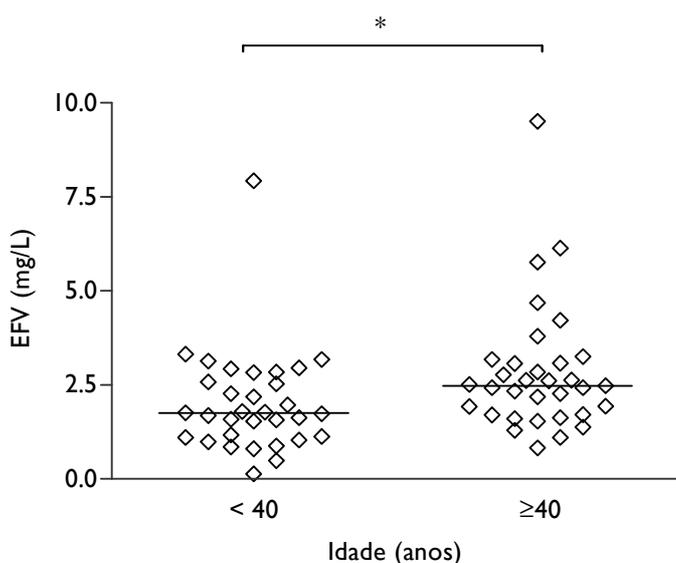
Para estudar a influência de cada factor na variabilidade interindividual, a variância nas concentrações foi comparada entre grupos pelo F-teste ou pelo teste de *Bartlett*.

Na Tabela 6 comparam-se a variabilidade interindividual nas concentrações obtidas em diferentes sub-grupos, assim como, a frequência de concentrações tóxicas e sub-terapêuticas para as variáveis cuja influência nas concentrações plasmáticas não foi encontrada.

A variabilidade interindividual (variância) foi diferente entre grupos com base no ARV associado ao EFV no esquema HAART: foi superior a 40% para o AZT e LPV/r; superior a 50% para o abacavir (ABV), d4T e esquemas com RTV em dose *baby* e superou os 60% com didanosina (ddI), 3TC e emtricitabina (FCT), chegando aos 70% com TDF ( $p=0,002$ ).

As amostras colhidas 9 a 12 horas pós-toma de EFV representam 85% do número total de amostras. Quando se comparou a variabilidade nos diferentes grupos esta não diferiu, encontrando-se concentrações tóxicas e sub-terapêuticas em todos eles (Tabela 6).

A variabilidade nos homens foi superior à encontrada no grupo feminino (Tabela 6). Entre os homens Caucasianos ( $n=65$ ), foram quantificadas concentrações inferiores ( $p=0,0164$ , teste de *Mann-Whitney*) nos indivíduos de idade inferior a 40 anos ( $n=32$ , CV 68%, mediana 1,75 mg/L, 67% das concentrações inferiores a 2,2 mg/L e 3% de concentrações superiores a 4,0 mg/L), comparativamente com os de indivíduos com mais idade ( $n=33$ , CV 60%, mediana 2,48 mg/L, 36% concentrações inferiores a 2,2 mg/L e 15% de concentrações superiores a 4,0 mg/L) (Figura 18).



**Figura 18.** Variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) em homens Caucasianos com idade inferior ou superior ou igual a 40 anos. Apesar da variabilidade interindividual ser superior a 60% nos dois grupos a concentração de EFV foi inferior no grupo de menor idade ( $p=0,0164$ , Teste de *Mann-Whitney*).

**Tabela 6.** Comparação da variabilidade interindividual encontrada entre diferentes grupos de indivíduos e frequência de concentrações tóxicas (superiores a 4 mg/L) e sub-terapêuticas (inferiores a 2,2 mg/L) de efavirenz (EFV).

Variável	Sub-grupos	n	EFV (mg/L)	CV(%)	Concentrações sub-terapêutica n (%)	Concentrações tóxica n (%)	P
Hora da colheita	C9	17	1,78	72	10 (59)	1 (1)	Ns
	C10	24	2,36	69	11 (46)	2 (3)	
	C11	21	2,35	45	10 (47)	1 (2)	
	C12	36	1,75	64	21 (59)	3 (5)	
Sexo	Homens	88	2,19	64	45 (51)	7 (11)	0,04 (variância)
	Mulheres	26	1,85	50	17 (65)	2 (4)	
EFV + Refeição	Não	72	2,23	56	36 (50)	5 (9)	Ns
	Sim	41	1,76	76	26 (63)	4 (5)	
Experiência ARV Prévia	Não	55	2,17	56	29 (58)	6 (11)	Ns
	Sim	45	2,01	69	26 (58)	3 (7)	
Caucasiano	Sim	96	1,97	64	53 (55)	8 (8)	0,054 (variância)
	Não	18	2,15	43	9 (44)	1 (6)	
Peso	≤60 Kg	38	2,00	48	21(55)	2 (5)	Ns
	61-70 Kg	24	2,34	55	11(46)	2 (8)	
	≥70 Kg	31	2,27	55	15(48)	3(10)	

ARV: anti-retroviral. n: número de indivíduos ns: não significativo. CV: coeficiente de variação.

## 2.5 Discussão

A variabilidade interindividual observada nas concentrações plasmáticas de EFV condicionou a existência de indivíduos com concentrações plasmáticas fora da janela terapêutica, o que sustenta a aplicação da TDM ao fármaco: estes resultados indicam que a dose de EFV 600 mg OD pode representar para alguns indivíduos, mínimo 20%, um risco acrescido de reacções adversas dependentes da concentração ou o desenvolvimento de resistências por concentrações sub-ótimas do fármaco.

O valor máximo de concentração plasmática de EFV encontrado foi aproximadamente 150

vezes superior ao valor mínimo. Os limites propostos na bibliografia para a janela terapêutica, pelos diferentes autores, sugerem uma CTM até 4 vezes superior à CEM, mostrando que **a variabilidade interindividual nas concentrações de EFV é superior à janela terapêutica proposta para o fármaco.**

Apesar dos diferentes valores propostos na literatura para a CEM, em especial, e para a CTM, a variabilidade interindividual observada para as concentrações do fármaco é suficientemente elevada para que, qualquer que seja a combinação de CEM e CTM utilizada, se identifiquem indivíduos com concentrações tóxicas e sub-terapêuticas.

Idealmente seriam obtidas AUC de EFV para avaliar a exposição ao fármaco. No entanto, está descrito que esta exposição é adequadamente prevista pelo  $C_{\text{vale}}$  (Villani e col, 1999). Apesar disso, no presente trabalho, não foram utilizadas nem a AUC, nem a  $C_{\text{vale}}$ . A medição de AUC não é minimamente compatível com a TDM e a obtenção de um  $C_{\text{vale}}$  está dificultada pois, dadas as reacções adversas a nível do SNC do EFV, é recomendado que a sua administração seja realizada à noite, para que as concentrações mais elevadas do fármaco ocorram durante o sono. Esta toma à noite condiciona a obtenção de um  $C_{\text{vale}}$  nas 24 horas seguintes. Assumida a impraticabilidade de se avaliar um  $C_{\text{vale}}$ , dado que a finalidade foi estabelecer uma rotina de avaliação de concentrações, foi necessário definir outro parâmetro PK a avaliar.

Esta definição pode parecer, numa primeira análise, de importância menor, mas está implicada em questões de crucial relevo: comparação e integração das conclusões obtidas por diferentes autores e definição da janela terapêutica. Na literatura, não existe um consenso no parâmetro usado, *eg.*,  $C_{\text{min}}$  (van Leth e col, 2006) ou amostras colhidas em intervalos de amplitude de 12 horas (para amostras colhidas 8 a 20 horas pós toma; Marzolini e col, 2001), 14 horas (10 a 24 horas pós toma; Stähle e col, 2004), 16 horas (Moltó e col, 2007), 20 horas (mais de 4 horas pós toma, Stöhr e col; 2008) e ao longo das 24 horas de intervalo de administração (Burger e col, 2006).

De alguns destes estudos referenciados resultaram os valores propostos para CEM: 1,0 mg/L para amostras colhidas 8 a 20 horas pós toma, Marzolini e col, 2001); 1,1 mg/L para  $C_{\text{min}}$  (van Leth e col, 2006); 2,2 mg/L para amostras colhidas 10 a 24 horas pós toma (Stähle e col, 2004) e na actualização de 2006, das *guidelines* para TDM de ARV, Charles La Porte salientou que, para concentrações obtidas antes das 12 horas pós toma, a concentração de EFV deve manter-se superior a 3 mg/L.

No presente trabalho procurou-se um compromisso entre o ponto de vista prático (de aplicação a uma rotina) e o mínimo de influência desta variável no estudo da variabilidade interindividual, com 85% do total das amostras colhidas num intervalo de 4 horas (9 ( $C_9$ ) a 12 ( $C_{12}$ ) horas pós toma). A variabilidade observada não diferiu entre  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{11}$  ou  $C_{12}$ , não sendo dependente do parâmetro utilizado dentro deste intervalo, o que pareceu ser uma boa

opção. Neste contexto, este intervalo de tempo entre a toma do fármaco e a colheita da amostra foi definido como critério para estudos posteriores.

O valor de variabilidade interindividual, expresso em CV (%) encontrado no nosso estudo para o total dos 115 doentes é consistente com valores apresentados por outros autores (118%, Marzolini e col, 2001; 55%, Csajka e col, 2003; 84%, Stähle e col, 2004).

Na análise de populações que resultem de um serviço de TDM, deve salientar-se que esta variabilidade pode estar supra-estimada, dadas as indicações para TDM, como as suspeitas de toxicidade associada à concentração, interacção medicamentosa ou resposta virológica sub-óptima, o que aumenta a probabilidade de serem quantificados valores de concentração de fármaco muito elevados ou muito baixos. Por outro lado, dado que não há identificação do indivíduo, podem ser incluídas mais que uma amostra do mesmo indivíduo.

Neste trabalho as amostras foram colhidas de uma forma sistemática, com uma única amostra de cada indivíduo, sem existir uma razão associada à resposta ao fármaco. Esta obtenção de amostras de forma sistemática, pode também explicar a distribuição das concentrações desviada à esquerda, com um número de concentrações sub-terapêuticas mais elevado que o normalmente encontrado nos estudos que resultam de análises de serviços de TDM. Dado que as reacções de toxicidade são mais facilmente identificadas, nestes trabalhos (de Maat e col, 2003; Mólto e col, 2007), a média das concentrações é normalmente superior, assim como o número de concentrações tóxicas.

**As concentrações encontradas em indivíduos com maiores períodos de terapêutica com EFV foram mais elevadas.** O facto da duração da terapêutica estar relacionada com a concentração do fármaco, sugere que os doentes que permaneceram mais tempo em terapêutica tinham concentrações superiores, o que mostra a importância de manter concentrações terapêuticas, embora não exclua que indivíduos que tenham falhado à terapêutica com concentrações óptimas.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem um efeito significativo da idade dos indivíduos, nas concentrações plasmáticas do fármaco, **indivíduos mais jovens parecem ter uma menor exposição ao EFV.**

A influência de diferentes factores como o peso (o efeito do índice de massa corporal (BMI) abordado no segundo capítulo), raça e o sexo sob as concentrações plasmáticas de EFV está descrita, mas os resultados não são concordantes (López-Cortéz e col, 2002; Csajka e col, 2003; Pfister e col, 2003; Kappelhoff e col, 2005; Burger e col, 2006; Best e col, 2007; Stöhr e col, 2008).

Diferentes estudos têm associado à raça Negra maiores concentrações de EFV (Haas e col, 2004, Burger e col, 2006). No presente trabalho, o valor de 21,38 mg/L foi encontrado numa mulher de raça Negra. Este valor não se trata de um erro experimental, dado que foram obtidas mais 3 concentrações de EFV para esta doente, que se mantiveram superiores a 20 mg/L.

Numa primeira impressão, os estudos clínicos de fase I para o EFV sugeriram uma menor *clearance* em Asiáticos e Negros, relativamente a Caucasianos e menor na mulher relativamente ao homem (Barrett e col, 2002). No entanto, o acesso às diferenças associadas ao sexo e raça é limitado pela pouca variabilidade demográfica e são realizados num pequeno número de indivíduos. A variabilidade entre raças na exposição ao EFV foi corroborada pelos grupos de Pfister (2003), Haas (2004) e Kappelhoff (2005), sugerindo o papel de factores genéticos.

Actualmente a investigação da farmacogenética do EFV é uma área em ascensão, apesar da sua translação para a prática clínica estar longe de ser conseguida (para uma revisão ver King e Albert, 2008). O estudo do grupo de Jacques Fellay (2002) foi impulsionador do grande investimento que se tem vindo a observar na farmacogenética dos ARV e o EFV é provavelmente um dos fármacos mais estudados, tendo sido identificados diferentes polimorfismos nos transportadores e enzimas envolvidos no metabolismo que podem estar relacionados com a concentração do fármaco.

Os enzimas envolvidos na fase I do metabolismo do EFV são o CYP2B6, predominantemente, e com menor relevância o CYP3A4 (Ward e col, 2003). Os diferentes polimorfismos encontrados para estes enzimas têm sido associados ao fenótipo metabolizador rápido ou lento (Cressey e Lallmant, 2007) e a frequência destes polimorfismos associada a diferentes raças. A importância do CYP2B6 tem sido subestimada, pela sua representação de aproximadamente 6% do conteúdo total hepático do CYP e o desconhecimento do seu envolvimento no metabolismo de um grande número de fármacos, comparativamente com o CYP3A4 e CYP2D6. No entanto, a procura de explicação para a variabilidade PK do EFV, impulsionou a comunidade científica para o estudo farmacogenético do CYP2B6.

Hoje estão descritos mais de 100 *single nucleotide polymorphism* (SNP) para o CYP 2B6 e a combinação destes SNP resulta em inúmeras estruturas com significado funcional desconhecido (Zanger e col, 2007 e para uma revisão ver Wang e Tompkins, 2008).

O CYP 2B6\*1 é o *wild-type* e distribui-se entre as diferentes populações étnicas/raciais: Hispânicos (57%), Caucasianos (50 a 55%), Asiáticos (30 a 70%), Africanos (40%) e Afro-americanos (30 a 45%) (Tsuchiya e col, 2004; Klein e col, 2005; Rotger e col, 2007a). A AUC média para o EFV encontrada nestes indivíduos foi 43,7 µg.h/mL (Rotger e col, 2007a).

O CYP 2B6\*4 (SNP 785 A>G) é mais raro: Hispânicos (14%), asiáticos (inferior a 8 %), Caucásiana (inferior a 4 %) e não foi encontrado na população de raça Negra (Tsuchiya e col, 2004, Klein e col, 2005 e Rotger e col, 2007a). A AUC média descrita para o EFV foi inferior ao *wild-type*: 37,1 µg.h/mL (Rotger e col, 2007a).

O CYP 2B6\*5 (1459 C>T), apresenta-se em frequências inferiores a 12% em Caucásianos, Africanos, Afro-americanos, Hispânicos e Asiáticos (Tsuchiya e col, 2004; Haas e col, 2005; Klein e col, 2005; Rotger e col, 2007a); foi associado a níveis de proteína mais baixos (Lang e col, 2001; Lamba e col, 2003) e a AUC média para o EFV encontrada nestes indivíduos variou entre 44,9 a 52,5 µg.h/mL (Haas e col, 2005; Rotger e col, 2007a). Apesar destas observações, outros autores não conseguiram mostrar a sua influência na variabilidade interindividual nas concentrações de EFV (Burger e col, 2006).

O polimorfismo 516 G>T pode ser encontrado no CYP 2B6\*6 (516 G>T e 785 A>G) e no CYP 2B6\*7 (1459 C>T, 777 C>A e 516 G>T) e foi o mais estudado (Haas e col, 2004 e 2005; Tsuchiya e col, 2004; Rodríguez-Nóvoa e col, 2005; Klein e col, 2005; Rotger e col, 2005 e 2007a; Gatanaga e col, 2007). Rodríguez-Nóvoa e colaboradores (2005), num estudo realizado em 100 indivíduos, mostraram a frequência dos diferentes genótipos e a concentração mediana de EFV: *wild-type* GG (52% 1,71 mg/L), GT (43%, 2,6 mg/L) e TT (5%, 3,57 mg/L). Concordantemente, o grupo de Rotger (2005) observou maiores concentrações plasmáticas e intracelulares com genótipo TT e, nesta população, as alterações de sono e humor foram 2 a 3 vezes mais frequentes.

Haas e colaboradores (2004, 2005) mostraram a associação entre o EFV e toxicidade a nível do SNC, na primeira semana de tratamento. Esta associação não se manteve na semana 24, o que pode ser justificado pela reduzida dimensão da amostra (3 doentes Caucásianos e 10 Africanos). Os autores observaram uma relação entre as concentrações e o polimorfismo na posição 516 do CYP2B6, que se observa com maior frequência nos indivíduos de raça Negra (20%) que Caucásiana (3%): maiores concentrações de EFV no GT e TT, que GG *wild-type* ( $p=0,036$ ). Este polimorfismo não está associado ao tempo para falência terapêutica, nem ao acréscimo das contagens de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os autores concluíram que as diferenças na eficácia do EFV, entre as populações, não podem ser explicadas com base no polimorfismo G516T. Quando se tira o efeito do G516T, que é mais predominante nos Africanos, a diferença das concentrações com a raça desaparece (Haas e col, 2004), em semelhança ao observado no nosso trabalho.

O 2B6\*26 499 C>G foi identificado num estudo japonês (Gatanaga e col, 2007). Apesar de demonstrada a importância da redução da dose com base neste polimorfismo e no 2B6\*6 G516T, é importante sublinhar que, entre os indivíduos homocigóticos 516TT, foram encontrados doentes com concentrações baixas, apesar da concentração média ser superior.

O CYP2B6 983 T>C, recentemente descrito na população Negra e ausente na Caucasiana (Klein e col, 2005; Rotger e col, 2007a; Wyen e col, 2008), parece também ter impacto nas concentrações de EFV.

Os CYP 2B6\*16, \*18, \*27, \*28 e \*29 foram identificados recentemente. O primeiro está associado a uma actividade enzimática reduzida em 85% e todos conduzem a uma aumento da exposição ao EFV (Rotger e col, 2007a). Os 2B6\*27 e \*28 foram encontrados em indivíduos Negros (0,6% de frequência) e o \*29 apenas identificado numa única doente Caucasiana.

Estudos recentes sugerem para o EFV interacções fármaco-fármaco-gene. i.e., a interacção PK com o TDF mediada pelo CYP2B6 é restrita a metabolizadores lentos (Rotger e col, 2007b).

Em suma, a biotransformação do EFV envolve diferentes isoenzimas CYP e para cada via estão descritos diferentes polimorfismos. No entanto, apesar de um grande desenvolvimento da área farmacogenética para este ARV, toda a informação gerada é difícil de integrar e aplicar na prática clínica. Estes polimorfismos estão associados a uma maior variabilidade PK que pode ser contornada com a aplicação da TDM.

David Burger e colaboradores (2006) descrevem diferenças nas concentrações plasmáticas do fármaco associadas ao sexo (maior nas mulheres) e à raça (maior na Negra), mas sugerem que possam estar associadas aos indivíduos de menor peso (não Caucasianos e mulheres com menor peso que Caucasianos e homens). Como referem Burger e colaboradores, estas diferenças foram encontradas na análise univariada. Na análise multivariada, os autores não encontraram uma associação entre as concentrações de EFV e o peso, quando corrigido para o sexo, raça e intervalo entre a toma e a colheita - as amostras foram colhidas 1 a 24 h pós toma e, como esperado, os autores encontraram influência da hora da colheita nas concentrações de EFV. Ainda a respeito deste estudo do grupo holandês, deve referir-se que, apesar das mulheres não Caucasianas terem apresentado concentrações 60% mais elevadas que os homens Caucasianos, esta diferença, dada a variabilidade nas concentrações, não teve significado estatístico. Como os autores referenciam, este estudo foi realizado a partir de amostras recebidas num serviço de TDM e, como a suspeita de toxicidade representou um dos principais factores que justificaram o pedido de TDM, o número de concentrações tóxicas excedeu o de concentrações sub-terapêuticas.

Apesar de conhecidos factores que possam explicar a variabilidade nas concentrações plasmáticas, não existe um meio de integrar esta informação para prever o efeito destas variáveis e a sua importância. Deste modo, não existe forma de prever a concentração de um indivíduo, dado que mesmo fazendo sub-grupos, para restringir variáveis, e identificando diferenças nas concentrações (influência da idade em indivíduos do sexo masculino Caucasianos), a variabilidade é igualmente elevada. No presente trabalho, o grupo com dimensão mais significativa foram os indivíduos Caucasianos do sexo masculino. Neste grupo,

confirmou-se a influência da idade nas concentrações plasmáticas deste ARV. No entanto, apesar de uma diferente concentração mediana, a variabilidade nas concentrações mantém-se em ambos os grupos etários. O valor 40 foi utilizado dado a actividade do CYP, a partir dos 40 anos, estar já reduzida em 16% (Sotaniemi e col, 1997).

A variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas do fármaco parece ser superior nos homens, no entanto, dada a dimensão da amostra feminina, este resultado deve ser interpretado com precaução. Apesar das diferenças, esta variabilidade nas mulheres continua a ser maior que a janela terapêutica com concentrações a variar mais de 10x.

Não foi encontrado nenhum factor que fosse causador de variabilidade: esta é encontrada em homens e mulheres, com diferentes pesos e idades e, **como ideia global deste capítulo, esta variabilidade justifica a monitorização das concentrações do fármaco.**

À luz do conhecimento actual, não existe um meio de quantificar, integrar e predizer o efeito destas variáveis, não havendo forma de prever a concentração que um indivíduo obterá ao fim da administração uma determinada posologia do fármaco. Com vista à optimização da terapêutica, dada esta ausência de um factor, ou integração de factores, que possa explicar esta variabilidade, parece-nos que a estratégia correcta será monitorizar as concentrações plasmáticas de EFV.

## **2.6 Conclusão**

Nenhuma das variáveis sexo, idade, peso, raça explica por si só a variação nas concentrações plasmáticas de EFV, não sendo possível ajustar a dose com base nestas variáveis. A toma da mesma dose implica que variação na concentração do fármaco entre indivíduos seja maior que a janela terapêutica. A variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas de EFV destes indivíduos justifica a sua monitorização.

# Estudo da variabilidade intra-individual das concentrações plasmáticas de efavirenz

### 3.1 Introdução

No capítulo anterior concluiu-se que existe uma elevada variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas de EFV, que se traduz em concentrações tóxicas ou sub-terapêuticas em alguns indivíduos. O ajuste individual das doses de EFV baseado na TDM pode contribuir para ultrapassar esta limitação. Contudo, uma variabilidade intra-individual elevada significa que uma quantificação única da concentração plasmática tem um valor limitado e não deve ser utilizada para justificar um ajuste da dose. Por outro lado, medições múltiplas da concentração de um fármaco durante vários dias são incompatíveis com a prática clínica. Uma vez que a variabilidade intra-individual tem sido postulada como um factor prognóstico de reactivação virológica em crianças (Brundage e col, 2004) pode assumir-se que variabilidade intra-individual elevada poderá constituir um factor prognóstico de falência terapêutica.

Na literatura, existem referências à variabilidade intra-individual das concentrações plasmáticas de EFV que indicam valores inferiores a 30%, evidenciando consistentemente o suporte para a TDM deste fármaco (Marzolini e col, 2001; Csajka e col, 2003; Stähle e col, 2004; Gutiérrez e col, 2005; Nettles e col, 2006). Embora os valores de variabilidade intra-individual descritos nestes trabalhos sejam reduzidos, nenhum destes estudos abordou sob o ponto de vista da aplicação prática da TDM: não documentam a periodicidade das medições necessária para identificar os indivíduos com maior variabilidade e risco acrescido de falência terapêutica, numa terapêutica de longo-curso.

### 3.2 Enquadramento e Objectivos

O estudo da variabilidade intra-individual é um dos critérios/requisitos para definir a indicação para TDM de um fármaco. Neste trabalho, pretendeu-se estudar a variabilidade intra-individual das concentrações plasmáticas de EFV, a longo-termo, recolhendo amostras e informação durante 3 anos. Este estudo teve também como objectivo determinar factores que influenciem

a variabilidade nas concentrações plasmáticas do EFV para um indivíduo, ao longo do tempo, como a idade, o BMI e o intervalo de tempo entre a toma de EFV e a colheita de sangue.

### 3.3 Métodos

Os dados clínicos e laboratoriais foram colhidos para indivíduos adultos VIH<sup>+</sup> que iniciaram HAART contendo EFV, como primeira terapêutica ou anteriormente medicados com PI, e que concordaram com adesão ao tratamento. A adesão foi controlada através de um questionário realizado pelo responsável pela colheita. Os indivíduos declararam o seu consentimento informado por escrito.

Ao longo de 36 meses foi colhida informação relativa às concentrações plasmáticas de EFV, carga viral e contagem de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, a cada 3±1 meses, e não foram realizados ajustes de dose de EFV (600 mg OD). O número de 3 a 4 medições anuais foi escolhido, dado que é necessário um número mínimo de 3 quantificações para calcular o coeficiente de variação, que expressa a variabilidade intra-individual em percentagem. Por outro lado, dado que este é o intervalo de tempo de rotina estabelecido para monitorizar o estado da doença (eg. carga viral e Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>), não foram necessárias deslocações extra dos indivíduos ao Hospital. As concentrações de EFV pertencentes a cada indivíduo foram quantificadas à medida da sua colheita e apenas as amostras colhidas 8 a 16 horas após a toma de EFV foram consideradas (ver capítulo 2). Doentes medicados com outros fármacos adicionais à HAART não foram excluídos.

Outros factores com possibilidade de associação à variabilidade intra-individual foram também considerados: tempo entre hora da toma de EFV e a colheita de sangue, co-infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e/ou VHC, idade superior a 40 anos, sexo, co-medicação e variação do BMI. Indivíduos que não atingiram carga viral inferior a 50 cópias/mL após seis meses de terapêutica ou que, após obtenção de carga viral indetectável no período inicial, esta tornou a ser detectável em 2 ocasiões consecutivas foram consideradas falências terapêuticas.

Salvo indicações em contrário, os resultados foram expressos em média±desvio padrão (SD) ou média (intervalo). A variabilidade nas concentrações plasmáticas foi apresentada como CV (%). Quando a variabilidade ultrapassou os 50% utilizou-se a mediana sempre apresentada como mediana (intervalo interquartil). O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando os seguintes testes: diferenças entre grupos de indivíduos (valores absolutos ou % variação) foram comparadas por análise de variância (ANOVA) associada ao pós-teste de *Dunnnett* para comparações múltiplas ou pelo teste *t-Student*. A associação entre factores, salvo excepções assinaladas, foi analisada com o teste de *Spearman*.

### 3.4 Resultados

Trinta indivíduos, dos 31 incluídos, completaram o estudo. O número médio de medições por indivíduo foi de 9 (6-12), num total de 279 amostras. Um indivíduo entrou em falência após 15 meses de tratamento, pelo que interrompeu o estudo. O resumo das características dos indivíduos que completaram o estudo está apresentado na Tabela 7.

A concentração média de EFV, por doente, ao longo do estudo foi  $2,23 \pm 0,15$  mg/L, variando entre 1,23 e 4,78 mg/L (Figura 19A). Não foram encontradas diferenças na concentração no 1º, 2º e 3º anos de seguimento (Tabela 8):  $2,20 \pm 0,15$  mg/L;  $2,17 \pm 0,17$  mg/L e  $2,31 \pm 0,17$  mg/L, respectivamente. As concentrações plasmáticas nas 279 amostras variaram entre 0,58 e 6,63 mg/L, com uma variabilidade total de 50%. Do total das 279 amostras (Tabela 8), 22 medições corresponderam a concentrações tóxicas de EFV ( $> 4$ mg/L) e 10 foram sub-terapêuticas ( $< 1$  mg/L; Marzolini e col, 2001).

A variabilidade intra-individual média nas concentrações de EFV, durante 36 meses, foi de 28% (12 a 63%; Figura 19B). Estes valores não foram diferentes quando a concentração de EFV foi normalizada para o BMI (30%, valores entre 13% a 65%). Na Figura 20 ilustra-se o efeito do BMI na concentração de EFV. Apesar do valor de BMI mais elevado ter correspondido a uma concentração de EFV inferior nos indivíduos do sexo masculino (*Spearman*  $r = -0,16$ ,  $p = 0,0195$ ), esperava-se, nestes 3 anos de seguimento, uma baixa contribuição do CV intra-individual do BMI para o CV intra-individual das concentrações de EFV, dado que o CV intra-individual máximo encontrado para o BMI foi 8%. De facto, não existiu associação entre o CV para o BMI e o CV para as concentrações de EFV ( $p = 0,6729$ ).

O CV para a concentração de EFV para cada indivíduo não estava associado à sua concentração média deste ARV ao longo do estudo ( $p = 0,4645$ ). Não foi encontrada uma associação entre o número de amostras obtidas por indivíduo e o CV intra-individual nas concentrações plasmáticas de EFV. Entre cada ano de seguimento, não se observaram diferenças no CV intra-individual ou no CV interindividual nas concentrações do fármaco. A variabilidade total média entre indivíduos (40%) foi 1,4 vezes superior à variabilidade no mesmo indivíduo (28%).

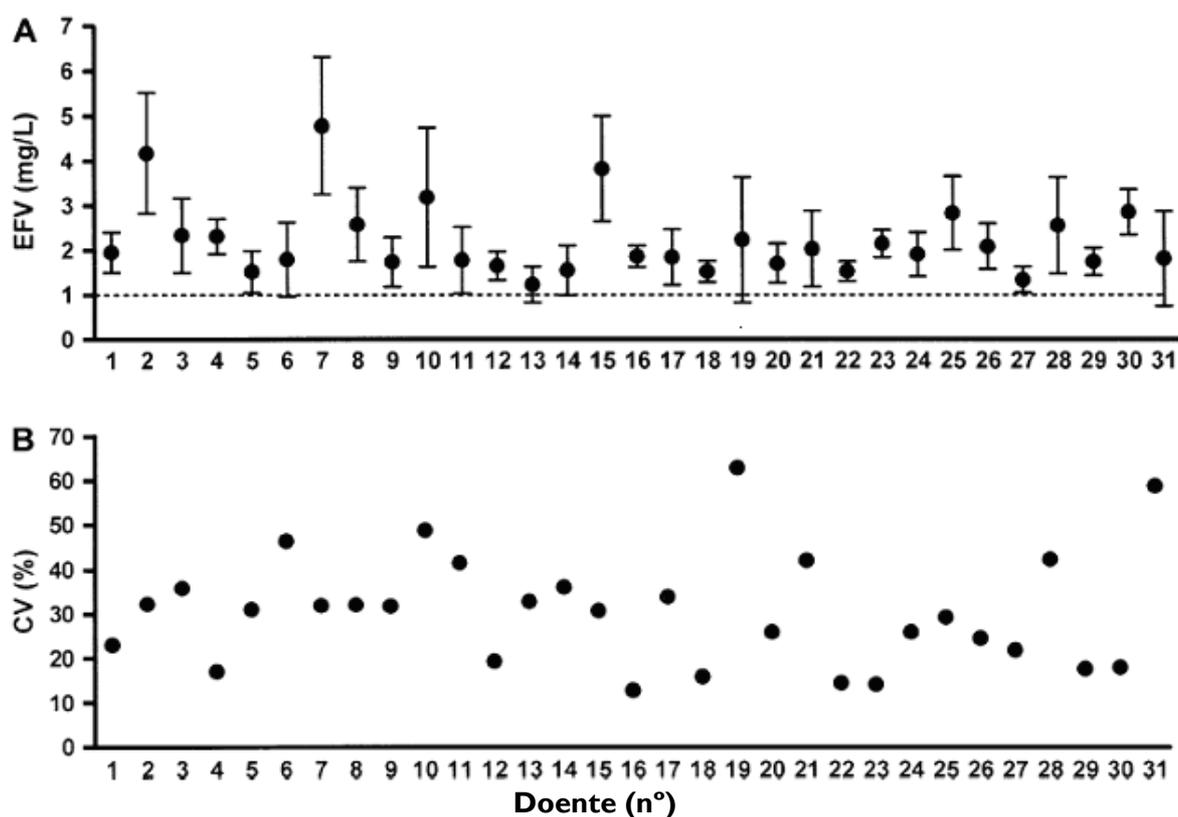
A % de variação na contagem de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> (mediana 32%; intervalo -59% a 279%) não estava associada (Teste de *Pearson*) à concentração de EFV média ( $p = 0,168$ ) ou à variabilidade intra-indivíduo ( $p = 0,705$ ).

A concentração de EFV não estava associada ( $p = 0,2076$ ) ao intervalo de tempo entre a toma do fármaco e a colheita de sangue (8-16 (11±1) h). O CV para o tempo entre a toma do EFV e a colheita de sangue não contribuiu para o CV das concentrações plasmáticas do fármaco.

**Tabela 7.** Características dos doentes e coeficientes de variação (CV) observados durante 3 anos no índice de massa corporal (BMI) e tempo entre a toma de efavirenz e a colheita da amostra (Tcolheita).

Doente	Sexo	Idade (anos)	Raça	VHB <sup>+</sup> e/ ou VHC <sup>+</sup>	HAART (primeira HAART)	Amostras (n°)	CV BMI (%)	CV Tcolheita (%)
1	F	33	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	8	1	9
2	M	66	c	s	3TC + TDF + EFV (s)	11	4	6
3	M	40	c	s	3TC + TDF + EFV (s)	6	3	7
4	M	50	c	n	3TC + AZT + EFV (n)	9	2	3
5	M	47	c	s	3TC + AZT + EFV (s)	9	2	11
6	F	18	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	6	7	7
7	M	45	c	n	3TC + TDF + EFV (s)*	8	2	7
8	M	61	nc	n	LPV /r + TDF + EFV (n)	8	2	7
9	M	57	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	7	2	19
10	M	33	c	s	3TC + TDF + EFV (s)*	11	8	4
11	M	34	c	s	3TC + AZT + EFV (n)*	6	2	10
12	F	52	c	n	3TC + TDF + EFV (n)*	12	5	10
13	M	38	c	s	3TC + TDF + EFV (s)	9	6	13
14	M	42	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	12	2	10
15	M	51	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	10	5	12
16	F	37	c	s	ddl + d4T + ABV + EFV (n)	10	4	9
17	M	42	c	n	3TC + d4T + EFV (n)	12	6	9
18	M	42	c	s	3TC + AZT + EFV (s)*	9	4	6
19	M	36	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	7	2	9
20	M	55	c	n	3TC + AZT + EFV (s)	10	2	9
21	M	48	nc	n	LPV/r + d4T + ABV + EFV (n)	10	4	6
22	F	23	c	s	3TC + AZT + EFV (s)	9	4	7
23	M	40	c	n	3TC + AZT + EFV (n)	11	4	5
24	F	53	c	n	3TC + d4T + EFV (n)*	12	3	15
25	M	50	c	n	3TC + AZT + EFV (s)*	10	2	5
26	M	34	c	s	3TC + AZT + EFV (s)	11	3	14
27	F	31	c	n	D4T + TDF + EFV (n)	7	5	12
28	M	34	c	n	3TC + AZT + ABV + EFV (s)	9	1	6
29	M	63	c	n	3TC + TDF + EFV (s)	10	3	9
30	M	49	c	n	d4T + TDF + EFV + LPV/r(n)	10	3	7

n°: número. F: feminino. M: masculino. c: caucasiano nc: não-caucasiano n: Não. s: Sim. HAART: Highly active anti-retroviral therapy (terapêutica anti-retroviral de elevada eficácia). 3TC: lamivudina. ABV: abacavir. AZT: zidovudina. d4T: estavudina. ddl: didanosina. EFV: efavirenz. LPV/r: lopinavir/ritonavir. TDF: tenofovir. CV: variabilidade intra-individual \*alteração dos análogos nucleósidos inibidores da transcriptase reversa incluídos no esquema terapêutico no decorrer do estudo.

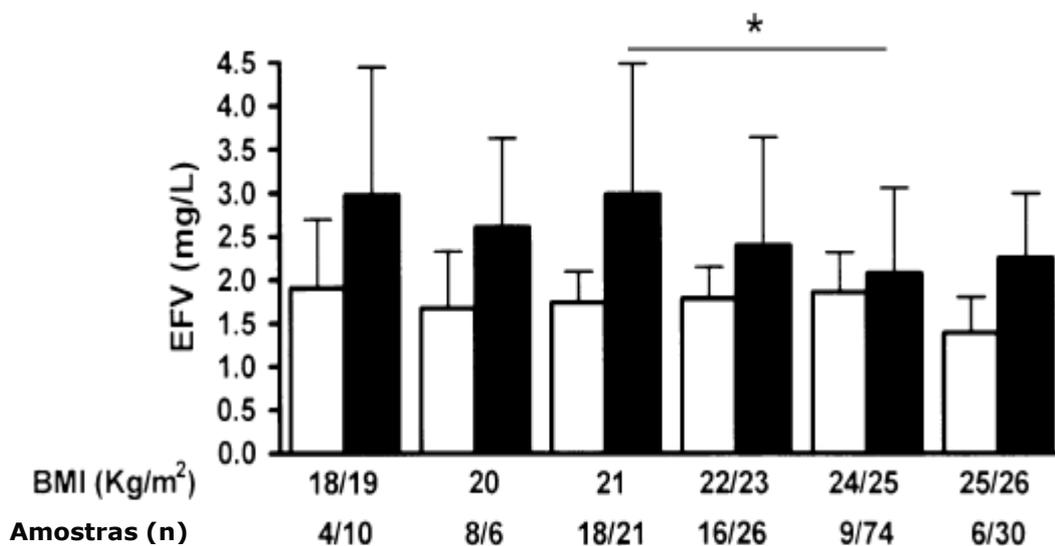


**Figura 19.** Variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) de 31 doentes VIH<sup>+</sup>: **A.** Concentração média±desvio padrão para cada indivíduo. A linha a tracejado representa a concentração eficaz mínima descrita para o EFV (1mg/L, Marzolini e col, 2001) **B.** Coeficiente de variação (CV) calculado a partir de uma média de 9 amostras por doente. n°: Número

**Tabela 8.** Comparação entre os resultados obtidos em cada ano do estudo.

	Ano do estudo		
	1°	2°	3°
Número de amostras	89	100	90
Concentração plasmática média de EFV (mg/L)	2,20	2,17	2,31
Variabilidade intra-individual (%)	27	31	25
Variabilidade interindividual (%)	38	42	41
Níveis sub-terapêuticos *	2	5	3
Níveis tóxicos **	7	8	7

\* inferiores a 1 mg/L (Marzolini e col, 2001). \*\* superiores a 4 mg/L (Marzolini e col, 2001). EFV: efavirenz.



**Figura 20.** Influência do índice de massa corporal (BMI) na concentração plasmática de efavirenz (EFV): □ mulheres (n=7) e ■ homens (n=24). Cada barra corresponde a média e ao desvio padrão da média (\* p <0,05, ANOVA com pós-teste de *Dunnnett* para comparações múltiplas).

Não foram encontradas diferenças no CV intra-individual entre homens e mulheres (32±11% vs. 23±11%, p=0,0958) ou entre doentes VBH/VCH<sup>+</sup> (29±12%) e VHB/VHC<sup>-</sup> (30±12%). Nos indivíduos com idade superior a 40 anos (28±8%), o CV intra-individual observado não diferiu do encontrado nos mais jovens (32±16%). Nem a alteração dos ITRN incluídos na HAART, nem a medicação com LPV influenciaram o CV intra-individual (30±12%, n=7).

Dois indivíduos entraram em falência terapêutica após 3 anos de medicação com EFV. Os valores médios das concentrações de EFV (variabilidade intra-individual) destes indivíduos foram 1,78 mg/L (42%) e 1,52 mg/L (16%) (Figura 19A e B, doente 11 e 18). Ambos eram homens Caucasianos medicados com 3TC+AZT+EFV, VHC<sup>+</sup> (e o doente 11 também VHB<sup>+</sup>). Para o doente 11 este era o HAART de primeira linha e o doente 18 tinha experiência prévia com PI. A concentração média de EFV para o doente que interrompeu o estudo ao mês 15, doente 31, foi de 1,68 mg/L (45%). Este indivíduo é do sexo masculino, VHC<sup>+</sup>, iniciou a o seu primeiro HAART com ABV+d4T+EFV, aos 29 anos. Os 3 doentes tinham uma concentração média inferior à da população em estudo.

### 3.5 Discussão

A aplicação da TDM aos fármacos ARV atingiu uma expressão significativa em alguns países (de Maat e col, 2003; Burger e col, 2006), estando estabelecidas populações-alvo (Kappelhoff e col, 2004; La Porte, 2006). No entanto, alguns conceitos práticos, como periodicidade da recolha de amostras e intervalo de tempo para a colheita, permaneciam por conhecer. A variabilidade intra-individual foi indicada como preditiva de falência virológica (Brundage e col,

2004), mas a aproximação metodológica para aceder a esta variabilidade, no tratamento com EFV, numa doença crónica, foi descrita pela primeira vez neste trabalho. No entanto, quão baixa deve ser a variabilidade intra-individual para viabilizar a TDM? Na literatura não existem referências a este limite. Assumindo que é aceitável uma precisão do método de  $\pm 15\%$  (Shah e col, 1991), existe um consenso geral de que a variabilidade intra-individual de 30% possa ser considerada baixa. No caso do EFV, este valor de 30%, corresponde aproximadamente a menos de metade da variabilidade interindividual como mostrado no capítulo 2. **Definiu-se um valor de 30%, como o limite para que a variabilidade intra-individual para as concentrações de EFV deva ser considerada reduzida.**

O período, no qual esta variabilidade deve ser definida, foi pela primeira vez estipulado: **3 a 4 determinações anuais com periodicidade de  $3\pm 1$  meses de intervalo** fornece valores consistentes de concentrações plasmáticas de EFV, para cada indivíduo, durante 3 anos. Nestas condições, as concentrações de EFV quantificadas com periodicidade de  $3\pm 1$  meses, ao longo de 3 anos e em amostras colhidas 8 a 16 horas após a toma de 600 mg OD, apresentam um **CV intra-individual de 28%**.

Os valores de variabilidade intra-individual média encontrados foram consistentes com os encontrados na literatura: 26% por Csajka e colaboradores (2003), 28% por Gutiérrez e colaboradores (2005), 25% por Nettles e colaboradores (2006), sendo o menor de 16% (Stähle e col, 2004) e o mais elevado de 30% (Marzolini e col, 2001). Nenhum destes estudos possibilitou as definições estabelecidas no presente trabalho por diferentes motivos:

- Por um lado, diferentes autores utilizam um diferente intervalo de tempo entre a administração do fármaco e a quantificação da amostra: 8 a 20 h (Marzolini e col, 2001) e 10 a 24 horas (Stähle e col, 2004). Como referido a toma de EFV é aconselhada no período antes de deitar pelo que a colheita a partir das 16 horas após toma não é praticável.

- Por outro, a periodicidade da colheita também não foi estabelecida e limita o número de doentes incluído em cada estudo. O grupo de Nettles (2006) incluiu apenas 4 doentes e os valores variaram entre 7-51%. Estes autores obtiveram um número médio de 36 amostras por indivíduo, colhidas 3 vezes por semana na primeira metade do intervalo de dosagem (2-12h). A colheita 3x por semana pode ser impraticável e o intervalo de tempo entre toma e colheita usado é desaconselhado. Marzolini e colaboradores (2001) contam 85 indivíduos incluídos durante 3 a 18 meses, as amostras foram obtidas a cada 3 meses, com 2 a 5 determinações por indivíduo. Nos indivíduos com apenas 2 determinações e com menos de 6 meses de estudo (intervalos de 3 meses) não é possível determinar o CV e, assim, não se conhece a dimensão da amostra usada para estudar a variabilidade intra-individual. Stähle e colaboradores (2004) não referenciaram a periodicidade com que as amostras foram colhidas, nem o período de seguimento dos doentes e incluíram amostras colhidas 24 horas pós toma de EFV. O grupo de Csajka (2003) contou com 235 indivíduos com valor médio de 2 amostras por indivíduo, ou seja

para a maioria dos doentes foi colhida apenas 1 amostra e para outros 2 amostras, não se conhecendo a dimensão da amostra, nem a periodicidade da colheita. A duração do estudo do grupo de Gutiérrez (2005) é de 6 meses.

**A variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas de efavirenz foi semelhante para cada um dos 3 anos de estudo**, o que sugere que 3 a 4 medições no primeiro ano de terapêutica permitem conhecer a variabilidade nas concentrações plasmáticas de EFV associada a cada indivíduo. O presente trabalho, à data da sua publicação, consistiu no estudo de quantificação das concentrações plasmáticas do fármaco com follow-up mais longo dos indivíduos, como referenciado no *site clinical care options* ([www.clinicaloptions.com](http://www.clinicaloptions.com)).

A principal razão para a variabilidade intra-individual que tem sido descrita na literatura é a toma irregular do fármaco, tendo sido demonstrado que esta contribui para mais de 50% do seu valor (Vrijens e Urquhart, 2005). Diferentes estudos demonstram de forma inequívoca a associação íntima entre a adesão ao tratamento e a carga viral, contagens de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> e mortalidade. Taxas de adesão de 95% ou superiores são necessárias para manter a supressão virológica, mas está descrito uma adesão inferior a 90% em 40 a 60% dos indivíduos (Bartlett, 2002). A adesão à medicação não é simplesmente o acto de engolir um comprimido. Manifestações comuns de não adesão são classificadas como primária (*eg* incapacidade de aviar uma receita), secundária (a medicação não é tomada de forma pretendida, *eg.*, omissão de doses, administração incorrecta, sobredosagem, paragem da medicação antes do tempo, toma de medicamentos receitados para outra pessoa, toma de medicamentos fora de prazo de validade ou guardados inadequadamente, toma da medicação com outros medicamentos ou com alimentos desaconselhada) e como intencional (não apresentar uma receita na farmácia) ou não intencional (*eg.*, por simples lapso). A este respeito, o facto de os indivíduos estarem esclarecidos, de acordo com adesão total e sabendo que a concentração vai ser medida são factores que podem melhorar a adesão. Por outro lado, o facto de se tratar de uma coorte de indivíduos e não de amostras recebidas aleatoriamente numa unidade de TDM, pode influenciar os resultados do estudo, possibilitando uma infra-estimação do real valor de variabilidade intra-individual. Também o facto de apenas se incluírem indivíduos de uma só consulta e de um Hospital pode constituir uma limitação do presente estudo. O número de doentes incluídos, que aparentemente pode parecer reduzido, é, contudo, muito superior ao de outros trabalhos que visaram igualmente definir a variabilidade intra-individual de outros ARV (Boffito e col, 2003; Goujard e col, 2005; Nettles e col, 2006).

Outro aspecto importante neste trabalho foi a demonstração de que a variabilidade intra-individual nas concentrações de EFV não está aparentemente associada com factores contornáveis sob o ponto de vista clínico, através um ajuste da dose *standard* (*eg.*, BMI, idade, e do tempo decorrido entre a última toma do fármaco e a colheita de sangue).

O BMI foi descrito como um factor que não influencia a variabilidade PK das concentrações de EFV entre indivíduos (Marzolini e col, 2001). Neste trabalho, foi encontrada uma associação entre o BMI e a concentração plasmática, contudo variações inferiores a 8% ou 3 Kg/m<sup>2</sup> não têm aparentemente consequências práticas em termos da aplicação da TDM ao EFV.

O facto de a variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas de EFV não estar associada à variação na hora entre a toma do fármaco e a colheita de sangue, era esperado, uma vez que todas as amostras incluídas correspondiam a um intervalo de tempo considerado reduzido (capítulo 2). Na aplicação prática do TDM ao EFV este intervalo (8 a 16 horas) deve ser respeitado, já que a recolha do sangue em intervalos mais alargados introduz variações adicionais nas concentrações plasmáticas (Marzolini e col, 2001; Burger e col, 2006).

Os indivíduos foram divididos em 2 grupos com base na sua idade, superior/inferior a 40 anos, para investigar a influência da idade na variabilidade intra-indivíduo. A idade de 40 anos foi escolhida como referência (Sotaniemi e col, 1997), à semelhança dos critérios utilizados no capítulo 2.

A frequência de concentrações de EFV consideradas sub-terapêuticas (inferiores a 1 mg/L) por Marzolini e colaboradores (2001) foi 10 em 279 amostras. A variabilidade intra-individual nestes doentes aumentou em 6% comparativamente com aqueles que mantiveram concentrações iguais ou superiores a 1 mg/mL. Contudo, esta diferença não alcançou significado estatístico. Esta frequência de concentrações sub-terapêuticas foi semelhante ao encontrado noutros trabalhos (Burger e col, 2006) e inferior ao apresentado no capítulo 2. Num outro estudo, os autores usaram razões de concentração (de Maat e col, 2003): a concentração plasmática de cada indivíduo medida num determinado número de horas pós ingestão de EFV foi comparada com um ponto (um valor de concentração), correspondente ao mesmo intervalo de tempo mas retirado de uma curva mediana de concentração de EFV ao longo do tempo (0 a 24 horas) obtida numa população de referência. Através desta estratégia o número de concentrações sub-terapêuticas descrito foi 20% superior, o que mostra a importância do momento no intervalo de administração em que é realizada a colheita, para a comparação e integração de resultados.

O número de doentes não Caucasianos incluídos no estudo de Burger e colaboradores (2006) pode estar associado à elevada frequência de concentrações superiores a 4 mg/dL (19%), comparativamente com os 8% quantificados no presente estudo. A CTM para o EFV foi definida em 2001, através do cálculo do valor prognóstico da concentração plasmática para a probabilidade de ocorrerem efeitos adversos a nível do SNC em 13 de 121 doentes (Marzolini e col, 2001). A correlação entre a concentração do fármaco e o aparecimento de efeitos adversos foi posteriormente confirmada em estudos clínicos, mas apenas para a primeira semana de terapêutica (Clifford e col, 2005). Assim, a diminuição da dose *standard* em indivíduos com concentrações de EFV superiores a 4 mg/mL pode não ser útil para minimizar

estes efeitos e com a agravante de poder prejudicar o efeito benéfico do fármaco no colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade (HDL-c), o que é discutido no capítulo 5 desta dissertação.

Se a concentração muito elevada, resultasse em efeitos adversos que poderiam levar a uma diminuição da adesão, poderia observar-se uma maior variabilidade nas concentrações. Por outro lado, se a auto-indução do metabolismo fosse dependente da concentração, também se esperariam maiores variações. No entanto, valor médio de concentração do fármaco não se relacionou com a variabilidade intra-individual na sua concentração.

Apesar do interesse da variabilidade intra-individual como índice para predizer a resposta a terapêutica ter sido descrito em crianças (Brundage e col, 2004), devido ao número de doentes incluídos no presente estudo, à sua heterogeneidade em termos de tratamento prévio e porque apenas se encontraram 3 falências nos 31 doentes, a importância da variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas como valor prognóstico da ocorrência de falência terapêutica não pode ser estudada. Contudo, o elevado valor de variabilidade intra-individual (> 40%) encontrado em 2 dos 3 doentes estimula a continuação do estudo apesar de não se poder ignorar a contribuição de outros factores que condicionam a resposta ao tratamento (*eg.*, a resistência primária).

O presente trabalho salienta o interesse de avaliar, futuramente, se o número de não respondedores à terapêutica é superior em indivíduos com concentrações *borderline* relativamente à CEM e variabilidade superior a 30%.

### **3.6 Conclusão**

A baixa variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas de EFV suporta a TDM. Estes resultados sugerem que 3 a 4 determinações no primeiro ano de terapêutica são suficientes para definir a concentração de EFV esperada para o indivíduo e a variabilidade intra-individual associada a essa concentração. Em indivíduos com concentração inferior a 2 mg/L e variação superior a 30% são recomendadas mais medições. A variabilidade intra-individual nas concentrações de EFV não está associada a concentração média do fármaco, sexo, idade, co-infecção e duração da terapêutica com o fármaco.

# Concentrações de EFV em indivíduos co-infectados pelos VHB/C sem alteração da função hepática

## 4.1 Introdução

Nos capítulos anteriores foi estudada a influência de diferentes factores na variabilidade interindividual e intra-individual nas concentrações plasmáticas de EFV. Uma das conclusões retiradas refere-se à ausência de influência da co-infecção por VHB<sup>+</sup>/VHC<sup>+</sup> na variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas do fármaco, o que conduziu à questão: a presença de co-infecção *per se* influencia as concentrações plasmáticas de EFV? Sabe-se que doença hepática pode reduzir a *clearance* de fármacos metabolizados pelo fígado, aumentando o risco de toxicidade dependente da concentração. Por outro lado, a biotransformação dos fármacos pelo sistema enzimático CYP pode estar comprometida por alteração da actividade destes enzimas associada à própria inflamação/infecção (Becquemont e col, 2002; Renton e col, 2004).

O EFV, por acção do sistema enzimático CYP (Smith e col, 2001; Ward e col, 2003) é hidroxilado em metabolitos inactivos, com subsequente excreção biliar e urinária destes fármacos após glucuroconjugação (Mutlib e col, 1999; Smith e col, 2001). Apesar da falta de consensualidade, as concentrações mais elevadas de EFV têm sido associadas a um risco acrescido de efeitos neuropsiquiátricos (Marzolini e col, 2001; Núñez e col, 2001; Csajka e col, 2003; Gallego e col, 2004; Haas e col, 2004; Stähle e col, 2004; Clifford e col, 2005; Fúmaz e col, 2005; Gutiérrez e col, 2005; Kappelhoff e col, 2005; Mathiesen e col, 2006; Moltó e col, 2007; Takahashi e col, 2007).

Contrariamente ao aumento drástico que a HAART permitiu na sobrevivência na população infectada pelo VIH (Palella e col, 1998), a co-infecção pelos VHB e/ou VHC surgiu como uma causa importante da mortalidade e morbilidade nestes indivíduos (Bica e col, 2001; Macías e col, 2002). A infecção pelos VHB/VHC é frequente na população infectada pelo VIH, dada a partilha das vias de transmissão (Dodig e Tavit, 2001) e tem sido associada a estadios mais avançados de doença hepática na população VIH (Bica e col, 2001).

O aumento dos enzimas hepáticos ocorre entre 1 a 8% dos indivíduos medicados com EFV (Kappelhoff e col, 2005; Rivero e col, 2007) e tem sido atribuível a reacções de hipersensibilidade ao NNRTI (Bossi e col, 2000), ou a mecanismos dependentes da concentração (Kappelhoff e col, 2005). A co-infecção pelo VHB/VHC é o factor de maior relevância na hepatotoxicidade induzida pelo EFV (Sulkowski e col, 2002; Martin-Carbonero e col, 2003; Ena e col, 2003), mas não se conhece a contribuição da infecção/inflamação pelo VHB/VHC na disposição deste fármaco. Parcos trabalhos se têm dedicado ao estudo dos valores de concentração plasmática de EFV nesta co-infecção, sendo os resultados contraditórios e baseados numa única quantificação por indivíduo (Tabela 9). Estudos desenhados para outros objectivos e que, por esse motivo, não apresentaram dados de função hepática (Gutiérrez e col, 2005; Rodríguez-Nóvoa e col, 2005) sugeriram que a co-infecção não predispõe necessariamente para alterações nas concentrações do ARV. No entanto, em indivíduos co-infectados com cirrose hepática, ou com aumentos dos valores de transaminases, estão descritas concentrações de EFV mais elevadas (Maserati e col, 1999; Bickel e col, 2005; Robertson e col, 2005; Barreiro e col, 2007).

**Tabela 9.** Resumo dos principais trabalhos publicados que descrevem concentrações de EFV na co-infecção e suas principais conclusões.

Autor Publicação	n	Dados de função hepática ou gravidade da doença hepática	Conclusão
Gutiérrez e col, 2005 <i>Major article</i> Conclusão indirecta	8 VHC	Ausentes	A co-infecção <b>não</b> predispõe para concentrações plasmáticas de EFV mais elevadas
Rodríguez-Nóvoa e col, 2005 <i>Brief report</i> Conclusão indirecta	36 VHC	Ausentes	
Maserati e col, 1999 <i>Case report</i>	1 VHC	Cirrose hepática (AST/ALT= 223/149 UI/L)	A co-infecção <b>está associada</b> a concentrações de EFV mais elevadas.
Bickel e col, 2005 <i>Case report</i>	1 VHC	Cirrose hepática	
Robertson e col, 2005 <i>Brief report</i>	10 VHB/VHC	Cirrose hepática (n=4)	
Barreiro e col, 2007 <i>Major article</i>	46 VHC	Grau de Fibrose ( <i>Fibroscan</i> ) Com e sem cirrose hepática	

n: número de indivíduos co-infectados em cada estudo. VHB: vírus da hepatite B. VHC: vírus da hepatite C, ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase.

## 4.2 Enquadramento e Objectivos

A contradição entre os dados de concentrações de EFV na população VIH co-infectada pelo VHB/VHC é provavelmente devida à escassez de dados e à heterogeneidade da função hepática dos doentes incluídos. No presente trabalho postulámos que a presença de co-infecção *per se* não influencia as concentrações plasmáticas de EFV e procurou-se contribuir para estabelecer as indicações para a TDM deste ARV na população co-infectada. Como objectivo para este capítulo, pretendeu-se estudar a influência desta co-infecção nas concentrações de EFV, a longo-termo, num grupo de indivíduos homogéneo com função hepática normal.

### 4.3 Métodos

Todos os indivíduos contribuíram com consentimento informado por escrito e afirmaram a adesão ao tratamento. A adesão foi controlada por questionário realizado pelo clínico.

Os indivíduos adultos elegíveis estavam medicados com esquemas HAART que incluíram EFV 600 mg OD, como primeira terapêutica ou com experiência prévia com PI. Não foram realizados ajustes de dose de EFV durante o estudo. Apenas um indivíduo recebeu tratamento para a infecção pelo VHC durante a segunda metade do estudo.

O estudo da função hepática de cada doente foi realizado com base nos marcadores bioquímicos de função hepática (Tabela 10): marcadores de integridade do hepatócito, marcadores de colestase e de capacidade funcional (Gianinni e col, 2005).

A razão AST:ALT (Tabela 11) foi usada como um método não-invasivo para classificar o grau de insuficiência hepática de cada indivíduo (Giannini e col, 2003).

Os marcadores de função hepática foram monitorizados bi-anualmente. A quantificação destes marcadores, assim como os marcadores virológicos (carga viral) e imunológicos (Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>) foi da responsabilidade do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital.

**Tabela 10.** Marcadores bioquímicos utilizados na avaliação da função hepática. Adaptado de Giannini e colaboradores (2005).

Avaliação	Marcador
Integridade do Hepatócito	ALT
	AST
Colestase	AP
	GGT
	Bilirrubina total e directa
Capacidade Funcional	Albumina
	INR

ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. AP: fosfatase alcalina. GGT:  $\gamma$ -glutamilttransferase. INR: *international normalized ratio*.

**Tabela 11.** Associação entre o aumento da razão AST:ALT e o progresso no desenvolvimento de insuficiência hepática. Adaptado de Giannini e colaboradores (2003).

Estádio da doença	N	Razão AST:ALT
Hepatite crónica - Grau de fibrose 0-3	162	0,6± 0,2
Hepatite crónica - Grau de fibrose 4 Cirrose – <i>Child-Pugh</i> classe A	37	1,1±0,4
Cirrose – <i>Child-Pugh</i> classe B e C	53	1,5± 0,5

N: número de doentes incluídos no estudo de Giannini e col, 2003. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase.

## 4.4 Resultados

### **Características demográficas e clínicas dos indivíduos no início do estudo**

O estudo foi conduzido em 27 indivíduos infectados pelo VIH, medicados com EFV 600 mg OD há mais de um mês: 18 negativos para as infecções por VHB e VHC (grupo controlo) e 9 positivos (grupo de estudo) para o VHB (n=2) ou VHC (n=7).

O grupo controlo incluiu 14 homens e quatro mulheres com idade e BMI médio de 43±3 anos e 23±3 Kg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Estes indivíduos estavam em terapêutica com EFV há 14±3 meses: 57% tinham incluído no seu esquema anti-retroviral AZT+3TC e 10 indivíduos recebiam o seu primeiro esquema anti-retroviral.

Os doentes incluídos no grupo de estudo (7 homens e duas mulheres) tinham 39±3 anos e um BMI de 23±3 Kg/m<sup>2</sup>. O tratamento com EFV decorria à 20±3 meses, a combinação AZT+3TC fazia parte do esquema anti-retroviral de 67% deste grupo e para 6 indivíduos este não era o primeiro esquema HAART.

A contagem de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> não diferiu entre indivíduos mono-infectados (504±66 cel/mL) e o grupo de estudo (401±32 cel/mL) e, em ambos os grupos, mais de 70% dos indivíduos tinham carga viral inferior a 50 cópias/mL.

### **Caracterização da função hepática dos indivíduos no início do estudo e ao fim de 24 meses**

Os marcadores de integridade do hepatócito e colestase estudados foram semelhantes em ambos os grupos no início do estudo (Tabela 12): o valor de ALT aos 24 meses foi a única diferença encontrada entre grupos (p=0,0297).

Ao longo do estudo, nos doentes mono-infectados pelo VIH, foram encontradas diferenças na ALT (p=0,0222), na razão AST:ALT (p=0,0267) e nos valores de bilirrubina total (p=0,0118) e directa (p=0,0002) (Tabela 12). Na co-infecção apenas o valor de bilirrubina directa aumentou (Tabela 12).

O valor médio de albumina foi 4,0±0,1 g/dL em ambos os grupos (intervalo de referência 3,4 – 4,8 g/dL) e o valor do INR semelhante no grupo mono-infectado (1,04±0,06) e na co-infecção (1,02±0,04).

### **Concentrações de efavirenz ao longo do tempo.**

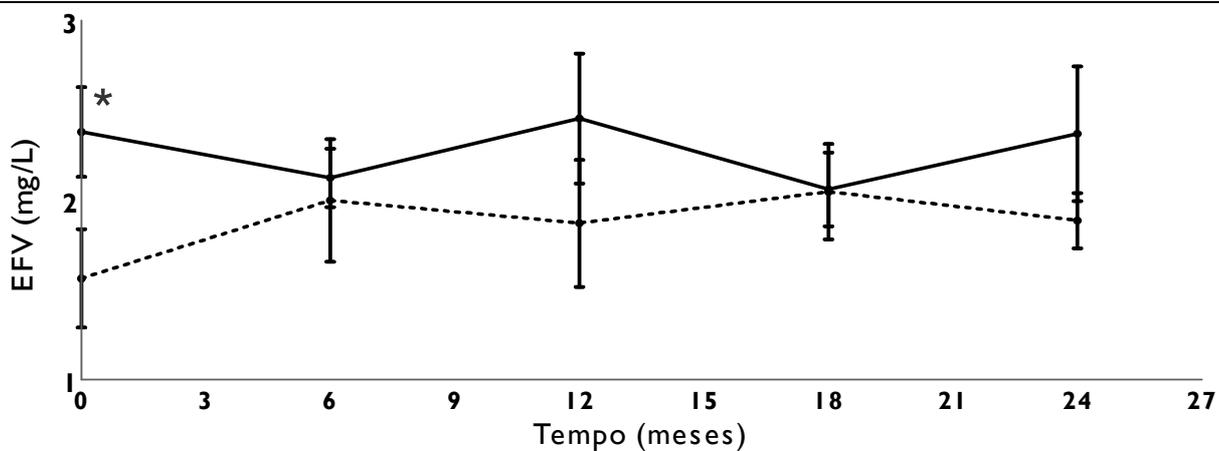
As concentrações de EFV (Figura 21) no início do estudo foram superiores (p=0,036) nos indivíduos mono-infectados (2,37±0,25 mg/L), comparativamente ao grupo da co-infecção (1,56±0,93 mg/L). Contudo, esta diferença desapareceu ao longo do estudo e as concentrações permaneceram semelhantes e no intervalo terapêutico (Marzolini e col, 2001). Não foram encontradas diferenças na variabilidade intra-individual entre o grupo controlo (27±18%) e o grupo co-infectado (37±14%). O CV interindividual nas concentrações plasmáticas de EFV foi 45% e 53% para os grupos controlo e de estudo respectivamente.

**Tabela 12.** Comparação entre os marcadores de integridade do hepatócito e de colestase entre o grupo de estudo (co-infectado) e o grupo controlo (mono-infectado pelo VIH), no início do estudo e após 24 meses de terapêutica com efavirenz.

	Marcador (intervalo de referência)	Duração do estudo	mono-infectados pelo VIH	co-infectados pelo VHB ou VHC	P
Integridade do hepatócito	AST (<31 U/L)	Baseline	27 ± 3	35 ± 4	ns
		Mês 24	24 ± 2	36 ± 7	ns

		P	Ns	ns	
	ALT (<31 U/L)	Baseline	49 ± 5	59 ± 9	ns
		Mês 24	34 ± 3	58 ± 9	0,0297
		P	0,0222	ns	
	AST:ALT (< 1)	Baseline	0,56 ± 0,04	0,71 ± 0,16	ns
		Mês 24	0,85 ± 0,12	0,68 ± 0,04	ns
		P	0,0267	ns	
Colestase	AP (35-104 U/L)	Baseline	89 ± 5	94 ± 9	ns
		Mês 24	80 ± 5	84 ± 9	ns
		P	Ns	ns	
	GGT (<36 U/L)	Baseline	67 ± 13	114 ± 31	ns
		Mês 24	55 ± 10	140 ± 44	ns
		P	ns	ns	
	Bilirrubina Total (<1,00 mg/L)	Baseline	0,31 ± 0,04	0,37 ± 0,06	ns
		Mês 24	0,52 ± 0,07	0,57 ± 0,13	ns
		P	0,0118	ns	
	Bilirrubina Directa (<0,30 mg/L)	Baseline	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,03	ns
		Mês 24	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,02	ns
		P	0,0002	0,0352	

Os valores estão expressos sob a forma de média ± erro padrão da média (SEM). ns: sem significado estatístico ( $p \geq 0,05$ ). ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. AP: fosfatase alcalina. GGT:  $\gamma$ -glutamilttransferase.



**Figura 21.** Concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) ao longo do tempo. A linha contínua representa os indivíduos mono-infectados pelo VIH (n=18) e a linha a tracejado os indivíduos co-infectados pelo VHB ou VHC (n=9). O mês zero corresponde à inclusão dos doentes no estudo. Cada ponto representa a média ± SEM de concentração em cada momento do estudo. \* $p < 0,05$ .

## 4.5 Discussão

Neste capítulo foi realizado um estudo de casos e controlos em 27 indivíduos mono-infectados

pelo VIH ou co-infectados pelo VHC/VHB, com marcadores de função hepática homogêneos e controlados, para o estudo da influência da co-infecção nas concentrações de EFV num período de seguimento de 2 anos. Não foram encontradas diferenças nas concentrações de EFV durante ou no fim do estudo: a presença de co-infecção *per se* não conduziu a concentrações mais elevadas de EFV, o risco de toxicidade-dependente da concentração não é acrescido em indivíduos co-infectados sem alteração da função hepática e as indicações para TDM de EFV nesta população não diferem das descritas para os indivíduos mono-infectados para o VIH.

As alterações no metabolismo hepático de fármacos de indivíduos VIH positivos co-infectados pelos vírus da hepatite podem ser afectadas pela presença de infecção/inflamação causada por estes vírus e pela gravidade da doença hepática. Em geral, assume-se que a lesão dos hepatócitos diminui a metabolização dos fármacos, aumentando as suas concentrações plasmáticas, o que no caso do EFV poderia favorecer a sua neurotoxicidade (Marzolini e col, 2001; Núñez e col, 2001; Gallego e col, 2004; Gutiérrez e col, 2005; Clifford e col, 2005; Gatanaga e col, 2007). Por outro lado, a biotransformação hepática dos fármacos pode estar comprometida durante as infecções pela alteração da actividade dos enzimas do sistema CYP (Lee e col, 1993; Slain e col, 2000; Renton, 2004). A influência da infecção pelos vírus da hepatite no sistema CYP depende do isoenzima em causa: sem diferenças para o CYP1A2 (Becquemont e col, 2002), indução no CYP2A6 (Kirby e col, 1996) e redução da actividade para o CYP2C19 (Adedoyin e col, 1998) e CYP3A4 (Becquemont e col, 2002). Para a actividade do CYP2D6 não estão descritas diferenças (Adedoyin e col, 1998) ou estão indicadas reduções de actividade (Becquemont e col, 2002). Em suma, a actividade destes enzimas é afectada de diferente forma pela presença da infecção VHB/VHC, por outro lado estes indivíduos só pela sua infecção pelo VIH já têm esta actividade alterada. Interessa ainda referir que é difícil distinguir os efeitos da infecção *per se* nestes enzimas porque a sua actividade depende do grau de disfunção hepática, que pode explicar-se por um modelo progressivo de disfunção hepática (Fry e col, 2006), implicando um perfil diferente para cada isoenzima de redução de actividade com os diferentes graus de disfunção.

Na mono-infecção pelo VIH está descrita uma grande variabilidade na actividade do CYP3A4 (Lee e col, 1993; Slain e col, 2000). Sabendo que a variabilidade na actividade do CYP3A4 na população mono-infectada pelo VIH é elevada e que na hepatite viral a actividade está reduzida e como não encontramos dados sob a influência destes vírus no CYP2B6 questionámo-nos qual efeito nas concentrações plasmáticas de EFV da interacção entre os dois vírus? Postulámos que a presença da co-infecção por VHC/VHB *per se* não influenciaria as concentrações plasmáticas do EFV, assumindo que as alterações nas concentrações seriam dependentes do grau de insuficiência hepática. Para este estudo analisámos as concentrações de EFV em grupos homogêneos em termos de marcadores de função hepática: as **concentrações de EFV não diferiram entre os grupos** e as concentrações médias obtidas 8 a 16 horas pós toma de ambos os grupos **estavam dentro da janela terapêutica**. Não se

pode especular sobre a concentração de EFV inferior no grupo co-infectado no início do estudo, dado que o fármaco estava em estado estacionário e o diagnóstico das patologias definido.

A inclusão de EFV na terapêutica anti-retroviral tem também vindo a ser associada ao aparecimento de reacções de hepatotoxicidade que poderão vir favorecidas por concentrações plasmáticas elevadas do fármaco (Kappelhoff e col, 2005). Barreiro e colaboradores (2007) concluíram que as concentrações plasmáticas de EFV (superiores a 4 mg/L) são significativamente mais comuns em indivíduos cirróticos. No entanto, o estudo não incluiu a análise de dados funcionais e o grau de insuficiência hepática foi acedido pela quantificação do grau de fibrose por elastometria. Estes dados estão de acordo com trabalhos anteriores (Maserati e col, 1999; Robertson e col, 2005) e como, em geral, ocorre nos fármacos que sofrem eliminação hepática, é consensual que a cirrose está associada a aumento das concentrações plasmáticas de EFV. No entanto, apesar das vantagens da elastometria como forma não invasiva de categorizar o grau de insuficiência hepática, esta metodologia não está disponível em todos os centros hospitalares e não existiam estudos PK com EFV na co-infecção, para diferentes estadios de doença hepática, especialmente sua fase inicial.

O presente trabalho concentrou-se na função hepática de indivíduos sem indicação clínica para realizar biopsia hepática. Os parâmetros bioquímicos usados para avaliar a função hepática foram interpretados de acordo com as indicações de Giannini e colaboradores (2005) e foi dado um ênfase particular à razão AST/ALT como uma aproximação do grau de fibrose hepática em indivíduos com doença hepática crónica (Giannini e col, 1999). A validação da aplicabilidade desta razão foi também realizada em indivíduos com VHC (Giannini e col, 2003).

No início do estudo, **os marcadores de função hepática eram semelhantes entre grupos**, tendo sido encontrados valores elevados de GGT. Este trabalho não permite tecer considerações a respeito destes valores. Não é possível conhecer se estes valores elevados de GGT se devem ao fármaco ou à co-infecção dado que, no início do estudo, os indivíduos se encontravam em média no 14<sup>o</sup> mês de tratamento com EFV. Os aumentos na GGT foram anteriormente associados com a infecção VIH (Geffriaud e col, 1988) e com concentrações plasmáticas de EFV superiores a 2,18 mg/L, mas apenas nas primeiras 6 semanas de tratamento (Kappelhoff e col, 2005).

No vigésimo quarto mês do estudo, o valor de ALT encontrado nos indivíduos do grupo controlo foi inferior ao grupo de estudo, no entanto a razão AST:ALT não diferiu entre grupos. Na infecção por VHC é sabido que o valor de ALT se caracteriza por um padrão flutuante de concentrações próximas do limite superior do intervalo de referência (Fonquernie e col, 2004; Butt e col, 2007). Como o valor médio encontrado ( $58 \pm 9$  U/L) está incluído no valor considerado normal (3 a 5 vezes o limite superior de referência) apesar do significado estatístico encontrado, do ponto de vista do impacto clínico, não foi dada grande relevância a

esta observação.

As concentrações de bilirrubina total e directa no fim de 24 meses foram superiores em ambos os grupos. Este resultado não era esperado com concentrações de EFV terapêuticas, podendo estar associado ao EFV.

**A ausência de concentrações superiores a 4 mg/L** consideradas tóxicas por Marzolini e colaboradores (2001) encontradas no grupo de estudo é consistente com o trabalho do grupo de Gutiérrez e colaboradores (2005), que não observaram uma maior frequência de reacções adversas devido a uma maior exposição ao EFV nesta co-infecção.

A aliar ao facto de se observarem concentrações terapêuticas, **a presença do VHB/C parece não modificar a variabilidade inter- e intra-individual.**

Os doentes com medicação adicional à HAART não foram excluídos. Contudo, na nossa perspectiva, dado que ainda que os doentes tenham iniciado, parado ou continuado outra medicação que possa interagir com as concentrações de EFV, como os valores de variabilidade intra- e interindividual em ambos os grupos são iguais aos descritos previamente, parece indicador de que estas concentrações não foram alteradas de forma significativa.

O seguimento de 2 anos contribuiu para minimizar a limitação da pequena dimensão do grupo de estudo. Este estudo permite completar a informação disponível não apenas no que respeita aos valores de concentração a esperar na co-infecção, mas também na variabilidade destas quantificações. Este trabalho gerou valores de variabilidade que permitem o cálculo de dimensões de amostra em estudos posteriores, permitindo calcular o número de indivíduos que seriam necessários incluir para encontrar diferença nas concentrações de EFV, se a presença de co-infecção fosse um factor para a sua existência.

## **4.6 Conclusão**

Na população VIH a presença de co-infecção VHB/VHC *per se* não contribui para o aumento das concentrações plasmáticas do fármaco. As indicações para a TDM de EFV em indivíduos co-infectados com função hepática normal devem ser semelhantes aquelas descritas para indivíduos mono-infectados pelo VIH.

# Estudo da alteração dos níveis de HDL-c ao longo de 36 meses em doentes medicados com efavirenz

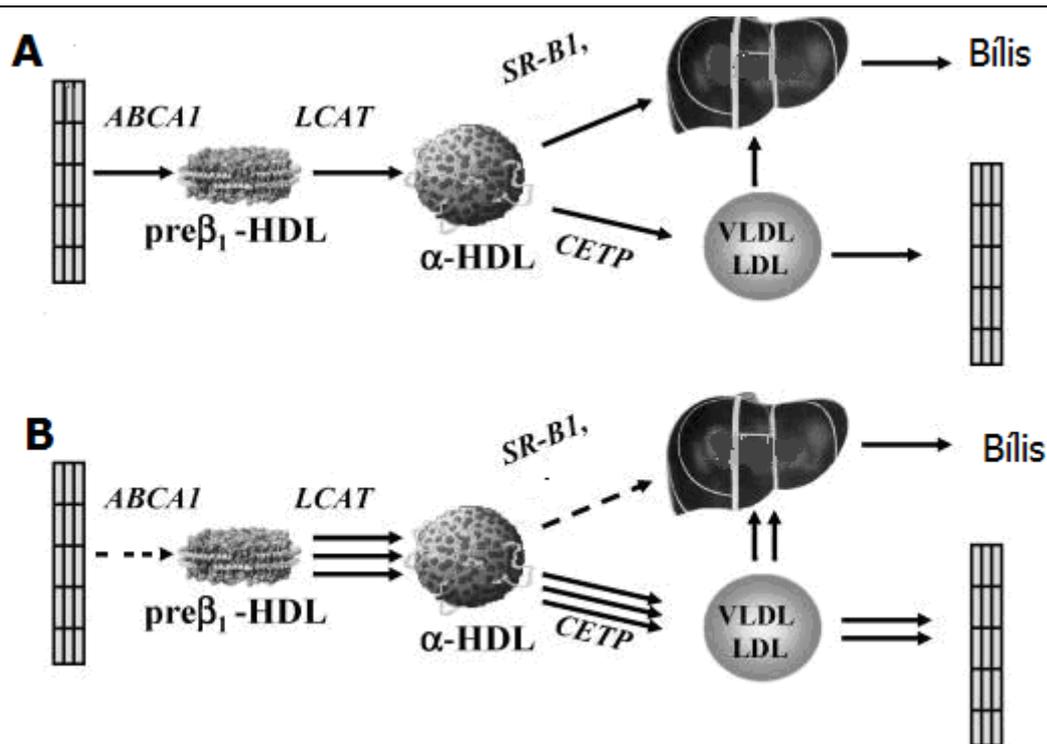
## 5.1 Introdução

Uma vez estudada a variabilidade PK do EFV e os possíveis factores associados a esta variabilidade, procurou-se a existência de outras relações PK/PD para além da eficácia e toxicidade no SNC (Marzolini e col, 2001). O uso de associações medicamentosas, HAART, aumentou a frequência de alterações metabólicas, muitas vezes inerentes às terapêuticas de longa duração. Entre as alterações metabólicas inclui-se a modificação do perfil de lípidos e lipoproteínas que podem não permitir uma maximização dos benefícios da HAART: pela sua associação com a doença cardiovascular e pelas implicações do aumento da intervenção farmacológica específica para o seu controlo, que podem ter um impacto negativo na adesão à terapêutica e/ou necessidade de implementar medidas para alterar comportamentos (ex. hábitos dietéticos e tabagismo, prática de exercício físico).

As alterações nos lípidos e lipoproteínas observadas nos indivíduos infectados pelo VIH podem ter como etiologia a influência directa do vírus e/ou uma reacção adversa à medicação anti-retroviral. Nos desafios da investigação clínica actual, entre os múltiplos factores que condicionam a doença cardiovascular, o valor reduzido de HDL-c é um dos com maior potencial de estudo. Do ponto de vista metodológico, é um bom biomarcador pois é fácil de quantificar. Do ponto de vista epidemiológico, o estudo de Framingham foi dos primeiros trabalhos de identificação do valor de HDL-c como um factor independente para progressão de doença cardiovascular (Gordon e col, 1977). Do ponto de vista fisiológico, foram identificadas diferentes funções das HDL, entre as quais se destacam o transporte reverso de colesterol, função anti-inflamatória e antioxidante (para revisão ver Wang e Briggs, 2004; Kontush e Chapman, 2006; Rader, 2006). Numa perspectiva farmacológica, salienta-se a necessidade de opções terapêuticas para o controlo do metabolismo destas lipoproteínas, sendo as etapas do seu metabolismo potenciais alvos terapêuticos (para uma revisão ver Duffy e Rader, 2005; Oh e Hegele, 2007). Do ponto de vista terapêutico, sendo a HAART uma terapêutica crónica

associada a um aumento de 26% de risco de complicações cardiovasculares por cada ano de utilização (Friis-Møller e col, 2003), este factor deve ser considerado na selecção individual do esquema HAART mais apropriado, promovendo a selecção de esquemas mais cardioprotectores para doentes de risco. Nesta procura da manutenção de um perfil lipídico favorável, é importante salientar que a repercussão da redução dos valores de HDL-c nestes indivíduos vai além do risco cardiovascular, sendo descrita como associada a marcadores de doença, nomeadamente, maior carga viral e menor contagem de  $CD4^+$  (Grinfeld e col, 1992; Zangerle e col, 1994; Fernández-Miranda e col, 1998; Alonso-Villaverde e col, 2003; El-Sadr e col, 2005; Rose e col, 2006; Anastos e col, 2007) ou seja, os valores de HDL-c mais elevados estão associados a um curso da infecção mais favorável.

A associação entre a infecção pelo VIH e o metabolismo das HDL é manifesta (Figura 22), *eg.*, a depleção de colesterol celular reduz a produção de partículas de vírus (Ono e Freed, 2001); a proteína acessória do vírus, Nef, inibe o efluxo de colesterol via ABCA1 em macrófagos (Mujawar e col, 2006) e a concentração e actividade dos lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) estão aumentadas nos indivíduos infectados pelo VIH (Rose e col, 2008).



**Figura 22.** Efeito da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) no transporte reverso de colesterol. **A.** Em indivíduos não infectados: o colesterol é removido maioritariamente das células pelo transportador *ATP binding cassette* classe A do tipo 1 (ABCA-1) com a formação de lipoproteínas de elevada densidade (HDL) pré-β1. Estas partículas sofrem acção da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e são convertidas em partículas esféricas HDL-α. A remodelação destas partículas maduras ocorre via captação selectiva do colesterol esterificado pelo receptor scavenger classe B do tipo 1 (SR-B1) do fígado ou por acção da proteína transportadora de éster de colesterol (CETP). **B.** Nos indivíduos infectados pelo VIH, o efluxo de colesterol via ABCA-1 e a captação selectiva de colesterol via SR-B1 são menores (setas a tracejado) e as actividades dos LCAT e CETP estão aumentadas. Adaptado e modificado de Rose e colaboradores em *Atherosclerosis* (2008).

A infecção VIH está associada a alterações nos valores de lípidos e lipoproteínas: conduz a um decréscimo dos níveis de colesterol, total (TC) e associado às lipoproteínas de baixa

densidade (LDL-c) e HDL-c (Grunfeld e col, 1992; Fernández-Miranda e col, 1998; Riddler e col, 2003; El-Sadr e col, 2005) e a um aumento dos valores de triglicéridos (TG) (Fernández-Miranda e col, 1998). A hipertrigliceridemia pode não se observar em estadios mais prematuros da infecção (Grunfeld e col, 1992; Zangerle e col, 1994), no entanto os decréscimos da HDL-c são visíveis em todos os seus estadios (Grunfeld e col, 1992; Zangerle e col, 1994; Sellmeyer e Grunfeld, 1996; Fernández-Miranda e col, 1998). Um dos estudos que melhor traduz este efeito de redução no colesterol associado a lipoproteínas imputável à infecção é o *Multicenter AIDS Cohort Study* (Riddler e col, 2003). Neste estudo, o único com acesso ao perfil lipídico dos indivíduos num período anterior a infecção, foram analisadas as alterações do perfil lipídico em 50 indivíduos do sexo masculino, na sua maioria Caucasianos (88%), em três períodos: anterior à infecção, após infecção e antes do início da HAART (a maioria (90%) dos indivíduos recebeu mono ou biterapia com NRTI), e após início da HAART com PI. Na fase pós-seroconversão e anterior ao início da HAART é caracterizada por decréscimos de TC (-30 mg/dL), LDL-c (-22 mg/dL) e HDL-c (-12 mg/dL). Uma vez introduzida HAART com PI, aumentam os níveis de TG, TC e LDL-c, permanecendo os valores de HDL-c reduzidos (Riddler e col, 2003) e os valores de LDL-c e TC regressaram a valores semelhantes aos anteriores à infecção. Este regresso a valores basais pode dever-se à melhoria da condição clínica dos doentes após supressão viral e não a um efeito imputável aos fármacos. No entanto, o valor de HDL-c permaneceu baixo após supressão viral com PI. Pelo contrário, os valores de HDL-c aumentaram em doentes medicados com EFV (Tashima e col, 2003; McComsey e col, 2003; Negredo e col, 2004; van Leth e col, 2004b; Dubé e col, 2005; Fisac e col, 2005). Esta alteração bioquímica foi observada em indivíduos, tratados com esquemas HAART que incluíram EFV como primeiro esquema terapêutico, ou como substituição de esquemas terapêuticos prévios contendo PI (Tabela 13). O efeito do EFV no perfil lipídico foi descrito em diferentes trabalhos, apesar de alguns não serem desenhados com esse propósito. Na Tabela 13 comparam-se aqueles que indicaram do valor basal de HDL-c, a % da variação, duração do estudo e para os quais este era, ou não, o seu esquema terapêutico HAART de primeira linha.

Um estudo prospectivo de 48 semanas, com 289 doentes tratados com um primeiro esquema 3TC + d4T + EFV, mostrou aumentos nos níveis de HDL-c, LDL-c, TC e da razão TC:HDL-c associados a esta terapêutica (van Leth e col, 2004b). Neste estudo multicentrico foi observada uma associação entre os aumentos nos níveis de HDL-c e uma redução da carga viral que não pode ser explicada apenas pela melhoria clínica dos doentes (van Leth e col, 2004b). Os aumentos nos níveis de HDL-c em indivíduos sem experiência terapêutica prévia foram confirmados noutros trabalhos (Tashima e col, 2003; Negredo e col, 2004; Dubé e col, 2005). Este efeito foi também descrito em indivíduos, pré-tratados com PI, adultos (Negredo e col, 2004; Fisac e col, 2005) e crianças (McComsey e col, 2003), durante 48-96 semanas.

**Tabela 13.** Alterações no valor de colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade (HDL-c) em indivíduos medicados com efavirenz (EFV) como primeiro esquema anti-retroviral (HAART) ou como substituição de inibidores de protease.

Autores	n	Combinação NRTI	HDL-c basal (mg/dL)*	Variação HDL-c		Duração do estudo (semanas)
				mg/dL	%	
Tashima e col, 2003 <sup>a</sup>	218	3TC + AZT	38	8	21	48
Negredo e col, 2004 <sup>a</sup>	10	ddl + d4T	39	14	27	48
Van Leth e col, 2004b <sup>a, c</sup>	289	3TC + d4T	39	8	34	48
Dubé e col, 2005 <sup>a</sup>	334	ddl + d4T (55%) 3TC+ AZT (45%)	33	7	25	64
Negredo e col, 2004 <sup>b</sup>	10	ddl + d4T	42	6	13	48
Fisac e col, 2005 <sup>b</sup>	32	87% d4T	39	7	15	96

<sup>a</sup>Indivíduos com esquemas HAART contendo EFV como primeiro esquema terapêutico. <sup>b</sup>Indivíduos com experiência terapêutica prévia com inibidores de protease. <sup>c</sup>Indivíduos medicados com 600 mg ou 800 mg de EFV em dose única diária. \* valor médio. n: número de indivíduos incluídos. NRTI: análogos nucleósidos inibidores da transcriptase reversa. 3TC: lamivudina. AZT: zidovudina. d4T: estavudina. ddl: didanosina.

Os efeitos do EFV nas concentrações de TG são aparentemente dependentes da experiência terapêutica prévia. Em indivíduos no primeiro esquema terapêutico não há concordância: não foram descritas alterações (Negredo e col, 2004), foram observados aumentos (van Leth e col, 2004b; Dubé e col, 2005) e estão descritas reduções (Calza e col, 2005). Na experiência prévia com PI descrevem-se reduções (Martinez e col, 2000; Doser e col, 2001; Negredo e col, 2004; Fisac e col, 2005). Dado que os valores de TG estão mais associados a gravidade da doença, a discriminação dos valores basais também é importante e nem sempre facultada. Em alguns trabalhos, o uso de agentes antideslipidêmicos não foi critério de exclusão (*eg.*, Dubé e col, 2005), nem a utilização de doses de EFV de 600 mg ou 800 mg OD (*eg.*, van Leth e col, 2004b) e a avaliação do perfil lipídico em jejum não foi critério de inclusão (*eg.*, Riddler e col, 2003; Tashima e col, 2003; van Leth e col, 2004b)

## 5.2. Enquadramento e Objectivos

Estudos de curta duração (<1 ano) sugeriram que os NNRTI têm vantagens relativamente aos PI sob o ponto de vista do risco cardiovascular (Fisac e col, 2005), mas desconheciam-se os efeitos destes fármacos em terapias de longa duração. A associação entre os aumentos causados pelo EFV no HDL-c e a carga viral (Alonso-Villaverde e col, 2003; van Leth e col, 2004b), a ausência de consenso na atribuição do efeito em particular ao EFV ou em geral ao controlo da replicação através de HAART e a inexistência de estudos clínicos de longa duração representaram a motivação a realização deste estudo onde foram analisados os valores de TC, HDL-c, LDL-c e TG e a relação PK/PD, num grupo de indivíduos em terapêutica com concentrações controladas de EFV a longo-termo (36 meses). Neste capítulo descreve-se o estudo da acção farmacodinâmica do EFV em terapêuticas prolongadas no perfil lipídico,

com especial ênfase ao HDL-c e índice aterogénico TC:HDL-c de indivíduos infectados pelo VIH e a sua relação com a concentração plasmática do fármaco.

### 5.3 Métodos

Neste estudo incluíram-se apenas os indivíduos (n=34) dos quais foram obtidos valores basais destes parâmetros bioquímicos antes da instituição de qualquer terapêutica que incluísse o EFV e foram excluídos aqueles a quem tinham sido prescritos, em algum momento do estudo, fármacos antideslipidémiantes ou tinham instituídas terapêuticas anti-retrovirais que incluíam PI, ou ainda indivíduos com insuficiência renal ou hepática. Os doentes incluídos foram medicados com esquemas HAART incluindo EFV 600 mg OD, como primeira terapêutica ou anteriormente medicados com esquemas que incluíam PI. Todos os indivíduos contribuíram com consentimento informado por escrito e afirmaram a adesão total ao tratamento. A adesão foi controlada pelo responsável pela colheita.

Neste estudo os valores de TG, TC, HDL-c, LDL-c foram obtidos a partir de colheitas de sangue em jejum, antes de iniciarem a terapêutica com EFV e nos meses 3, 6, 12, 24 e 36 após início de terapêutica. Os níveis de TC, TG, LDL-c e HDL-c foram quantificados nos Serviços de Patologia Clínica Hospitalares. Para converter HDL-c, LDL-c e TC de mg/dL em mmol/L multiplica-se por 0,02586. O valor de conversão para os TG é 0,0113.

As amostras de sangue para a quantificação de EFV, segundo o método já descrito no capítulo 2, foram colhidas 8 a 16 horas após a toma do fármaco.

### 5.4 Resultados

Os resultados para os valores de lípidos e lipoproteínas foram analisados da seguinte forma:

- análise da percentagem de indivíduos que tinham valores do parâmetro bioquímico (TC, HDL-c, LDL-c e TG) superior ao valor referência do NECP (*Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults, 2001*) - Figura 23.

- comparação do valor absoluto obtido para cada um dos momentos do estudo (3, 6, 12, 24, 36 meses de terapêutica) com o valor absoluto relativamente ao valor absoluto basal (tempo

0, antes de iniciar EFV).

- análise do significado estatístico percentagem de variação (calculada pela forma [(valor obtido-valor basal)/valor basal]) para cada um dos momentos do estudo (3, 6, 12, 24, 36 meses de terapêutica) - Figura 24.

### **Características demográficas e clínicas dos indivíduos anteriores a prescrição de EFV**

A idade média e o BMI nos doentes incluídos neste estudo foram, respectivamente,  $39\pm 2$  anos e  $24\pm 1$  Kg.m<sup>-2</sup>. A associação entre os valores das HDL-c e a idade ou o BMI não se revelou significativa. A concentração basal média de HDL-c foi  $39\pm 2$  mg/dL e apenas 38% dos indivíduos tinham valores de HDL-c superiores ao valor referência do NECP (40 mg/dL) (Figura 23).

Entre os 34 doentes incluídos, 28 indivíduos eram do sexo masculino e 25 estavam a receber medicação anti-retroviral pela primeira vez. O valor basal médio de HDL-c foi semelhante entre homens e mulheres e no grupo com pré-tratamento com PI ( $42\pm 3$  mg/dL) não foi diferente do grupo a iniciar a primeira terapêutica HAART ( $37\pm 3$  mg/dL). Entre os quatro indivíduos de raça Negra, 2 apresentaram um valor basal de HDL-c inferior a 40 mg/dL.

Quatro indivíduos estavam co-infectados pelo VHC e um pelo VHB. O valor basal de HDL-c nos indivíduos co-infectados foi de  $50\pm 2$  mg/dL e superior ao encontrado nos mono-infectados  $37\pm 2$  mg/dL ( $p=0,023$ , teste *t-Student*) e apenas um dos cinco indivíduos co-infectados tinha valor basal inferior a 40 mg/dL.

### **Efeito do EFV no HDL-c**

O aumento (média±erro padrão da média (SEM) %) observado no HDL-c nos primeiros 3 meses de terapêutica foi  $42\pm 11\%$  (intervalo de confiança 95% (CI) 20-63%;  $p=0,0005$ , *one sample t-test*, Figura 24A). Este efeito permaneceu durante os: 6 ( $36\pm 9\%$ ; CI 17-55%,  $p=0,0004$ ), 12 ( $38\pm 8\%$ ; CI 23-52%,  $p<0,0001$ ), 24 ( $33\pm 8\%$ ; CI 18-48%,  $p<0,0001$ ) e 36 ( $24\pm 7\%$ ; CI 9-38%,  $p=0,0031$ ) meses de tratamento com EFV (Figura 24A). O aumento médio foi de  $34\pm 3\%$  ( $n=5$ ). A comparação entre o valor médio obtido em cada momento de estudo com o mês 3 foi efectuada por ANOVA com pós teste de *Dunnnett* e não revelou diferenças significativas (Figura 24A).

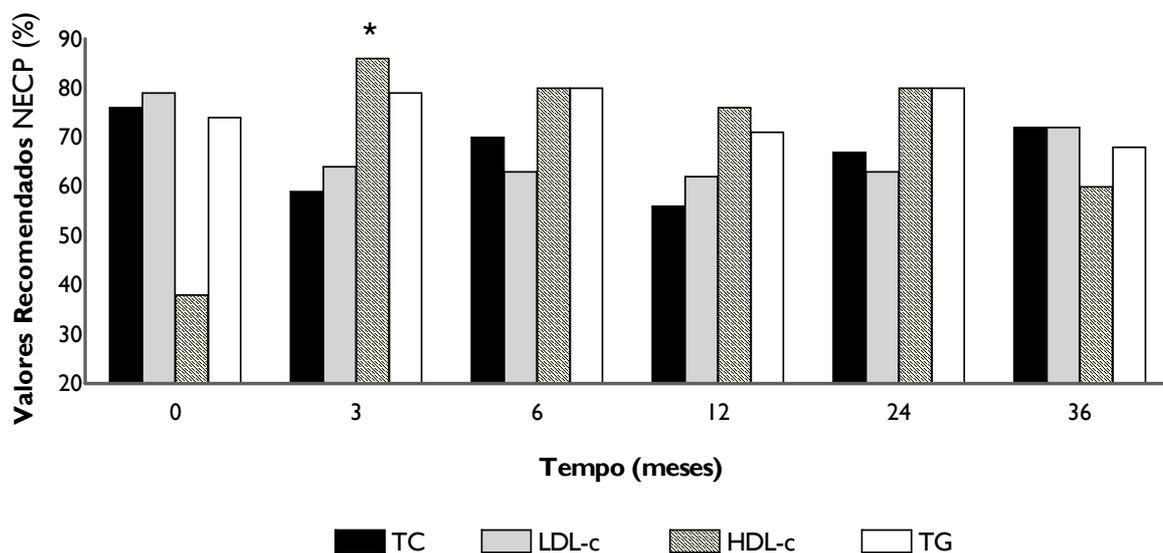
Após 12 meses de tratamento com EFV nos indivíduos co-infectados, a variação de HDL-c foi de  $42\pm 9\%$ , (CI 25-58%,  $p <0,0001$ ) e nenhum dos indivíduos co-infectados VIH/VHB ou VHC

apresentava valores de HDL-c inferior ou igual a 40 mg/dL.

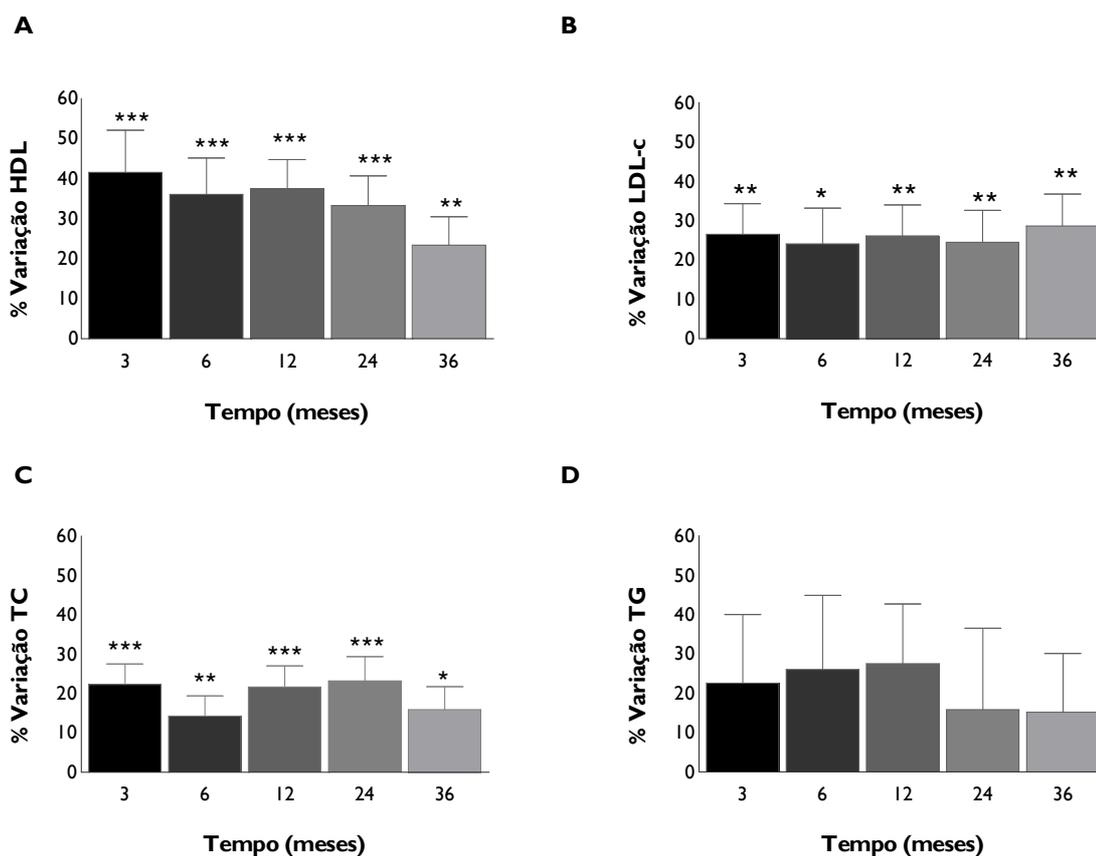
O aumento no valor de HDL-c em valor absoluto, comparativamente ao basal, aos 12 e 36 meses foi  $11 \pm 2$  mg/dL ( $p < 0,0001$ ; *one sample t-test*) e  $7 \pm 2$  mg/dL ( $p = 0,0018$ ), respectivamente (Figura 25). Ao analisar o total de indivíduos, os valores absolutos de HDL-c aos 36 meses não diferem dos basais - o valor só atinge significado estatístico nos doentes com valores basais inferiores a 40 mg/dL. A análise deste efeito do EFV estratificado por valor basal de HDL-c ( $<$  e  $\geq 40$  mg/dL) mostrou que, o efeito foi apenas significativo no grupo que iniciou tratamento com valores basais  $< 40$  mg/dL e que se manteve ao longo do período de seguimento ( $p < 0,001$ , ANOVA e teste de *Dunnnett*) (Figura 25).

A variação do HDL-c(%) foi dependente do valor basal de HDL-c ( $n = 34$ ; *Spearman*  $r = -0,6619$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,4997$ ;  $p < 0,0001$ ): quanto maior o valor basal menor a variação na HDL-c (Figura 26).

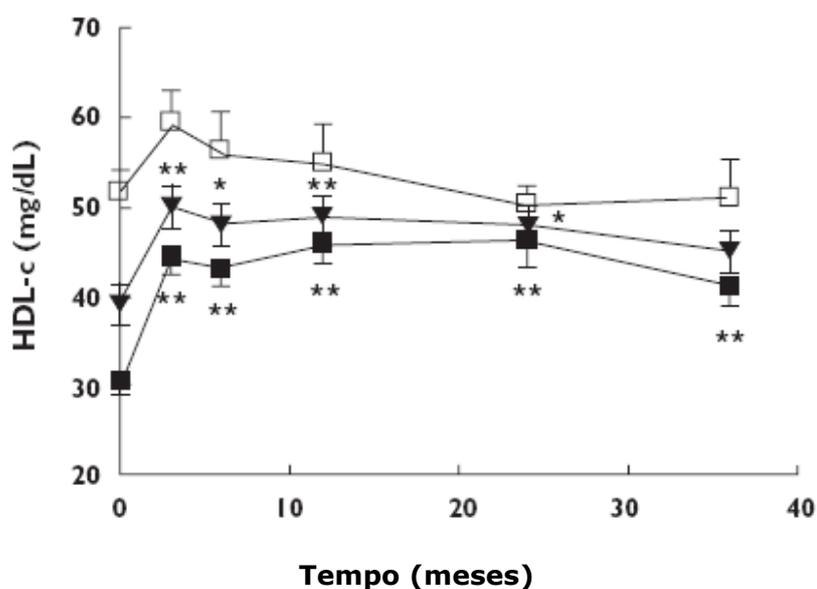
A frequência de indivíduos com valores de HDL-c em concordância com as recomendações do NECP, comparativamente ao basal, duplicou após 3 meses de terapêutica e manteve-se em aproximadamente 80% dos indivíduos ao longo de dois anos, sendo de 60% no fim do estudo (Figura 23).



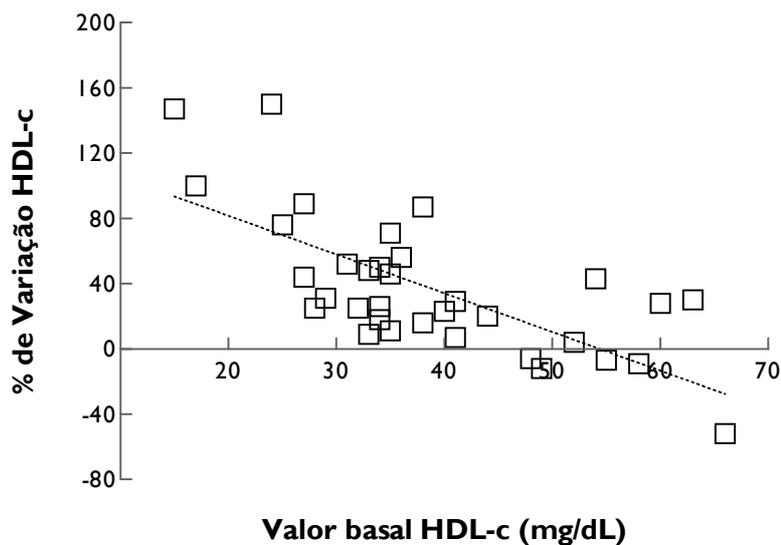
**Figura 23.** Frequência (%) de indivíduos com valores recomendados de colesterol: total (TC  $< 200$  mg/dL), associado as lipoproteínas de baixa (LDL-c  $< 130$  mg/dL) e elevada (HDL-c  $\geq 40$  mg/dL) densidade e de triglicéridos (TG  $< 150$  mg/dL) pelo NECP (National Cholesterol Education Program, 2001), antes (mês 0) e após a introdução o esquema anti-retroviral que incluiu efavirenz (ANOVA com Teste de *Bonferroni*  $*p < 0,05$ ).



**Figura 24.** Variação nos valores de colesterol: associado às lipoproteínas de elevada (HDL-c, A.) e de baixa densidade (LDL-c, B.), total (TC, C.) e triglicéridos (TG, D.) ao longo do tempo de terapêutica anti-retroviral com efavirenz. Cada barra representa o valor médio±SEM. O significado estatístico dos valores médios de cada coluna foram analisados por *One sample t test* \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . A comparação entre média dos valores obtidos em cada ponto de avaliação foi efectuada com o teste ANOVA†.



**Figura 25.** Efeito ao longo do tempo da terapêutica anti-retroviral com efavirenz (EFV) no colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) médio e estratificado por valor basal. O mês zero corresponde aos valores basais: anteriores ao início de EFV. □ Indivíduos com concentrações basais de HDL-c  $\geq 40$  mg/dL (n=9-13). ■ Indivíduos com concentrações basais de HDL-c  $< 40$  mg/dL (n=16-21); ▼ Todos os indivíduos sem estratificação por valor basal de HDL-c (n=25-34). Cada ponto representa o valor médio±SEM. A comparação entre média dos valores obtidos em cada mês e o valor basal foi efectuada com o teste ANOVA com pós teste de *Dunnett* \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 26.** Dependência da variação nos valores de colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade (HDL-c) do valor basal aos 12 meses de terapêutica com efavirenz (n=34; Spearman  $r=-0,6619$ ,  $p<0,0001$ ;  $r^2=0,4997$ ;  $p<0,0001$ ). O valor de variação HDL-c de 0% corresponde aos valores de HDL-c ao fim de um ano de terapêutica igualaram os basais.

### Alterações nos valores de LDL-c

No início do estudo 80% dos doentes tinham valores de LDL-c dentro dos valores de referência (<130 mg/dL) e ao longo do estudo estes valores foram mantidos em 60-70% dos doentes (Figura 23). Não foram encontradas diferenças entre o valor basal de LDL-c ( $99\pm 6$  mg/dL) e os observados nos meses 3, 6, 12, 24 e 36 seguintes:  $118\pm 7$  mg/dL;  $113\pm 6$  mg/dL;  $113\pm 6$  mg/dL;  $114\pm 7$  mg/dL e  $115\pm 8$  mg/dL, respectivamente. O aumento médio da % de variação relativamente ao basal ao longo do estudo foi  $26\pm 1\%$  (n=5) (Figura 24 B).

### Alterações nos valores de TC

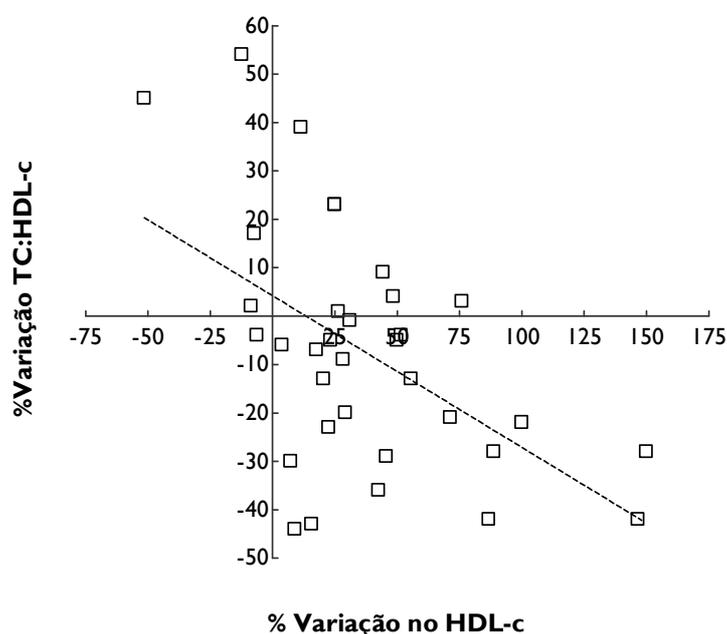
Na Figura 23 é possível observar a frequência de hipercolesterolemia em 25% dos indivíduos no início do estudo. O valor basal de TC foi  $164\pm 8$  mg/dL e foram encontrados aumentos ( $p<0,05$ , ANOVA e pós-teste de *Dunnett*) no seu valor absoluto nos meses 3, 12 e 24:  $193\pm 7$  mg/dL,  $190\pm 7$  mg/dL e  $195\pm 12$  mg/dL. A sua % de variação ao longo do estudo (n=5) foi  $20\pm 2\%$  (Figura 24C).

### Alterações nos valores de TG

Cerca de 25% dos indivíduos apresentavam hipertrigliceridemia no início do estudo, que se manteve ao longo do tempo (Figura 23). A maior variabilidade entre indivíduos foi registada nas concentrações de TG. No entanto, não foram observadas diferenças entre as concentrações absolutas de TG ao longo do estudo comparativamente com o basal, nem se observaram variações significativas (Figura 24D).

## Alterações no índice aterogénico razão TC:HDL-c

Na *baseline*, 12% dos doentes tinham valores da razão TC:HDL-c elevados (superiores a 6,0; Kinoshita e cols, 1994) que passaram a 6% ao fim de 12 meses de terapêutica com EFV. O índice aterogénico TC:HDL-c inicial foi de 4,57 [4,03-5,11], diminuiu no terceiro mês de terapêutica com EFV (-9% [(-17)-(-1)],  $p=0,0312$ ) e permaneceu inferior ao longo de todo o estudo. No entanto, a partir dos 2 anos o decréscimo reduziu-se para metade (-4% [(-14)-8]) e perdeu o significado estatístico. Esta razão, ao fim de 12 meses, revelou-se tanto menor quanto maior a % de variação no HDL-c relativamente ao basal (Figura 27) e não se encontrou associação entre a % de variação na razão TC:HDL-c e a % de variação TC.



**Figura 27.** Correlação entre variação dos valores de lipoproteínas de elevada densidade (HDL-c) e a variação índice aterogénico colesterol total (TC):HDL-c ( $n=34$ ; Spearman  $r=-0,3826$ ,  $p=0,0255$ ). O valor 0% corresponde a valores de HDL-c ou TC:HDL-c ao fim de 12 meses de terapêutica com efavirenz iguais ao seu valor basal.

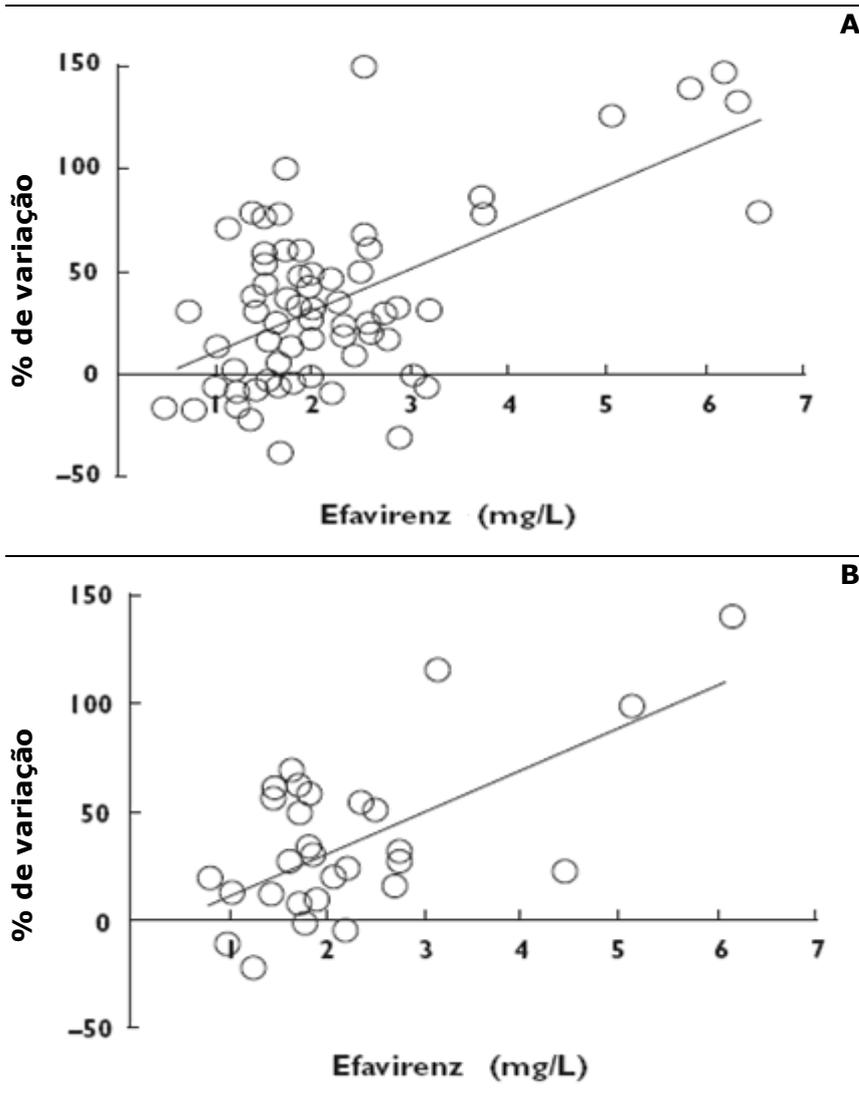
Os valores absolutos da razão TC:HDL-c nos indivíduos co-infectados foi inferior a dos indivíduos mono-infectados ( $p<0,05$ ): na *baseline* ( $3,2\pm 0,4$  vs.  $4,15\pm 0,16$ ) e ao fim de 12 meses de tratamento ( $3,3\pm 0,4$  vs.  $4,78\pm 0,2$ ). A % de variação relativamente ao valor basal não atingiu significado estatístico.

## Relação dos valores de HDL-c com as concentrações plasmáticas de efavirenz.

Encontrou-se uma associação positiva entre as concentrações EFV e o aumento no HDL-c (coeficiente de Spearman  $r=0,3441$ ,  $p=0,0003$ ,  $n=104$ ). Ao incluir apenas os dados obtidos após 12 meses de tratamento com EFV (Spearman  $r=0,3872$ ,  $p=0,0005$ ,  $n=76$ ), onde a influência do tratamento prévio com PI já não se questiona (Figura 28A). As amostras de

plasma obtidas para cada indivíduo entre os meses 12 e 36 foram incluídas para evitar a influência da variabilidade intra-individual nas concentrações plasmáticas de EFV (Figura 28A). Na Figura 28B, está representada a análise com as concentrações médias por doente (n=34, *Pearson*  $r=0,6258$ ,  $p<0,0001$ ;  $r^2=0,3916$ ;  $p<0,0001$ ).

A associação 3TC+AZT foi prescrita em 50% dos indivíduos e o efeito na concentração de HDL-c foi evidente em ambos os grupos: doentes medicados com 3TC+AZT ou com outros esquemas anti-retrovirais concomitantes.



**Figura 28.** Correlação entre as concentrações plasmáticas de efavirenz (EFV) e as alterações nos valores de colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade (HDL-c). O valor de variação de 0% corresponde à igualdade entre o valor de HDL-c entre os 12 e 36 meses de terapêutica e o valor antes do início da terapêutica com EFV. (A) Todas as amostras (n = 76) (*Spearman*  $r=0,3872$ ,  $p=0,0005$ ;  $r^2=0,3735$ ;  $p<0,0001$ ). (B) Valores médios de concentração de EFV e de variação de HDL-c por doente (n=34; *Pearson*  $r=0,6258$ ,  $p<0,0001$ ;  $r^2=0,3916$ ;  $p<0,0001$ ).

### **Alterações na razão TC:HDL-c dos doentes: dependência das concentrações do fármaco.**

Após 12 meses de tratamento foi encontrada uma associação inversa entre as concentrações plasmáticas de EFV e a razão TC:HDL-c (coeficiente de *Spearman*  $r=-0,3439$ ,  $p=0,0012$ ,

n=76). O decréscimo observado nos valores médios de TC:HDL-c corresponde a uma redução significativa no índice aterogénico em 70% dos indivíduos (-18% de diferença do valor basal,  $p < 0,0001$ ).

## 5.5 Discussão

A avaliação do perfil lipídico de 34 indivíduos VIH<sup>+</sup> medicados com esquemas HAART que incluíram o EFV, como esquema inicial ou como substituição de um esquema que incluía PI, permitiu observar que: o EFV está associado a um aumento dos valores de HDL-c ( $34 \pm 3$  %), que é aparente 3 meses após o início e que se mantém ao fim de 3 anos de terapêutica; este aumento é relevante nos indivíduos com valores basais de HDL-c inferiores a 40 mg/dL e dependente da concentração plasmática de EFV atingida 8 a 16 horas após toma do fármaco.

A alteração bioquímica observada nos valores de HDL-c pode atribuir-se a presença de um efeito do fármaco porque se correlaciona directamente com as concentrações plasmáticas de EFV e é independente da experiência terapêutica prévia e dos restantes fármacos que constituíram os esquemas HAART destes indivíduos. Os resultados do presente trabalho sugerem ainda que nos indivíduos com valores basais de TC:HDL-c elevados associados a valores de HDL-c inferiores a 40 mg/dL, o aumento da dose de EFV integrado no TDM pode reduzir o risco de doença cardiovascular destes indivíduos e obviamente minimizar ou excluir a necessidade de associar outros fármacos antideslipidémiantes.

Quando na realização dos estudos de variabilidade surgiram as primeiras concentrações sub-terapêuticas de EFV, que implicavam a indicação ao Clínico para um aumento da dose do fármaco, questionou-se qual a implicação do aumento da dose no perfil lipídico do indivíduo? É fundamental que a estratégia de tratamento da infecção pelo VIH seja encarada, desde o seu início, como uma estratégia a longo prazo. Também é importante considerar que a expectativa de duração deste prazo se tem vindo a alargar, com base na acumulação de resultados de Investigação Clínica. A inexistência destes estudos a longo termo foi um dos grandes motivadores para este trabalho. Se à data, a maioria dos estudos de influência dos ARV se focavam nos efeitos no LDL-c, os estudos de factores de risco cardiovascular na população em geral, contrariamente, realçavam a implicação do HDL-c e dos índices aterogénicos que incluem este valor, nomeadamente a razão TC:HDL-c. Esta conjuntura levou-nos a investigar qual o efeito do EFV sob os valores de HDL-c e a sua dependência da concentração do ARV de modo a se conhecerem melhor os riscos implicados no aumento das concentrações de EFV.

**A toma de EFV conduziu a um aumento dos valores de HDL-c que se manteve durante 36 meses.** No presente trabalho o valor basal de concentração de HDL-c ( $39 \pm 2$  mg/dL) foi inferior ao recomendado pelo *National Cholesterol Education Program* (NCEP), sendo menos de 40% os indivíduos com valor basal de HDL-c superior ou igual a 40 mg/dL. A maioria dos indivíduos incluídos era do sexo masculino (82%) e de raça Caucasiana (88%). Apesar de, entre a população infectada pelo VIH, estarem descritos maiores valores de HDL-c em mulheres (Pernerstorfer-Schoen e col, 2001; Tashima e col, 2003; El-Sadr e col, 2005) e indivíduos de raça Negra (El-Sadr e col, 2005; Anastos e col, 2007), o sexo e a raça dos doentes juntamente com a idade, BMI não influenciaram o valor de HDL-c basal. No entanto, o presente estudo não foi desenhado com o propósito de avaliar estes parâmetros e a dimensão da amostra é reduzida para se tirarem elações. O número de indivíduos com valores de HDL-c inferiores a 40 mg/dL diminuiu para metade após a instituição de HAART com EFV. Os valores de HDL-c após início do tratamento com EFV foram comparáveis aos obtidos por outros autores em indivíduos saudáveis (Ridler e col, 2003; Asztalos e col, 2006). Apesar de em ambos os grupos de indivíduos, a iniciar pela primeira vez terapêutica ou em substituição de terapêuticas com PI mantendo o mesmo esquema de NRTIs, estarem descritos aumentos de HDL-c associados ao EFV (Negredo e col, 2004), optou-se por analisar os resultados ao fim de 12 meses de terapêutica com EFV, minimizando a variável "efeitos da terapêutica anterior". No fim deste período, foi observado um aumento médio de  $11 \pm 2$  mg/dL; o que sugere que o risco acrescido de 22% a 33% de doença coronária associado à infecção VIH (mais 2 a 3% por cada 1 mg/dL de decréscimo de HDL-c - Gordon e col, 1989; Ridler e col, 2003), pode ser revertido. A importância deste aumento induzido pelo EFV é reforçada com o trabalho de Koro e colaboradores (2006): com base em duas medições de HDL-c separadas em média em 2,6 anos, mostraram que um valor inicial de HDL-c mais elevado em 10 mg/dL está associado a - 11% de risco de doença coronária.

A exclusão de doentes medicados com agentes antideslipidémiantes exclui os doentes capazes de experimentar grandes alterações no perfil lipídico. Se o estudo ganhou com uma população mais homogénea, este facto pode subestimar os efeitos do EFV na HDL-c, uma vez que os doentes com valores muito baixos de HDL-c ou muito elevados de TC têm indicação para iniciar fármacos para o tratamento da deslipidémia e não foram incluídos no estudo. Este aumento dos níveis de HDL-c em esquemas com EFV é comparável aos obtidos por outros autores e excede os induzidos por estatinas e fibratos (Negredo e col, 2004).

O perfil de lípidos e lipoproteínas destes indivíduos pode ser modificados após longo tempo de supressão viral, o chamado *return-to-health*. No estudo realizado em indivíduos infectados pelo VIH em que foi mostrada a alteração no perfil lipídico nos períodos pós-infecção e pós-início de tratamento com PI (Riddler e col, 2003), o controlo da infecção levou a aumentos significativos de LDL-c e TC, relativamente ao período sem terapêutica. Estes resultados levaram os investigadores a postular que alguns aumentos nos lípidos pró-aterogénicos,

previamente atribuídos a efeitos da terapêutica, poderiam ser associados a uma melhoria do doente após o controlo da infecção. No entanto, estas alterações por introdução de PI são bastante mais discretas se comparadas com valores basais anteriores à infecção, não sendo explicadas na totalidade pelo efeito *regression-to-the-mean* ou *return-to-health* (Barnett e col, 2005). No entanto, o que Riddler e colaboradores (2003) observaram, após início de terapêutica com PI, foi que este aumento se restringiu apenas aos valores de TC e LDL-c. Estes aumentos podem não se dever aos PI, mas à melhoria dos doentes. Esta linha de raciocínio convida a especular se os PI poderão diminuir o valor de HDL-c e por isso este não regressa ao normal. No trabalho realizado na presente dissertação, após a introdução de EFV no esquema terapêutico dos indivíduos, o valor de LDL-c aumentou  $15 \pm 7$  mg/dL (a infecção está associada a decréscimos de 22 mg/dL) e o de HDL-c aumentou  $11 \pm 2$  mg/dL (a infecção diminuindo 12 mg/dL). Quando expressámos estes dados em % de variação, relativamente ao basal, o valor de LDL-c em valor absoluto médio aumentou 26% (a infecção está associada a decréscimos de 18%) e o HDL-c aumentou 34% (a infecção diminuindo 24%). No entanto, estas variações não ocorreram em todos os indivíduos e o efeito do EFV quando, expresso em % de variação, ultrapassou o descrito como associado à infecção, não justificando a melhoria do doente e o *regression-to-the-mean* o aumento na sua totalidade. Esta evidência foi posteriormente corroborada pelo aumento no valor de HDL-c observado em voluntários saudáveis após toma de EFV (Rosenkranz e col, 2007). A associar a estas premissas existe o facto de que este efeito *regression-to-the-mean* é muito mais pronunciado em indivíduos com valores fisiológicos médios de HDL-c  $\geq 40$  mg/dL (Bartenett e col, 2005), o que nos levou a analisar este efeito discriminado pelo valor basal de HDL-c.

**A % de aumento de HDL-c foi tanto maior quanto menor o seu valor basal.** O aumento do HDL-c tem especial interesse em indivíduos que apresentam valores inferiores ao recomendado, apesar de a relação inversa entre o risco cardiovascular e o valor de HDL-c ser contínua sem valores de patamar. No presente trabalho, a estratificação do valor basal de HDL-c e o seguimento destes indivíduos durante mais de 140 semanas contribuiu para explicar algumas das aparentes controvérsias acerca da implicação do EFV nesta alteração e a correlação com as concentrações do fármaco permitiu reforçar que este efeito é atribuível ao fármaco. A relevância clínica desta alteração bioquímica permanece no entanto em aberto, dado que não foram incluídos *endpoints* cardiovasculares, mas parece importante realçar que a população de estudo tem uma média de idade inferior a 40 anos.

Uma crítica ao nosso trabalho prende-se com a necessidade de obter mais que um valor antes do início da terapêutica de forma a definir um valor basal médio por indivíduo e assim evitar a variabilidade intra-individual nestes valores e a influência de erros que podem ocorrer na medição e no registo de dados.

No presente trabalho, **o EFV foi associado a aumentos do valor de HDL-c numa forma dependente da concentração.** Van Leth e colaboradores (2004b) descrevem uma associação entre os valores superiores HDL-c e uma supressão viral adequada da infecção VIH, observada em doentes medicados com EFV, que não pode ser explicada apenas pela recuperação clínica do doente. A dependência da variação dos valores de HDL-c da concentração do fármaco encontrada na presente dissertação pode explicar esta associação. A concentração de EFV está na base da redução na carga viral (Marzolini e col, 2001), assim como justifica os aumentos do HDL-c. Esta relação sugere que o aumento da dose de EFV pode reduzir o risco cardiovascular destes doentes e tirar mais partido das propriedades anti-infecciosas das HDL, dado que os valores de HDL-c estão associados um melhor curso da doença (Grunfeld e col, 1992; Zangerle e col, 1996; Fernández-Miranda e col, 1998; Alonso-Villaverde e col, 2003; El-Sadr e col, 2005; Rose e col, 2006; Anastos e col, 2007).

**A diminuição do índice aterogénico razão TC:HDL-c é dependente da variação de HDL-c e é superior para maiores concentração de EFV.** Uma maior razão TC:HDL-c, devida a aumento dos níveis de TC e ou diminuições de HDL-c, representa um acréscimo do risco cardiovascular (Gordon e col, 1989; Levy e col, 1990; Anderson e col, 1991; Kannel e col, 1992; Grover e col, 1994; Kinosian e col, 1994; Criqui e Golomb, 1998). A toma de EFV durante 36 meses, mostrou aumento no HDL-c associados a melhoria do índice aterogénico razão TC:HDL-c em mais de 70% dos indivíduos. Aos 12 meses, observaram-se reduções de  $7,5 \pm 4,2\%$  neste índice. Estes valores devem manter-se inferiores a 6 (Kinosian e col, 1994), apesar de uma razão superior 3 já deva ser considerada de risco. Na baseline do estudo, foram observadas razões  $\geq 6$  em quatro indivíduos e razões  $< 3$  em três indivíduos. Aos doze meses de terapêutica, observou-se uma foram observadas razões  $\geq 6$  em dois indivíduos e razões  $< 3$  em sete indivíduos. Os resultados são consistentes com trabalhos anteriores em que se demonstrou o efeito do EFV na fracção protectora HDL, com melhoria das razões LDL-c:HDL-c (Negredo e col, 2004) e TC:HDL-c (Fisac e col, 2005). No trabalho de Negredo e colaboradores (2004) em 20 indivíduos medicados com EFV, 85% melhoraram o índice LDL-c:HDL-c. Deve salientar-se que vários estudos confirmaram que a razão TC:HDL-c é o índice aterogénico que melhor se associa com o risco cardiovascular, mais que os valores de LDL-c ou razão LDL-c:HDL-c (Gordon e col, 1989; Levy e col, 1990; Anderson e col, 1991; Kannel e col, 1992; Grover e col, 1994; Kinosian e col, 1994 ; Criqui e Golomb, 1998). Decréscimos (14%) de 5,95 para 4,70 foram descritos em 32 doentes medicados com EFV em substituição de PI (Fisac e col, 2005). Em contraste, van Leth e colaboradores (2004b) observaram uma ligeira subida em 289 doentes em 48 semanas ( $5,9 \pm 1,9\%$ ). Os resultados sugerem ainda, que nos indivíduos com valores basais de HDL-c reduzidos e índices aterogénicos TC:HDL-c elevados, o aumento da dose de EFV integrado no TDM pode reduzir o risco cardiovascular destes doentes e obviamente minimizar ou excluir a necessidade de associar outros fármacos antideslipidemiantes.

A associação entre o índice aterogénico ou os valores de TG com a concentração do PI LPV (Gutiérrez e col, 2003; González de Requena e col, 2003), *eg.*, foi apontada por outros autores como um argumento para a monitorização sistemática das concentrações destes fármacos (Gutiérrez e col, 2003), apesar de não ser consensual (Torti e col, 2004). Os efeitos da concentração plasmática de NNRTI e PI nos parâmetros lipídicos foram também estudados por outros grupos em doentes com experiência anti-retroviral prévia: não foram descritas relações a curto prazo (12 semanas) entre as concentrações de NNRTI e PI e as concentrações de TC e TG (Clevenbergh e col, 2003). Os valores LDL-c às 52 semanas foram preditos pela concentração de NVP às 12 semanas (Parienti e col, 2007), num grupo de doentes com substituição de terapêutica de NVP para EFV e não se observou no braço que continuou EFV. Uma limitação destes estudos é a ausência de valores basais e o facto de não analisarem a infecção por VHC como uma variável.

Os indivíduos co-infectados com função hepática normal não foram excluídos dado que na ausência de disfunção hepática, como demonstrado nesta dissertação, as concentrações de EFV não diferem daquelas encontradas em indivíduos mono-infectados pelo VIH (ver Capítulo 4). Apesar do número reduzido de indivíduos co-infectados incluídos estes apresentaram razões TC:HDL-c inferiores aos mono-infectados pelo VIH quer na baseline quer ao longo do estudo, sugerindo que o VHC também tem efeito *per se* no perfil lipídico. O padrão lipídico na infecção VHC caracteriza-se por hipocolesterolemia (Siagris e col, 2006), que também é observada na co-infecção por VIH/VHC (Polgreen e col, 2004; Cooper e col, 2007). Esta capacidade de protecção das alterações lipídicas associadas a HAART pela co-infecção por VHC traduz-se por uma menor % de prescrição de fármacos antideslipidiantes nesta população (Polgreen e col, 2004; Cooper e col, 2007).

**A co-medicação com AZT + 3TC ou com outras combinações de fármacos pareceram não influenciar o efeito do EFV sob o HDL-c.** De facto não podemos excluir efeitos associados à utilização de NRTIs ou do TDF. No entanto, estudos anteriores mostram os benefícios metabólicos da substituição de PI por EFV ou NVP, mantendo o restante esquema HAART (Martinez e col, 2000; Negredo e col, 2004; Fisac e col, 2005). Nestes estudos, o EFV incluído no primeiro HAART, às 48 semanas, mostrou aumentos de HDL-c entre 5 e 14 mg/dL quando combinado com d4T+3TC (van Leth, 2004b), AZT+3TC (Gallant e col, 2006) e TDF+FCT e ddI+d4T (Gallant e col, 2006), sendo o aumento entre 10 e 13 mg/dL quando combinado com AZT+3TC (Pozniak e col, 2006; Shikuma e col, 2007), TDF+FCT (Pozniak e col, 2006) e AZT+3TC+ABV (Shikuma e col, 2007) ao fim de 96 semanas. Recentemente, Shikuma e colaboradores (2007) mostram às 24 semanas de tratamento com AZT+3TC+ABV ou AZT+3TC+ABV e EFV, o aumento de HDL-c no grupo com EFV foi o dobro (10 mg/dL) do observado no grupo sem o NNRTI, o que mostra claramente a influência do EFV. A maioria dos indivíduos incluídos no estudo de Riddler e colaboradores (2003) tinha como HAART AZT+3TC e IND e o valor de HDL-c permaneceu inferior ao valor basal e em estudos com o mesmo

esquema de NRTI e EFV são vistos aumentos (Pozniak e col, 2006; Shikuma e col, 2007). Tashima e colaboradores (2003) mostram a variação de HDL-c após 48 semanas de tratamento com AZT+3TC e IND ou EFV (basal de 38 mg/dL): descreveram aumentos para 41 mg/dL e 48 mg/dL no grupo com o IP e no grupo com o NNRTI, respectivamente com a razão TC:HDL a subir no caso do IND e a descer no caso do EFV. Estas comparações não nos permitem excluir os efeitos de NRTI ou do TDF ou do tratamento, mas sugerem que o efeito do EFV os excede.

**O efeito benéfico das concentrações de EFV no valor de HDL-c e índice aterogénico suporta a importância da TDM e esta dependência da concentração pode ajudar a elucidar o mecanismo.**

Recentemente têm sido divulgados estudos que distinguem os efeitos das diferentes classes anti-retrovirais no perfil lipídico (Clevenbergh e col, 2003; Fontas e col, 2004; Young e col, 2005; Anastos e col, 2007; Shlay e col, 2007) embora à data da realização do presente trabalho nada se soubesse sobre os mecanismos subjacentes a estes efeitos, nem mesmo qual a contribuição da infecção pelo VIH *per se*. O EFV foi associado a uma sobreexpressão do MDR-1 (Chandler e col, 2003). Este gene codifica para a P-gP, um transportador de efluxo de múltiplas moléculas, dependente de energia. A expressão da P-gP, em aditamento à influência dos polimorfismos do gene MDR-1, pode estar alterada em estados infecciosos/inflamatórios (para uma revisão ver Petrovic e col, 2007). Foi sugerido que a sobreexpressão da P-gP induzida pelo EFV em doentes VIH, possa aumentar o transporte reverso do colesterol, facultando um aumento do HDL-c (Allonso-Villaverde e col, 2005). Estes aumentos de HDL-c em indivíduos medicados com EFV são limitados aos genótipos CC e CT do MDR1, com aumento nos valores de HDL-c de 37% e 12%. A frequência deste polimorfismo varia bastante nas diferentes populações étnicas, sendo a P-gP mais expressa nos indivíduos de raça Negra, onde os genótipos CT e CT são mais comuns (Schaeffeler e col, 2001). A população Negra (Ganeses, Quenianos, Afro-americanos e Sudaneses) tem o dobro da frequência de genótipo CC e CT (80%) que a população Caucasiana Portuguesa (43%) (Ameyaw e col, 2001). De facto, os valores de HDL-c na população Negra são maiores que em indivíduos Caucasianos (El-Sadr e col, 2005; Anastos e col, 2007). Indivíduos com genótipo CC têm também maiores concentrações plasmáticas EFV (Fellay e col, 2002). Por outro lado, os níveis de colesterol regulam os enzimas do sistema CYP450, mantendo a homeostase do colesterol e ateroprotecção e os fármacos que induzem este sistema enzimático despromovem o processo aterogénico (para uma revisão ver Luoma, 2007). As concentrações de HDL-c e apoproteína (apo) AI variam proporcionalmente com a quantidade de alguns destes isoenzimas no fígado, entre os quais o CYP3A4. O EFV é um indutor deste isoenzima, sendo este mais um possível mecanismo pelo qual se pode explicar este aumento. Da mesma forma que explica o contrário observado para os PI, que para se aumentar a sua biodisponibilidade, são na maioria das vezes co-administrados com RTV, um conhecido inibidor deste enzima. Quando em 2006 publicámos, no *British Journal of Clinical Pharmacology*, os dados que mostravam a dependência da concentração de EFV no aumento de HDL-c, pouco se sabia sobre o

mecanismo de acção da terapêutica e do próprio vírus sobre o metabolismo das HDL. Em 2008, Rose e colaboradores mostraram que os indivíduos VIH<sup>+</sup> têm actividades LCAT e CETP aumentadas (Rose e col, 2008), associadas a uma diminuição do efluxo de colesterol via ABCA-1 (Mujawar e col, 2006) e, como consequência, as HDL nestes doentes têm alterações na estrutura e função. Estando o EFV associado a aumentos de HDL-c podemos com estes resultados recentes especular possíveis locais para a acção do fármaco que, contrariando os efeitos da infecção, serão o transportador ABCA-1 - aumento da taxa de maturação da HDL por estímulo do efluxo de colesterol dos tecidos periféricos; ou actuando na CETP - diminuição do catabolismo da HDL.

A elevada frequência de baixos valores de HDL-c nesta população merece atenção e o interesse de continuar este seguimento com controlo das concentrações de EFV. Estudos posteriores são necessários para clarificar a importância clínica deste facto e para elucidar o mecanismo pelo qual o EFV aumenta o HDL-c. Contudo, este estudo permite inferir que: o perfil menos aterogénico do EFV pode estar entre os factores a considerar na selecção do esquema terapêutico mais indicado para o tratamento de um indivíduo infectado pelo VIH; a inclusão de agentes antideslipidémiantes em esquemas terapêuticos de indivíduos com índices aterogénicos elevados e a iniciar terapêutica com EFV pode provavelmente ser evitada e que a TDM nestes indivíduos pode ser útil para melhorar o perfil lipídico.

## **5.6 Conclusão**

Pela primeira vez foi demonstrado que o efeito do EFV no HDL-c permanece pelo menos durante 36 meses, que foi apenas significativo em indivíduos que iniciaram a terapêutica com valores basais de HDL-c <40mg/dL e que este aumento é dependente da concentração plasmática do fármaco.

# Actividade paraoxonase-1 em indivíduos medicados com efavirenz

## 6.1 Introdução

No capítulo anterior foi descrito o efeito quantitativo positivo do EFV no HDL-c. Posteriormente, este efeito foi estudado em termos qualitativos, nomeadamente na função antioxidante destas lipoproteínas. As HDL são partículas muito heterogéneas contendo vários níveis de antioxidantes ou de pró-oxidantes que resultam na variação da sua função. O seu efeito protector cardiovascular está, em parte, relacionado com a presença de enzimas antioxidantes associados a estas lipoproteínas (van Lenten e col, 1995; Watson e col, 1995; Navab e col, 1997; Ansell e col, 2003). O reconhecimento de que um número significativo de manifestações de doença cardiovascular ocorre em doentes com valores normais de HDL-c e LDL-c (Castelli e col, 1986), originou a procura de biomarcadores adicionais com valor qualificativo mais sustentado.

A paraoxonase-1 (PON-1, EC 3.1.8.1) é um enzima expresso no fígado e excretado na corrente sanguínea onde circula associada à fracção das HDL que contém Apo-AI (Blatter e col, 1993). Este enzima foi mecanisticamente associado ao stress oxidante sistémico e prospectivamente ao risco de doença cardiovascular (Bhattacharyya e col, 2008), o que indica um potencial mecanismo para a sua função ateroprotectora e, neste contexto, pode considerar-se uma ferramenta de avaliação da qualidade das HDL, nomeadamente da sua função antioxidante.

A PON-1 impede a formação de hidroperóxidos lipídicos (Mackness e col, 1991; Watson e col, 1995) e, uma vez formados, promove a sua hidrólise. Para além da inibição da oxidação das LDL, a PON-1 tem capacidade de proteger as HDL de oxidação e preservar a sua integridade e função (Nagano e col, 1991; Aviram e col, 1998 e 1999; Mackness e col, 1993; Oda e col, 2002; Deakin e col, 2007).

Navab e colaboradores (1997) estudaram a actividade da PON-1 num grupo de indivíduos com aterosclerose coronária documentada, que eram normolipidémicos e não diabéticos. A maioria tinha níveis baixos de HDL-c e de PON-1. Ao compararem este grupo com um grupo saudável com os mesmos valores baixos de HDL-c, observaram que os valores de PON-1 eram superiores. Estes resultados sugerem que as propriedades antioxidantes das HDL podem ser mais úteis para distinguir o risco cardiovascular que o valor de HDL-c.

Apesar de um estudo transversal (Horter e col, 2002) e alguns estudos de casos e controlos (Karakaya e col, 1999; Rahmani e col, 2002; Troughton e col, 2008) não mostrarem uma associação consistente entre actividade da PON-1 e diferentes manifestações de doença cardiovascular, esta associação foi encontrada na maioria dos estudos de casos e controlos (McElveen e col, 1996; Ayub e col, 1999; Jarvik e col, 2000 e 2003; Kim e col, 2007) e em 2 estudos prospectivos (Mackness e col, 2003; Bhattacharyya e col, 2008).

A PON-1 tem a capacidade de prevenir a peroxidação lipídica (Mackness e col, 1993), no entanto, a sua actividade é inibida na presença de LDL e HDL oxidadas (Navab e col, 1997; Aviram e col, 1999), ou seja a actividade do enzima é inibida em condições de stress oxidante, como as que ocorrem na infecção pelo VIH (Gil e col, 2003; Ngondi e col, 2006; Masiá e col, 2007). Este grupo de indivíduos apresenta maior concentração de LDL oxidadas (Duong e col, 2006), actividade da PON-1 inferior e maior concentração de enzima (Parra e col, 2007), comparativamente com voluntários saudáveis. Recentemente, Masiá e colaboradores (2007) compararam a concentração total de peróxidos lipídicos num grupo de doentes (95 medicados com NNRTI e 52 com PI) e mostraram uma associação entre NNRTI (sendo a maioria dos doentes medicado com EFV) e baixas concentrações de peróxidos lipídicos.

## **6.2 Enquadramento e Objectivos**

Sabendo que o EFV aumenta a concentração de HDL-c, procuramos estudar a qualidade destas HDL, nomeadamente a sua função antioxidante. No trabalho apresentado no presente capítulo, foi objecto de estudo a influência do EFV na actividade da PON-1.

## **6.3 Métodos**

Homens e mulheres adultos a receber 600 mg OD de EFV foram convidados a participar. Um segundo grupo de indivíduos com infecção VIH documentada mas sem indicação para iniciar terapêutica foi considerado como controlo.

Valores de AST ou ALT superiores a 5x o limite superior do intervalo normal, prescrição de fármacos para o controlo de deslipidemias e co-infecções virais foram considerados critérios de exclusão.

Para a realização deste estudo foram recrutados 46 indivíduos infectados pelo VIH e incluídos num de dois grupos: (1) vinte e um sem indicação para receber tratamento (grupo controlo) e (2) vinte e cinco doentes com o seu primeiro esquema anti-retroviral que incluiu EFV 600 mg OD (grupo de estudo).

Todos os indivíduos contribuíram com consentimento informado por escrito e afirmaram a adesão ao tratamento. A adesão foi controlada através de um questionário realizado pelo responsável pela colheita.

No Laboratório de Patologia Clínica Hospitalar foram medidos os valores de lípidos e lipoproteínas descritos no capítulo 5, os marcadores de função hepática estudados no capítulo 4, a carga viral e contagem de LyT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>.

A concentração do fármaco e actividade do enzima foram medidas no Laboratório de Farmacologia a partir da mesma amostra de sangue.

As amostras de sangue foram colhidas no intervalo de tempo entre a toma e a colheita estabelecido no Capítulo 2 e o EFV foi quantificado segundo o método de HPLC descrito no Capítulo 1. Estas amostras foram colhidas em jejum, centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos e armazenadas a -80 °C para posterior análise. A actividade da PON-1 foi medida por um método descrito por Bataca e colaboradores (2007), baseado na capacidade do plasma de hidrolisar o paraoxon. Este composto, numa reacção catalisada pela PON-1, origina p-nitrofenol e ácido dietil-fosfórico. O meio de reacção é constituído por um tampão glicina (0,05 mol/L; pH=10,5 com 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>). A temperatura de reacção foi 37 °C. A formação de p-nitrofenol é quantificada por espectrofotometria e a actividade do enzima obtida usando um coeficiente de extinção molar de 18,290 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> é expressa em U/L, (definida como 1 µmol de p-nitrofenol formado por minuto e por litro).

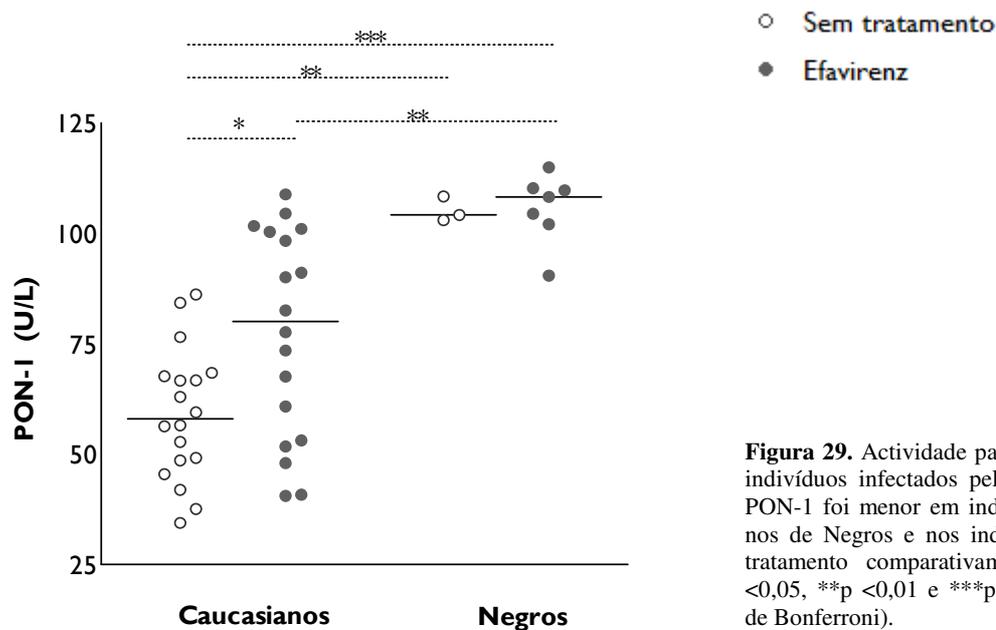
O paraoxon é muito instável e deve ser preparado imediatamente antes de usar. Este composto é tóxico e as soluções devem ser manipuladas numa câmara de extracção e o operador deve ter como precauções o uso de máscara e luvas para se proteger de contacto accidental ou inalação de fumos tóxicos.

## 6.4 Resultados

A actividade da PON-1 foi superior nos indivíduos tratados (n=25; média [IC 95%]: 85,46 [75,49–95,44] U/L) que nos indivíduos não tratados (n=21; 65,58 [55,77–75,39] U/L) (p=0,0067; teste t-Student).

Como as características demográficas podem influenciar a actividade do enzima, foi conduzida uma análise multivariada, para assegurar que a influência do tratamento se tratava de uma associação independente. A independência do efeito da idade, sexo, raça e tratamento com EFV na actividade PON-1 foi acedida no modelo de regressão múltipla que revelou a raça e o tratamento com EFV como sendo independentemente associados com a actividade da PON-1 (respectivamente, t=2,44, p=0,019 e t=4,879, p<0,001).

A actividade da PON-1 foi inferior (p<0,0001, Figura 29) nos indivíduos de raça Caucásiana (n=36; 68,64 [61,28-76,01] U/L) relativamente aos indivíduos de raça Negra (n=10; 105,6 [100,9-110,3] U/L). Face a esta diferença, optou-se por analisar os dois grupos étnicos em separado.



**Figura 29.** Actividade paraoxonase-1 (PON-1) em indivíduos infectados pelo VIH. A actividade da PON-1 foi menor em indivíduos Caucásianos que nos de Negros e nos indivíduos Caucásianos em tratamento comparativamente aos tratados. (\*p <0,05, \*\*p <0,01 e \*\*\*p <0,001 ANOVA e teste de Bonferroni).

Entre os 36 doentes Caucasianos foram constituídos 2 grupos: o grupo controlo constituído por indivíduos sem tratamento (n=18) e o grupo de estudo constituído por indivíduos a receber primeiro esquema HAART incluindo 600 mg OD de EFV e que estavam em tratamento há mais de 3 meses (n=18).

### **Actividade PON-1 em indivíduos Caucasianos**

Na Tabela 14 estão descritas as características demográficas, contagens de Ly TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, perfil lipídico e de parâmetros de função hepática dos dois grupos de indivíduos Caucasianos: controlo e em tratamento com EFV. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos.

Parâmetro	Indivíduos Caucasianos VIH positivos	
	Controlo Sem tratamento	Estudo Tratamento com EFV
Número de indivíduos, n	18	18
Homens (n)	11	15
Idade (anos)	38 [32-43]	44 [37-51]
BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	25 [22-28]	23 [22-25]
GGT (U/L)	32 [13-50]	49 [20-77]
AP (U/L)	65 [52-78]	87[69-104]
AST (U/L)	24 [15-33]	20 [17-23]
ALT (U/L)	38 [20-55]	29 [20-39]
Contagem de Ly TCD <sub>4</sub> <sup>+</sup> (cel/mm <sup>3</sup> )	492 [397-588]	594 [445-742]
TC (mg/dL)	179 [159-200]	187 [173-200]
LDL-c (mg/dL)	118 [98-138]	115 [99-131]
HDL-c (mg/dL)	48 [42-54]	46 [39-52]
TG (mg/dL)	89 [68-109]	126 [90-162]
Razão TC:HDL-c	3,86 [3,30-4,14]	4,35 [3,71-4,98]

**Tabela 14.** Comparação entre variáveis demográficas e clínicas entre os grupos de indivíduos Caucasianos infectados pelo VIH sem tratamento (grupo Controlo) e tratados com efavirenz (grupo de Estudo).

Os dados estão expressos como média mais [95% CI]; BMI: índice de massa corporal. GGT:  $\gamma$ -glutamilttransferase (intervalo de referência (IR) <36 U/L). AP: fosfatase alcalina (IR 35-104 U/L). AST: aspartato aminotrasferase (IR <31 U/L). ALT: alanina aminotrasferase (IR <31 U/L). TC: colesterol total (IR <200 mg/dL). HDL-c: colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade (IR >40 mg/dL). LDL-c: colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (IR <130 mg/dL). TG: triglicéridos (IR <150 mg/dL).

Ambas a actividade da PON-1 e razão actividade da PON-1:HDL-c diferiram entre grupos (Figura 29, Tabela 15). A actividade da PON-1 de 58,80 U/L e 77,35 U/L encontradas no plasma de indivíduos Caucasianos tratados e não tratados, respectivamente, corresponde aproximadamente a 73,14 U/L e 92,07 U/L em soro (Ferré e col, 2005).

No grupo tratado foi estudada a influência do esquema anti-retroviral concomitante. A actividade da PON-1 foi idêntica entre os indivíduos (n=7) em tratamento com HAART constituído por 3TC+AZT (78,94 [54,01-103,9] U/L) e (n=8) medicados com TDF+FCT (78,75 [58,92-98,58] U/L).

Os doentes incluídos no grupo de estudo estavam em terapêutica há mais de 3 anos (48 [30-65] meses). A média das concentrações plasmáticas de EFV foi 2,47 [1,80-3,15] mg/L e a actividade da PON-1 não se mostrou dependente da concentração plasmática do fármaco.

**Tabela 15.** Comparação da actividade da paraoxonase (PON-1) e razão actividade PON-1:HDL-c de indivíduos Caucasianos infectados pelo VIH sem tratamento (Grupo Controlo) e tratados com efavirenz (Grupo de Estudo).

Parâmetro	Indivíduos Caucasianos VIH positivos		P
	Sem tratamento	Controlo	
Actividade PON-1 (U/L)	58,80 [51,36-66,23]	77,35 [65,66-89,04]	<0,05
Razão Actividade PON-1:HDL-c	1,30 [1,11-1,49]	1,88 [1,49-2,28]	<0,01

## 6.5 Discussão

No presente estudo pela primeira vez foi descrito o efeito positivo do EFV na PON-1. Este estudo permitiu também mostrar que a população Caucásiana tem valores inferiores de actividade PON-1 comparativamente à Negra e que a raça não pode ser excluída em estudos com actividade PON-1.

**A actividade PON-1 é superior em indivíduos infectados pelo VIH medicados com EFV comparativamente a indivíduos infectados não tratados.** O número de trabalhos sob a actividade da PON tem crescido nos últimos anos, dada a sua relação com o risco cardiovascular e a sua capacidade de promover efeitos antioxidantes sistémicos no Homem (Mackness e col, 2003 e Bhattacharyya e col, 2008). O stress oxidante sistémico promove o desenvolvimento de doença cardiovascular, o que confere às estratégias terapêuticas antioxidantes um potencial interesse clínico. As concentrações e actividade da PON-1 estão alteradas em doenças crónicas (Ferré e col, 2006 e Parra e col, 2007), provavelmente em resposta ao stress oxidante acrescido que normalmente se observa em fases iniciais destas

doenças. Nos indivíduos VIH<sup>+</sup> está descrito, comparativamente com uma população de indivíduos VIH<sup>-</sup>, um aumento da expressão hepática e uma menor actividade da PON-1 (Parra e col, 2007). Recentemente, os marcadores de stress oxidante, o perfil lipídico e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo VIH têm sido motivo de estudo de vários grupos (Anastos e col, 2007, Masiá e col, 2007, Riddler e col, 2007 e Rose e col, 2006 e 2008). Contudo, existe alguma discrepância entre os resultados descritos, o que pode estar relacionado com a falta de valores basais dos parâmetros analisados, com a inclusão de doentes medicados pela primeira vez e com experiência anti-retroviral prévia e com diferentes co-infecções, co-patologias e/ou co-medicação, sendo normalmente estudado o efeito de HAART e não distinguindo a contribuição individual de cada fármaco ARV. Também é relevante distinguir se estamos em presença de um efeito da infecção ou do tratamento, bem como conhecer a dependência individual da concentração plasmática de cada fármaco.

No presente trabalho foi estudado o efeito do EFV na actividade da PON-1. Para isso, foi escolhido como controlo, um grupo de indivíduos infectados com VIH sem tratamento, de forma a excluir a variável efeito da infecção. Neste grupo a actividade enzimática é baixa, podendo apenas especular-se se será consequência da inibição por peróxidos lipídicos e/ou de alterações estruturais nas HDL. Neste estudo não foram analisados marcadores de stress oxidante, contudo, está descrito um aumento de espécies reactivas de oxigénio nestes indivíduos (Masiá e col, 2007). O aumento de formação de peróxidos lipídicos que reagem com os grupos sulfidrilo do enzima podem inibir a sua actividade (Aviram e col, 1999). Por outro lado, as alterações na estrutura e composição das HDL podem afectar a actividade da PON (para uma revisão ver James e Deakin, 2004). Como referido (capítulo 5), a proteína acessória do vírus, Nef, inibe o efluxo de colesterol via ABCA-1 em macrófagos (Mujawar e col, 2006) e a concentração e actividade de LCAT e CETP estão aumentadas nos indivíduos infectados pelo VIH (Rose e col, 2008), modulando a composição das HDL e, por conseguinte, podem alterar a actividade e função da PON-1.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o efavirenz aumenta a actividade da PON-1. No entanto, o mecanismo pelo qual este efeito ocorrer permanece especulativo. Nos indivíduos não tratados a menor actividade PON-1 pode resultar de uma maior inactivação do enzima devido a formação acrescida de espécies reactivas de oxigénio (Masiá e col, 2007). O fármaco poderá conduzir a uma redução da quantidade de peróxidos lipídicos formados, por funcionar como um captador destas espécies reactivas de oxigénio, permitindo uma menor inactivação do enzima. Por outro lado, foi sugerido que alterações na estrutura e composição das HDL possam afectar a actividade e função da PON-1 (James e Deakin, 2004). O EFV poderá conduzir a alterações estruturais nas HDL, por actuar no seu metabolismo, estabilizando o enzima. Outra hipótese é o EFV ser indutor da PON-1.

A actividade de PON-1 foi 38% superior no grupo tratado, semelhante ao efeito causado pelo EFV nos valores de HDL-c. Como no presente trabalho não se incluiu um grupo de estudo

com indivíduos tratados com outros esquemas HAART sem efavirenz, não se pode excluir que o efeito se deve ao tratamento. Contudo, **o EFV está associado a uma maior a razão actividade da PON-1:HDL-c** e PON-1 é descrita como preferencialmente associada a estas lipoproteínas. Assim, esperar-se ia que aumentado o HDL-c, aumentaria a PON-1 e portanto a razão permaneceria igual nos dois grupos. No entanto, o valor desta razão é superior no grupo de estudo, o que sugere que pelo menos parte da maior actividade PON-1 é independente da concentração de HDL-c. De facto, não se encontrou uma associação entre os valores da actividade da PON-1 e os valores de HDL-c mas, como já mencionado, esta relação deveria ser obtida a partir das % de efeito e não dos valores absolutos.

**Os valores de actividade da PON-1 não estavam associados às concentrações plasmáticas de EFV.** A associação com as concentrações é importante para distinguir a atribuição do efeito ao fármaco ou o tratamento e aparentemente não suporta um efeito do fármaco. Contudo, esta relação deve ser estudada entre a concentração de EFV e a % de variação na actividade da PON-1, após a introdução do fármaco, e não com o valor absoluto de actividade enzimática.

**A raça dos indivíduos constituiu um factor que influencia os valores de actividade do enzima PON-1.** Apesar de estar descrito que a distribuição dos polimorfismos da PON-1 varia com a raça (Chen e col, 2003; e Thyagarajan e col, 2008), tem sido sugerido que na avaliação do risco cardiovascular a actividade e/ou concentração do enzima em detrimento dos genótipos deve ser usada, salvaguardando a importância de estudos funcionais (Richter e col, 1999; Jarvik e col, 2000; Mackness e col, 2001 e Mackness e col, 2004). O único estudo funcional encontrado que refere as diferenças inter-raciais na actividade deste enzima data de 1976. O grupo de Playfer (1976) mostrou que a distribuição da actividade da PON-1 nas populações Orientais (Malaia e Chinesa) e Africana (Queniana e Nigeriana) é unimodal. Na população Caucasiana (Britânica) é bimodal, sendo por isso esperado que um sub-grupo de Caucasianos tivesse uma menor actividade da PON-1. Contudo, os diferentes estudos de actividade deste enzima não mencionam qualquer referência à raça dos indivíduos. No presente trabalho foi encontrada uma diferença inter-racial muito evidente na actividade PON-1. Pode questionar-se que a distribuição na população Portuguesa possa ser diferente da Britânica. Por outro lado, à data da realização o presente trabalho não existiam estudos de comparação inter-racial da actividade da PON-1 em indivíduos infectados pelo VIH. Esta infecção diminui os valores de HDL-c; a raça é também uns dos factores influentes na quantidade desta lipoproteína e a composição e quantidade da HDL são factores importantes na preservação da actividade do enzima. Com os dados obtidos no presente trabalho, pode apenas afirmar-se que foi pela primeira vez descrita uma diferença inter-racial na actividade da PON-1 em indivíduos infectados pelo VIH-1.

Em relação a aspectos metodológicos existem 3 aspectos que merecem consideração. Na literatura, encontram-se descritos valores muito variáveis de actividade de PON-1, quer em

soro quer em plasma. Apesar de conhecido que o lítio pode inibir a actividade da PON-1, foi descrito que esta actividade pode ser quantificada em plasma colhido com heparina-lítio. Este assunto foi bem explorado por Ferré e colaboradores (2005). Porém, como os resultados não são equivalentes os valores foram convertidos, para que se possam comparar com os obtidos em soro. Por outro lado, não foi discriminada a hidrólise não-enzimática do paraoxon, pois esta representa menos de 10% da hidrólise enzimática mediada pela PON-1 (Williams e col, 1986). Por último, todas as amostras de PON-1 foram colhidas em jejum dado que a fase pós-prandial influencia a actividade do enzima (Coll e col, 2006).

Com suporte nestes dados sugerimos que o tratamento com EFV possa reverter a baixa actividade da PON-1 observada nos indivíduos infectados pelo VIH. Os resultados sugerem que a inclusão de EFV nos esquemas HAART é uma boa opção terapêutica nos indivíduos com maior risco cardiovascular. Requerem-se estudos futuros para conhecer o mecanismo subjacente. Num próximo trabalho será desejável um desenho longitudinal para corroborar estes resultados e relacionar qualidade/função das HDL e concentrações do fármaco.

## **6.6 Conclusões**

A actividade PON-1 é superior em indivíduos VIH positivos medicados com EFV sugerindo que o tratamento com EFV é uma boa opção terapêutica nos indivíduos com maior risco cardiovascular.

## Considerações Finais

No presente trabalho questionou-se a importância da TDM de EFV com base em evidências experimentais, propondo-se um ajuste na janela terapêutica definida para este fármaco, e, em geral, implementou-se o controlo de um dos factores responsáveis pelo insucesso da terapêutica: detecção de concentrações sub-terapêuticas ou de concentrações tóxicas. Os resultados obtidos por esta equipa multidisciplinar, enfatizam ainda o interesse de se estabelecerem em Portugal, à semelhança do que acontece já em alguns países, *guidelines* para a TDM dos ARV.

A aplicação da TDM aos fármacos anti-retrovirais atingiu uma expressão significativa em alguns países. Foram estabelecidas populações e circunstâncias alvo, mas alguns conceitos práticos como a fiabilidade de colher uma única amostra e a articulação do valor de CEM, com o parâmetro PK a utilizar, permaneciam por decidir.

A terapêutica com concentrações controladas de efavirenz, em indivíduos infectados com o VIH, durante um período tão prolongado e realizada de uma forma sistemática, numa amostra significativa de indivíduos, permitiu conhecer o valor de variabilidade intra-individual necessário para definir se a TDM deveria, ou não, ser aplicada aos doentes em terapêutica com o fármaco. Ao concluir que a variabilidade interindividual é elevada e que a variabilidade intra-individual é reduzida, permanecendo esta última constante em cada um dos três anos de terapêutica, e que pode ser avaliada apenas com 3/análises ao ano com a periodicidade das consultas habituais destes indivíduos, demonstrou-se que a TDM do EFV é exequível na prática clínica.

Com os dados gerados neste trabalho, definiram-se volume de amostra de sangue necessário, parâmetro PK a avaliar, forma de armazenamento das amostras, tempos de análise e forma de minimização de risco para o operador. Actualmente, estão descritos mais de 20 métodos diferentes de quantificação de EFV, individual ou juntamente com outros fármacos, utilizando diferentes técnicas, *eg.*, HPLC, cromatografia líquida com espectrometria de massa e por cromatografia gasosa com espectrometria de massa. Esta diversidade de metodologias implica que em qualquer trabalho em que se quantifiquem as concentrações plasmáticas de EFV,

mais importante do que a referência à metodologia utilizada, seja o controlo da qualidade das quantificações, com a devida referência aos valores obtidos nos programas de avaliação externa. A validade do método de HPLC, desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas e utilizado para a quantificação plasmática do EFV, tem sido sucessivamente comprovada nas avaliações externas semestrais.

O método de quantificação simultânea de 9 ARV é hoje utilizado diariamente no laboratório de Farmacologia, onde se quantificam amostras provenientes de 10 centros hospitalares e representa uma estratégia para estabelecer contactos e hipóteses de trabalho para projectos de investigação, permitindo também a construção de uma base de dados para a realização de estudos exploratórios PK/PD. Estes estudos exploratórios, também chamados *inductive* ou *theory building*, são estudos que não se iniciam com uma teoria. Na prática, é feita uma recolha prévia de dados que permitem construir bases de dados que, após a sua análise, são usados para desenvolver uma teoria e então desenha-se o estudo para testar a teoria. Estes estudos, permitem encontrar estatísticas, que nos permitem, *eg.*, calcular dimensões de amostras necessárias a provar hipóteses postuladas. Esta abordagem foi utilizada dado que, no desenho de estudos prospectivos controlados e aleatorizados, é necessária a inclusão de um número elevado de indivíduos, de forma a obter poder estatístico para mostrar os benefícios do controlo das concentrações plasmáticas de ARV. No entanto, para a maioria dos grupos de investigação, não é possível conduzir estudos desta elevada dimensão e custos. A dimensão reduzida das amostras de cada estudo é uma limitação óbvia deste trabalho e para tentar combater esta limitação, procurou-se fazer estudos de longa duração. Esta opção tem como base a adequação à realidade, dado tratar-se de uma terapêutica que idealmente durará décadas e tem também vantagem competitiva, dado que a maioria encontrados na literatura têm duração inferior a um ano. Este facto deve-se, entre outros motivos, à necessidade de grande sincronização e articulação com os clínicos nos hospitais necessária para se realizar um estudo desta natureza.

Uma das prioridades principais dos clínicos que tratam estes indivíduos é hoje prevenir e tratar outro tipo de condições associadas com o envelhecimento destes doentes. A HAART em geral e em particular os PI estão associados com um aumento do risco cardiovascular que é, em parte, mediado por alterações no perfil de lípidos e proteínas.

Os resultados do presente trabalho sugerem pela primeira vez, que nos indivíduos com valores basais de TC/HDL-c elevados, o aumento da dose de efavirenz integrado no TDM pode reduzir o risco cardiovascular destes doentes e obviamente minimizar ou excluir a necessidade de associar outros fármacos para o controlo das alterações de lípidos e lipoproteínas. Esta

diminuição deste índice aterogénico é conseguida pelo aumento de HDL-c. No entanto, o mecanismo subjacente a este aumento não é conhecido e o seu estudo representa o fundamento de trabalhos futuros.

Pela primeira vez, foi também identificado que este aumento nas HDL não é apenas quantitativo, mas qualitativo, ao mostrar que o fármaco parece estar associado a aumento da actividade do enzima PON-1 que desempenha um papel fundamental para a função antioxidante das HDL.

Num balanço final, numa perspectiva de formação profissional, gostaria de salientar a aprendizagem de uma abordagem e metodologias para a concretização da quantificação de concentrações de fármacos, que no futuro podem revelar-se úteis para aplicar a outros fármacos em estudos farmacocinéticos e de relação PK/PD. Por outro lado, penso ter contribuído para a disponibilização de uma estrutura para a monitorização de fármacos anti-retrovirais, cuja utilidade é hoje claramente reconhecida pela comunidade científica, estrutura essa que foi a primeira a ser desenvolvida no nosso país e que pretende responder ao âmbito geral deste trabalho: contribuir para otimizar a terapêutica anti-retroviral e o seu impacto na qualidade de vida do doente. Gostaria também de referir a oportunidade de participar num projecto de investigação clínica, que me permitiu a abertura a novos horizontes para além da minha formação em ciência básica. Na perspectiva de que este trabalho possa contribuir para alguma inovação penso poder mencionar o reconhecimento do trabalho pela comunidade científica através da publicação dos resultados e comunicação dos mesmos em congressos científicos internacionais. Por fim, numa perspectiva de enriquecimento pessoal, queria também focar a multidisciplinaridade da equipa de trabalho que, para além de toda a aprendizagem a nível profissional, em muito influenciou o meu crescimento a nível pessoal.

## Referências bibliográficas

1. Aarnoutse RE, Verweij-van Wissen CP, Underberg WJ, Kleinnijenhuis J, Hekster YA, Burger DM. High-performance liquid chromatography of HIV protease inhibitors in human biological matrices. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001a; 764: 363-84.
2. Aarnoutse RE, Burger DM, Verweij-van Wissen CPWGM, van Ewijk-Beneken Kolmer EWJ, Wuis EW, Hekster, YA. An international interlaboratory quality control program for therapeutic drug monitoring in HIV infection. 8<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2001b; Abstract 734.
3. Adedoyin A, Arns PA, Richards WO, Wilkinson GR, Branch RA. Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64: 8-17.
4. Adkins JC, Noble S. Efavirenz. *Drugs.* 1998; 56: 1055-64.
5. Alexander CS, Asselin JJ, Ting LS, Montaner JS, Hogg RS, Yip B, O'Shaughnessy MV, Harrigan PR. Antiretroviral concentrations in untimed plasma samples predict therapy outcome in a population with advanced disease. *J Infect Dis.* 2003; 188: 541-8.
6. Almond LM, Hoggard PG, Edirisinghe D, Khoo SH, Back DJ. Intracellular and plasma pharmacokinetics of Efavirenz in HIV-infected individuals. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 738-44.
7. Alonso-Villaverde C, Segues T, Coll-Crespo B, Pérez-Bernalte R, Rabassa A, Gomila M, Parra S, Gozález-Esteban MA, Jiménez-Expósito MJ, Masana L. High-density lipoprotein concentrations relate to the clinical course of HIV viral load in patients undergoing anti-retroviral therapy. *AIDS.* 2003; 17: 1173-8.
8. Alonso-Villaverde C, Coll B, Gómez F, Parra S, Camps J, Joven J, Masana L. The Efavirenz-induced increase in HDL-cholesterol is influenced by the multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism. *AIDS.* 2005; 19: 341-2.
9. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githanga J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 217-21.
10. Anastos K, Lu D, Shi Q, Tien PC, Kaplan RC, Hessol NA, Cole S, Vigen C, Cohen M, Young M, Justman J. Association of serum lipid levels with HIV serostatus, specific anti-retroviral agents, and treatment regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007; 45: 34-42.
11. Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WB. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation.* 1991; 83: 356-62.
12. Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favourably affected by simvastatin treatment. *Circulation.* 2003; 108: 2751-6.
13. Antinori A, Zaccarelli M, Cingolani A, Forbici F, Rizzo MG, Trotta MP, Di Giambenedetto S, Narciso P, Ammassari A, Girardi E, De Luca A, Perno CF. Cross-resistance among nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors limits recycling Efavirenz after nevirapine failure. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002; 18: 835-8.
14. Arribas JR, Pozniak AL, Gallant JE, Dejesus E, Gazzard B, Campo RE, Chen SS, McColl D, Holmes CB, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK. Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz compared with zidovudine/lamivudine and efavirenz in treatment-naïve patients: 144-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008; 47: 74-8.

15. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, Cox CE, Skinner S, Gerrior J, Gorbach SL, Wanke C. Protease inhibitor-based HAART, HDL, and CHD-risk in HIV-infected patients. *Atherosclerosis*. 2006; 184: 72-7.
16. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 1998; 101: 1581-90.
17. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26: 892-904.
18. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 330-335.
19. Bachelier LT, Anton ED, Kudish P, Baker D, Bunville J, Krakowski K, Bolling L, Aujay M, Wang XV, Dawn E, Becker MF, Lasut AL, George HJ, Spalding DR, Hollis G, Abremski K Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing Efavirenze combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 2475-84.
20. Back DJ, Khoo SH, Gibbons SE, Merry C. The role of therapeutic drug monitoring in treatment of HIV infection. *Br J Clin Pharmacol*. 2001; 52: 89S-96S.
21. Back D, Gatti G, Fletcher C, Garraffo R, Haubrich R, Hoetelmans R, Kurowski M, Lubner A, Merry C, Perno CF. Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. *AIDS*. 2002, 16: S5-S37.
22. Back DJ, Khoo SH. The role of clinical pharmacology in optimizing anti-retroviral therapy. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 55: 473-6.
23. Barnett AG, van der Pols JC, Dobson AJ. Regression to the mean: what it is and how to deal with it. *Int J Epidemiol*. 2005; 34: 215-20.
24. Barreiro P, Rodríguez-Nóvoa S, Labarga P, Ruiz A, Jiménez-Nácher I, Martín-Carbonero L, González-Lahoz J, Soriano V. Influence of liver fibrosis stage on plasma levels of anti-retroviral drugs in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 2007; 195: 973-9.
25. Barrett JS, Joshi AS, Chai M, Ludden TM, Fiske WD, Pieniaszek HJ Jr. Population pharmacokinetic meta-analysis with efavirenz. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2002; 40: 507-19.
26. Bartlett JA. Addressing the challenges of adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002; 29 Suppl 1: S2-10.
27. Batuca JR, Ames PR, Isenberg DA, Alves JD. Antibodies toward high-density lipoprotein components inhibit paraoxonase activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1108: 137-46.
28. Becquemont L, Chazouilleres O, Serfaty L, Poirier JM, Broly F, Jaillon P, Poupon R, Funck-Brentano C. Effect of interferon alpha-ribavirin bitherapy on cytochrome P450 1A2 and 2D6 and N-acetyltransferase-2 activities in patients with chronic active hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 71: 488-95.
29. Berruet N, Sentenac S, Auchere D, Gimenez F, Farinotti R, Fernandez C. Effect of Efavirenz on intestinal p-glycoprotein and hepatic p450 function in rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2005; 8: 226-34.
30. Best BM, Goicoechea M, Witt MD, Miller L, Daar ES, Diamond C, Tilles JG, Kemper CA, Larsen R, Holland DT, Sun S, Jain S, Wagner G, Capparelli EV, McCutchan JA, Haubrich RH; California Collaborative Treatment Group 578 Study Team. A randomized controlled trial of therapeutic drug monitoring in treatment-naive and -experienced HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 46: 433-42.
31. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, Fu X, Shao M, Brennan DM, Ellis SG, Brennan ML, Allayee H, Lysis AJ, Hazen SL. Relationship of paraoxonase 1 (PON-1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA*. 2008; 299: 1265.
32. Bica I, McGovern B, Dhar R, Stone D, McGowan K, Scheib R, Snyderman DR. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 492-497.
33. Bickel M, Stephan C, Rottmann C, Carlebach A, Haberl A, Kurowski M, Staszewski S. Severe CNS side-effect and persistent high Efavirenz plasma levels in a patient with HIV/HCV coinfection and liver cirrhosis. *Scand J Infect Dis*. 2005; 37: 520-2.
34. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D (1993) Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45: identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem*. 1993; 211: 871-879

35. Boffito M, Back DJ, Hoggard PG, Caci A, Bonora S, Raiteri R, Sinicco A, Reynolds HE, Khoo S, Di Perri G. Intra-individual variability in lopinavir plasma trough concentrations supports therapeutic drug monitoring. *AIDS*. 2003; 17: 1107-8.
36. Bossi P, Colin D, Bricaire F, Caumes E. Hypersensitivity syndrome associated with Efavirenz therapy. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: 227-8.
37. Bossi P, Peytavin G, Ait-Mohand H, Delaugerre C, Ktorza N, Paris L, Bonmarchand M, Cacace R, David DJ, Simon A, Lamotte C, Marcelin AG, Calvez V, Bricaire F, Costagliola D, Katlama C. GENOPHAR: a randomized study of plasma drug measurements in association with genotypic resistance testing and expert advice to optimize therapy in patients failing anti-retroviral therapy. *HIV Med*. 2004; 5: 352-9.
38. Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, Marlink RG, Schapiro J, Roger M, Wainberg MA. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*. 2003; 17: F1-5.
39. Brundage RC, Yong FH, Fenton T, Spector SA, Starr SE, Fletcher CV. Inpatient variability of Efavirenz concentrations as a predictor of virologic response to anti-retroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 979-84.
40. Burger DM, Aarnoutse RE, Hugen PW. Pros and cons of therapeutic drug monitoring of anti-retroviral agents. *Curr Opin Infect Dis*. 2002; 15:17-22.
41. Burger D, Hugen P, Reiss P, Gyssens I, Schneider M, Kroon F, Schreij G, Brinkman K, Richter C, Prins J, Aarnoutse R, Lange J; ATHENA Cohort Study Group. Therapeutic drug monitoring of nelfinavir and indinavir in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 2003; 17: 1157-65.
42. Burger D, van der Heiden I, la Porte C, van der Ende M, Groeneveld P, Richter C, Koopmans P, Kroon F, Sprenger H, Lindemans J, Schenk P, van Schaik R. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor Efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*. 2006; 61: 148-54.
43. Butt AA, Tsevat J, Ahmad J, Shakil AO, Mrus JM. Biochemical and virologic parameters in patients co-infected with hepatitis C and HIV versus patients with hepatitis C mono-infection. *Am J Med Sci*. 2007; 333: 271-5.
44. Calza L, Manfredi R, Colangeli V, Tampellini L, Sebastiani T, Pocaterra D, Chiodo F. Substitution of nevirapine or Efavirenz for protease inhibitor versus lipid-lowering therapy for the management of dyslipidaemia. *AIDS*. 2005; 19: 1051-8.
45. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*. 1986; 256: 2835-8.
46. Cespedes MS, Aberg JA. Neuropsychiatric complications of anti-retroviral therapy. *Drug Saf*. 2006; 29: 865-74.
47. Chandler B, Almond L, Ford J, Owen A, Hoggard P, Khoo S, Back D. The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on p-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 33: 551-556.
48. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Sopko G, Pauly DF, Merz CN, Kamboh MI; WISE Study Group. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 13-22.
49. Chun TW, Davey RT Jr, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, Fauci AS. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med*. 2000; 6: 757-61.
50. Clevenbergh P, Garraffo R, Durant J, Dellamonica P. PharmAdapt: a randomized prospective study to evaluate the benefit of therapeutic monitoring of protease inhibitors: 12 week results. *AIDS*. 2002; 16: 2311-5.
51. Clevenbergh P, Garraffo R, Dellamonica P. Impact of various anti-retroviral drugs and their plasma concentrations on plasma lipids in heavily pretreated HIV-infected patients. *HIV Clin Trials*. 2003; 4:330-6.
52. Clifford DB, Evans S, Yang Y, Acosta EP, Goodkin K, Tashima K, Simpson D, Dorfman D, Ribaldo H, Gulick RM. Impact of efavirenz on neuropsychological performance and symptoms in HIV-infected individuals. *Ann Intern Med*. 2005; 143: 714-

53. Clumeck N, Pozniak A, Raffi F; EACS Executive Committee. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV Med.* 2008; 9: 65-71.
54. Coll B, van Wijk JP, Parra S, Castro Cabezas M, Hoepelman IM, Alonso-Villaverde C, de Koning EJ, Camps J, Ferre N, Rabelink TJ, Tous M, Joven J. Effects of rosiglitazone and metformin on postprandial paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy. *Eur J Pharmacol.* 2006; 544: 104-10.
55. Cooper CL, Mills E, Angel JB. Mitigation of anti-retroviral-induced hyperlipidemia by hepatitis C virus co-infection. *AIDS.* 2007; 21: 71-6.
56. Cressey TR, Lallemand M. Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: an update. *Infect Genet Evol.* 2007; 7: 333-42.
57. Criqui MH, Golomb BA. Epidemiologic aspects of lipid abnormalities. *Am J Med.* 1998; 105: 48S-57S.
58. Crommentuyn KM, Huitema AD, Brinkman K, van der Ende ME, de Wolf F, Beijnen JH; Athena study. Therapeutic drug monitoring of nevirapine reduces pharmacokinetic variability but does not affect toxicity or virologic success in the ATHENA study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 39: 249-50.
59. Csajka C, Marzolini C, Fattinger K, Decosterd LA, Fellay J, Telenti A, Biollaz J, Buclin T. Population pharmacokinetics and effects of Efavirenz in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73: 20-30.
60. De Maat MM, Huitema AD, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp ECM, Mairuhu ATA, Beijnen JH. Subtherapeutic anti-retroviral concentrations in routine clinical outpatient HIV care. *Ther Drug Monit.* 2003; 25: 367-73.
61. De Santis M, Carducci B, De Santis L, Cavaliere AF, Straface G. Periconceptional exposure to Efavirenz and neural tube defects. *Arch Intern Med.* 2002; 162: 355.
62. Deakin S, Moren X, James RW. HDL oxidation compromises its influence on paraoxonase-1 secretion and its capacity to modulate enzyme activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1146-52.
63. DeJesus E, Herrera G, Teofilo E, Gerstoft J, Buendia CB, Brand JD, Brothers CH, Hernandez J, Castillo SA, Bonny T, Lanier ER, Scott TR; CNA30024 Study Team. Abacavir versus zidovudine combined with lamivudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naïve HIV-infected adults. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 1038-46.
64. Dirson G, Fernandez C, Hindlet P, Roux F, German-Fattal M, Gimenez F, Farinotti R. Efavirenz does not interact with the ABCB1 transporter at the blood-brain barrier. *Pharm Res.* 2006; 23: 1525-32.
65. Dodig M, Tavill AS. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfections. *J Clin Gastroenterol.* 2001; 33: 367-74.
66. Doser N, Sudre P, Telenti A, Wietlisbach V, Nicod P, Darioli R, Mooser V. Persistent dyslipidemia in HIV-infected individuals switched from a protease inhibitor-containing to an Efavirenz-containing regimen. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001; 26: 389-90.
67. Droste JAH, Aarnoutse RE, Koopmans PP, Burger DM. An International Quality Control (QC) program to assess improve performance in drug measurements for Therapeutic Drug Monitoring (TDM) in HIV infections. XIV International AIDS Conference. 2002. Abstract MoPpB2008.
68. Dubé MP, Parker RA, Tebas P, Grinspoon SK, Zackin RA, Robbins GK, Roubenoff R, Shafer RW, Wininger DA, Meyer WA 3rd, Snyder SW, Mulligan K. Glucose metabolism, lipid, and body fat changes in anti-retroviral-naïve subjects randomized to nelfinavir or Efavirenz plus dual nucleosides. *AIDS.* 2005; 19: 1807-18.
69. Duffy D, Rader DJ. Drugs in development: targeting high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol.* 2005; 20: 301-6.
70. Duong M, Golzi A, Peytavin G, Piroth L, Froidure M, Grappin M, Buisson M, Kohli E, Chavanet P, Portier H. Usefulness of therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in routine clinical practice. *HIV Clin Trials.* 2004; 5: 216-23.
71. Duong M, Petit JM, Martha B, Galland F, Piroth L, Walldner A, Grappin M, Buisson M, Duvillard L, Chavanet P, Portier H. Concentration of circulating oxidized LDL in HIV-infected patients treated with anti-retroviral agents: relation to HIV-related lipodystrophy. *HIV Clin Trials.* 2006; 7: 41-7.
72. Ena J, Amador C, Benito C, Fenoll V, Pasquau F. Risk and determinants of developing severe liver toxicity during therapy with

nevirapine-and Efavirenz-containing regimens in HIV-infected patients. *Int J STD AIDS*. 2003; 14: 776-81.

73. El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A, Gibert C, Rappoport C, Visnegarwala F, Grunfeld C, Raghavan SS. Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large anti-retroviral-naive cohort. *HIV Med*. 2005; 6: 114-21.
74. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285: 2486-97.
75. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. Response to anti-retroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 2002; 359: 30-6.
76. Fernández-Miranda C, Pulido F, Carrillo JL, Larumbe S, Gómez Izquierdo T, Ortuño B, Rubio R, del Palacio A. Lipoprotein alterations in patients with HIV infection: relation with cellular and humoral immune markers. *Clin Chim Acta*. 1998; 274: 63-70.
77. Ferré N, Camps J, Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Coll B, Tous M, Joven J. Comparison of paraoxonase 1 measurements in serum and in lithium-heparin anticoagulated plasma samples. *Clin Chem*. 2005; 51: 922-3.
78. Ferré N, Marsillach J, Camps J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Coll B, Tous M, Joven J. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2006; 45: 51-9.
79. Fisac C, Fumero E, Crespo M, Roson B, Ferrer E, Virgili N, Ribera E, Gatell JM, Podzamczar D. Metabolic benefits 24 months after replacing a protease inhibitor with abacavir, Efavirenz or nevirapine. *AIDS*. 2005; 19: 917-25.
80. Fletcher CV, Kawle SP, Kakuda TN, Anderson PL, Weller D, Bushman LR, Brundage RC, Remmel RP. Zidovudine triphosphate and lamivudine triphosphate concentration-response relationships in HIV-infected persons. *AIDS*. 2000; 14: 2137-44.
81. Fletcher CV, Anderson PL, Kakuda TN, Schacker TW, Henry K, Gross CR, Brundage RC. Concentration-controlled compared with conventional anti-retroviral therapy for HIV infection. *AIDS*. 2002; 16: 551-60.
82. Foisy MM, Yakiwchuk EM, Hughes CA. Induction effects of ritonavir: implications for drug interactions. *Ann Pharmacother*. 2008; 42: 1048-59.
83. Fonquernie L, Serfaty L, Charrois A, Wendum D, Lefebvre B, Girard PM, Meynard JL. Significance of hepatitis C virus coinfection with persistently normal alanine aminotransferase levels in HIV-1-infected patients. *HIV Med*. 2004; 5: 385-90.
84. Fontas E, van Leth F, Sabin CA, Friis-Møller N, Rickenbach M, d'Arminio Monforte A, Kirk O, Dupon M, Morfeldt L, Mateu S, Petoumenos K, El-Sadr W, de Wit S, Lundgren JD, Pradier C, Reiss P; D:A:D Study Group. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination anti-retroviral therapy: are different anti-retroviral drugs associated with different lipid profiles? *J Infect Dis*. 2004; 189: 1056-74.
85. Fortin C, Joly V. Efavirenz for HIV-1 infection in adults: an overview. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004; 2: 671-84.
86. Fraaij PL, Rakhmanina N, Burger DM, de Groot R. Therapeutic drug monitoring in children with HIV/AIDS. *Ther Drug Monit*. 2004; 26: 122-6.
87. Friis-Møller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio Monforte A, El-Sadr WM, Reiss P, Thiébaud R, Morfeldt L, De Wit S, Pradier C, Calvo G, Law MG, Kirk O, Phillips AN, Lundgren JD; Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combination anti-retroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1993-2003.
88. Frye RF, Zgheib NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, Branch RA. Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 80: 235-45.
89. Fúmaz CR, Muñoz-Moreno JA, Moltó J, Negredo E, Ferrer MJ, Sirera G, Pérez-Alvarez N, Gómez G, Burger D, Clotet B. Long-term neuropsychiatric disorders on Efavirenz-based approaches: quality of life, psychological issues, and adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 15; 38: 560-5.
90. Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, DeJesus E, Suleiman JM, Miller MD, Coakley DF, Lu B, Toole JJ, Cheng AK; 903 Study Group. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial. *JAMA*. 2004; 292: 191-201.

91. Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Pozniak AL, Gazzard B, Campo RE, Lu B, McColl D, Chuck S, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK; Study 934 Group. Tenofovir DF, emtricitabine, and Efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and Efavirenz for HIV. *N Engl J Med.* 2006; 354: 251-60.
92. Gallego L, Barreiro P, del Río R, González de Requena D, Rodríguez-Albariño A, González-Lahoz J, Soriano V. Analyzing sleep abnormalities in HIV-infected patients treated with Efavirenz. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 430-2.
93. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful Efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 1230-7.
94. Gazzard BG; BHIVA Treatment Guidelines Writing Group. British HIV Association Guidelines for the treatment of HIV-1-infected adults with antiretroviral therapy 2008. *HIV Med.* 2008; 9: 563-608.
95. Geffriaud C, Poynard T, Delfraissy JF, Bedossa P, Naveau S, Bourée P, Dubreuil P, Chaput JC. Hepatic involvement in HIV 1 virus infection. *Gastroenterol Clin Biol.* 1988; 12: 465-72.
96. Giannini E, Botta F, Fasoli A, Ceppa P, Risso D, Lantieri PB, Celle G, Testa R. Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. *Dig Dis Sci.* 1999; 44: 1249-53.
97. Giannini E, Risso D, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti F, Romagnoli P, Testa E, Ceppa P, Testa R. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 218-24.
98. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ.* 2005; 172: 367-79.
99. Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Alvarez A, Giuliani A, Molina R, Tápanes R, Pérez J, León OS. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res.* 2003; 47: 217-24.
100. González de Requena D, Blanco F, Garcia-Benayas T, Jiménez-Nácher I, González-Lahoz J, Soriano V. Correlation between lopinavir plasma levels and lipid abnormalities in patients taking lopinavir/ritonavir. *AIDS Patient Care STDS.* 2003; 17: 443-5.
101. González de Requena D, Gallego O, Corral A, Jiménez-Nácher I, Soriano V. Higher Efavirenz concentrations determine the response to viruses carrying non-nucleoside reverse transcriptase resistance mutations. *AIDS.* 2004; 18: 2091-4.
102. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977; 62: 707-14.
103. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989; 79: 8-15.
104. Gottlieb MS, Schanker HM, Fan PT, Saxon A, Weisman JD. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *Morbidity Mortality Weekly Rep.* 1981; 30: 250-2.
105. Grossman Z, Istomin V, Averbuch D, Lorber M, Risenberg K, Levi I, Chowers M, Burke M, Bar Yaacov N, Schapiro JM; Israel AIDS Multi-Center Study Group. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *AIDS.* 2004; 18: 909-15.
106. Grover SA, Palmer CS, Coupall L. Serum lipid screening to identify high risk individuals for coronary death. The results of the Lipid Research Clinics prevalence cohort. *Arch Intern Med.* 1994; 154:679-84.
107. Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga JK, Jensen P, Feingold KR. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 1045-52.
108. Goujard C, Legrand M, Panhard X, Diquet B, Duval X, Peytavin G, Vincent I, Katlama C, Leport C, Bonnet B, Salmon-Céron D, Mentré F, Taburet AM; COPHAR1-ANRS 102 Study Group. High variability of indinavir and nelfinavir pharmacokinetics in HIV-infected patients with a sustained virological response on highly active antiretroviral therapy. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44: 1267-78.
109. Gulick RM, Ribaldo HJ, Shikuma CM, Lalama C, Schackman BR, Meyer WA 3rd, Acosta EP, Schouten J, Squires KE, Pilcher CD, Murphy RL, Koletar SL, Carlson M, Reichman RC, Bastow B, Klingman KL, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team. Three- vs four-drug antiretroviral regimens for the initial treatment of HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006. 16; 296: 769-81.

110. Gutiérrez F, Padilla S, Navarro A, Masiá M, Hernández I, Ramos J, Esteban A, Martín-Hidalgo A. Lopinavir plasma concentrations and changes in lipid levels during salvage therapy with lopinavir/ritonavir-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 15; 33: 594-600.
111. Gutiérrez F, Navarro A, Padilla S, Antón R, Masiá M, Borrás J, Martín-Hidalgo A. Prediction of neuropsychiatric adverse events associated with long-term Efavirenz therapy, using plasma drug level monitoring. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1648-53.
112. Haas DW, Wu H, Li H, Bosch RJ, Lederman MM, Kuritzkes D, Landay A, Connick E, Benson C, Wilkinson GR, Kessler H, Kim RB. MDR1 gene polymorphisms and phase 1 viral decay during HIV-1 infection: an adult AIDS Clinical Trials Group study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 34: 295-8.
113. Haas DW, Ribaldo HJ, Kim RB, Tierney C, Wilkinson GR, Gulick RM, Clifford DB, Hulgan T, Marzolini C, Acosta EP. Pharmacogenetics of Efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS.* 2004; 18: 2391-400.
114. Haas DW, Smeaton LM, Shafer RW, Robbins GK, Morse GD, Labbe L, Wilkinson GR, Clifford DB, D'Aquila RT, De Gruttola V, Pollard RB, Merigan TC, Hirsch MS, George AL Jr, Donahue JP, Kim RB. Pharmacogenetics of long-term responses to anti-retroviral regimens containing Efavirenz and/or Nelfinavir: an Adult Aids Clinical Trials Group Study. *J Infect Dis.* 2005; 192: 1931-42.
115. Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, Cahn P, Fischl MA, Gatell JM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Montaner JS, Richman DD, Yeni PG, Volberding PA; International AIDS Society-USA. Anti-retroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA.* 2008; 300: 555-70.
116. Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. Induction of CYP3A4 by Efavirenz in primary human hepatocytes: comparison with rifampin and phenobarbital. *J Clin Pharmacol.* 2004; 44: 1273-81.
117. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS.* 2006; 20: W13-23.
118. Hirschel B, Francioli P. Progress and problems in fight against AIDS. *N Engl J Med.* 1998; 338: 906-8.
119. Ho DD. Viral Counts Count in HIV Infection. *Science.* 1996; 272: 1124-5.
120. Hoetelmans RM. Anti-retroviral drug level monitoring: the next routine test in HIV management? *Curr Opin Infect Dis.* 1999; 12: 593-5.
121. Horter MJ, Sondermann S, Reinecke H, Bogdanski J, Woltering A, Kerber S, Breithardt G, Assmann G, Von Eckardstein A. Associations of HDL phospholipids and paraoxonase activity with coronary heart disease in postmenopausal women. *Acta Physiol Scand.* 2002; 176: 123-30.
122. Hugen PW, Burger DM, Aarnoutse RE, Baede PA, Nieuwkerk PT, Koopmans PP, Hekster YA. Therapeutic drug monitoring of HIV-protease inhibitors to assess noncompliance. *Ther Drug Monit.* 2002; 24: 579-87.
123. Ivanovic J, Nicastrì E, Ascenzi P, Bellagamba R, De Marinis E, Notari S, Pucillo LP, Tozzi V, Ippolito G, Narciso P. Therapeutic drug monitoring in the management of HIV-infected patients. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 1925-39.
124. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1986-94.
125. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON-1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON-1(192) or PON-1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2441-7
126. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Furlong CE. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1465-71.
127. Jones K, Bray PG, Khoo SH, Davey RA, Meaden ER, Ward SA e Back DJ. P-glycoprotein and transporter MPR1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance. *AIDS.* 2001a; 15: 1353-8.
128. Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo SH, Davey RA e Back DJ. Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors *in vitro* and the effect of active transport. *AIDS.* 2001b; 15: 675-81.
129. Josephson F, Albert J, Flamholz L, Gisslen M, Karlstrom O, Moberg L, Naver L, Svedhem V, Svennerholm B, Sonnerborg A.

Treatment of HIV infection: Swedish recommendations 2009. *Scand J Infect Dis.* 2009; 4: 1-20.

130. Justesen US. Therapeutic drug monitoring and human immunodeficiency virus (HIV) anti-retroviral therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 98: 20-31.
131. Kannel WB, Wilson PW. Efficacy of lipid profiles in prediction of coronary disease. *Am Heart J.* 1992; 124: 768-74.
132. Kappelhoff BS, Crommentuyn KM, de Maat MM, Mulder JW, Huitema AD, Beijnen JH. Practical guidelines to interpret plasma concentrations of anti-retroviral drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43: 845-53.
133. Kappelhoff BS, van Leth F, Robinson PA, MacGregor TR, Baraldi E, Montella F, Uip DE, Thompson MA, Russell DB, Lange JM, Beijnen JH, Huitema AD; 2NN Study Group. Are adverse events of nevirapine and Efavirenz related to plasma concentrations? *Antivir Ther.* 2005; 10: 489-98.
134. Karakaya A, Ibiş S, Kural T, Köse SK, Karakaya AE. Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Chem Biol Interact.* 1999; 118: 193-200.
135. Katsounas A, Frank A, Klinker H, Langmann P. Efavirenz-therapy in HIV-patients with underlying liver disease: importance of continuous TDM of EFV. *Eur J Med Res.* 2007; 12: 331-6.
136. Khoo SH, Gibbons SE, Back DJ. Therapeutic drug monitoring as a tool in treating HIV infection. *AIDS.* 2001; S171-81.
137. Khoo SH, Lloyd J, Dalton M, Bonington A, Hart E, Gibbons S, Flegg P, Sweeney J, Wilkins EG, Back DJ. Pharmacologic optimization of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (POPIN)--a randomized controlled trial of therapeutic drug monitoring and adherence support. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 41: 461-7.
138. Kim NS, Kang K, Cha MH, Kang BJ, Moon J, Kang BK, Yu BC, Kim YS, Choi SM, Bang OS. Decreased paraoxonase-1 activity is a risk factor for ischemic stroke in Koreans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364: 157-62.
139. King J, Aberg JA. Clinical impact of patient population differences and genomic variation in Efavirenz therapy. *AIDS.* 2008; 22: 1709-17.
140. Kinoshita B, Glick H, Garland G. Cholesterol and coronary heart disease: predicting risks by levels and ratios. *Ann Intern Med.* 1994; 121: 641-7.
141. Kirby GM, Batist G, Alpert L, Lamoureux E, Cameron RG, Alaoui-Jamali MA. Overexpression of cytochrome P-450 isoforms involved in aflatoxin B1 bioactivation in human liver with cirrhosis and hepatitis. *Toxicol Pathol.* 1996; 24: 458-67.
142. Klein K, Lang T, Saussele T, Barbosa-Sicard E, Schunck WH, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with Efavirenz. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15: 861-73.
143. Kontorinis N, Dieterich DT. Toxicity of non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Semin Liver Dis.* 2003; 23: 173-82.
144. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 342-74.
145. Koro CE, Bowlin SJ, Stump TE, Sprecher DL, Tierney WM. The independent correlation between high-density lipoprotein cholesterol and subsequent major adverse coronary events. *Am Heart J.* 2006; 151: 755.e1-755.e6.
146. La Porte CF. Updated guideline to perform therapeutic drug monitoring for anti-retroviral agents. *Reviews in Antiviral Therapy.* 2006; 3: 3-14.
147. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG. Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307: 906-22.
148. Lang T, Klein K, Fischer J, Nüssler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 399-415.
149. Langmann P, Weissbrich B, Desch S, Vähä T, Schirmer D, Zilly M, Klinker H. Efavirenz plasma levels for the prediction of treatment failure in heavily pretreated HIV-1 infected patients. *Eur J Med Res.* 2002; 7: 309-14.

150. Le Moing V, Peytavin G, Journot V, Cottalorda J, Bouvet E, Chêne G, Préau M, de Boever CM, Leport C, Raffi F; Antiprotease Cohort (APROCO) Study Group. Plasma levels of indinavir and nelfinavir at time of virologic response may have a different impact on the risk of further virologic failure in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34: 497-9.
151. Lee BL, Wong D, Benowitz NL, Sullam PM. Altered patterns of drug metabolism in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther*. 1993; 53: 529-35.
152. Levy D, Wilson PW, Anderson KM, Castelli WP. Stratifying the patient at risk from coronary disease: new insights from the Framingham Heart Study. *Am Heart J*. 1990; 119: 712-7.
153. Lochet P, Peyrière H, Lotthé A, Mauboussin JM, Delmas B, Reynes J. Long-term assessment of neuropsychiatric adverse reactions associated with Efavirenz. *HIV Med*. 2003; 4: 62-6.
154. López-Cortés LF, Ruiz-Valderas R, Viciano P, Alarcón-González A, Gómez-Mateos J, León-Jimenez E, Sarasanacenta M, López-Pua Y, Pachón J. Pharmacokinetic interactions between efavirenz and rifampicin in HIV-infected patients with tuberculosis. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41: 681-90.
155. Luoma PV. Cytochrome P450--physiological key factor against cholesterol accumulation and the atherosclerotic vascular process. *Ann Med*. 2007; 39: 359-70.
156. Ma Q, Okusanya OO, Smith PF, Dicenzo R, Slish JC, Catanzaro LM, Forrest A, Morse GD. Pharmacokinetic drug interactions with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005; 1: 473-85.
157. Macías J, Melguizo I, Fernández-Rivera FJ, García-García A, Mira JA, Ramos AJ, Rivera JM, Pineda JA. Mortality due to liver failure and impact on survival of hepatitis virus infections in HIV-infected patients receiving potent anti-retroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 775-81.
158. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1451-7.
159. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 2003; 107: 2775-9.
160. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 1991; 286: 152-154.
161. Mackness, MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Arteriosclerosis*. 1993; 104: 129-135.
162. Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2004; 15: 399-404.
163. Maggiolo F, Ripamonti D, Gregis G, Quinzan G, Callegaro A, Arici C, Ravasio L, Suter F. Once-a-day therapy for HIV infection: a controlled, randomized study in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients. *Antivir Ther*. 2003; 8: 339-46.
164. Maggiolo F. Efavirenz. *Expert Opin Pharmacother*. 2007; 8: 1137-45.
165. Martin-Carbonero L, Núñez M, González-Lahoz J, Soriano V. Incidence of liver injury after beginning anti-retroviral therapy with Efavirenz or nevirapine. *HIV Clin Trials*. 2003; 4: 115-20.
166. Martínez E, Garcia-Viejo MA, Blanco JL e col Impact of switching from human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors to Efavirenz in successfully treated adults with lipodystrophy. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 1266-73.
167. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2001; 15: 71-5.
168. Masiá M, Padilla S, Bernal E, Almenar MV, Molina J, Hernández I, Graells ML, Gutiérrez F. Influence of anti-retroviral therapy on oxidative stress and cardiovascular risk: a prospective cross-sectional study in HIV-infected patients. *Clin Ther*. 2007; 29: 1448-55.
169. Maserati R, Villani P, Seminari E, Pan A, Lo Caputo S, Regazzi MB. High plasma levels of nelfinavir and Efavirenz in two

HIV-positive patients with hepatic disease. *AIDS*. 1999; 13: 870-1.

170. Mathiesen S, Justesen US, Von Lüttichau HR, Hansen AB. Genotyping of CYP2B6 and therapeutic drug monitoring in an HIV-infected patient with high Efavirenz plasma concentrations and severe CNS side-effects. *Scand J Infect Dis*. 2006; 38: 733-5.
171. McCabe SM, Ma Q, Sligh JC, Catanzaro LM, Sheth N, DiCenzo R, Morse GD. Anti-retroviral therapy: pharmacokinetic considerations in patients with renal or hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47: 153-72.
172. McComsey G, Bhumbra N, Ma JF, Rathore M, Alvarez A; First Pediatric Switch Study. Impact of protease inhibitor substitution with Efavirenz in HIV-infected children: results of the First Pediatric Switch Study. *Pediatrics*. 2003; 111: e275-81.
173. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*. 1986; 32: 671-673.
174. Mirochnick M, Capparelli E. Pharmacokinetics of anti-retrovirals in pregnant women. *Clin Pharmacokinet*. 2004; 43: 1071-87.
175. Moltó J, Blanco A, Miranda C, Miranda J, Puig J, Valle M, Delavarga M, Fúmaz CR, Barbanj MJ, Clotet B. Variability in non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitors concentrations among HIV-infected adults in routine clinical practice. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 63: 715-21.
176. Mouly S, Lown KS, Kornhauser D, Joseph JL, Fiske WD, Benedek IH, Watkins PB. Hepatic but not intestinal CYP3A4 displays dose-dependent induction by Efavirenz in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 72: 1-9.
177. Moyer TP, Temesgen Z, Enger R, Estes L, Charlson J, Oliver L, Wright A. Drug monitoring of anti-retroviral therapy for HIV-1 infection: method validation and results of a pilot study. *Clin Chem*. 1999; 45: 1465-76.
178. Moyle GJ e Back D. Principles and practice of HIV protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Medicine*. 2001; 2: 105-13.
179. Moyle GJ, DeJesus E, Cahn P, Castillo SA, Zhao H, Gordon DN, Craig C, Scott TR; Ziagen Once-Daily in Antiretroviral Combination Therapy (CNA30021) Study Team. Abacavir once or twice daily combined with once-daily lamivudine and efavirenz for the treatment of antiretroviral-naïve HIV-infected adults: results of the Ziagen Once Daily in Antiretroviral Combination Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 38: 417-25.
180. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, Pushkarsky T, Dubrovsky L, Mukhamedova N, Fu Y, Dart A, Orenstein JM, Bobryshev YV, Bukrinsky M, Sviridov D. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol*. 2006; 1: e365.
181. Muñoz-Moreno JA, Fúmaz CR, Ferrer MJ, González-García M, Moltó J, Negro E, Clotet B. Neuropsychiatric symptoms associated with efavirenz: prevalence, correlates, and management. A neurobehavioral review. *AIDS Rev*. 2009; 11: 103-9.
182. Mutlib AE, Chen H, Nemeth G, Gan LS, Christ DD. Liquid chromatography/mass spectrometry and high-field nuclear magnetic resonance characterization of novel mixed diconjugates of the non-nucleoside human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase inhibitor, Efavirenz. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 1045-56.
183. Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 6457-61.
184. Nasi M, Borghi V, Pinti M, Bellodi C, Lugli E, Maffei S, Troiano L, Richeldi L, Mussini C, Esposito R, Cossarizza A. MDR1 C3435T genetic polymorphism does not influence the response to anti-retroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients. *AIDS*. 2003; 17: 1696-8.
185. Navab, M., S. Hama-Levy, B. J. Van Lenten, G. C. Fonarow, C. J. Cardinez, L. W. Castellani, M. L. Brennan, A. J. Lusis, A. M. Fogelman, and B. N. La Du. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J. Clin. Invest*. 1997; 99: 2005-2019.
186. Negro E, Ribalta J, Ferre R, Salazar J, Rey-Jolyr C, Sirera G, Masana L, Clotet B. Efavirenz induces a striking and generalized increase of HDL-cholesterol in HIV-infected patients. *AIDS* 2004; 18: 819-821.
187. Nerad J, Romeyn M, Silverman E, Allen-Reid J, Dieterich D, Merchant J, A Pelletier V, Tinnerello D, Fenton M. General nutrition management in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: S52-62.
188. Nettles RE, Kieffer TL, Parsons T, Johnson J, Cofrancesco J Jr, Gallant JE, Carson KA, Siliciano RF, Flexner C. Marked intraindividual variability in antiretroviral concentrations may limit the utility of therapeutic drug monitoring. *Clin Infect Dis*.

2006; 42: 1189-96.

189. Ngondi JL, Oben J, Forkah DM, Etame LH, Mbanya D. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Res Ther.* 2006; 22: 3-19.
190. Nolan D. Do non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors contribute to lipodystrophy? *Drug Saf.* 2005; 28: 1069-74.
191. Núñez M, González de Requena D, Gallego L, Jimenez-Nacher I, González-Lahoz J, Soriano V. Higher Efavirenz plasma levels correlate with development of insomnia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001; 28: 399-400.
192. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290: 921-7.
193. Oh J, Hegele RA. HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 787-96.
194. Ono A, Freed EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 13925-30.
195. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998; 338: 853-60.
196. Parienti JJ, Massari V, Rey D, Poubeau P, Verdon R; SIROCCO study team. Efavirenz to nevirapine switch in HIV-1-infected patients with dyslipidemia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 263-6.
197. Parra S, Alonso-Villaverde C, Coll B, Ferré N, Marsillach J, Aragonès G, Mackness M, Mackness B, Masana L, Joven J, Camps J. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis.* 2007; 194: 175-81.
198. Pauli-Magnus C, Kroetz DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharm Res.* 2004; 21: 904-913.
199. Pernerstorfer-Schoen H, Jilma B, Perschler A, Wichlas S, Schindler K, Schindl A, Rieger A, Wagner OF, Quehenberger P. Sex differences in HAART-associated dyslipidaemia. *AIDS.* 2001; 15: 725-34.
200. Petrovic V, Teng S, Piquette-Miller M. Regulation of drug transporters during infection and inflammation. *Mol Interv.* 2007; 7: 99-111.
201. Pfister M, Labbé L, Hammer SM, Mellors J, Bennett KK, Rosenkranz S, Sheiner LB; Adult AIDS Clinical Trial Group Study 398. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of efavirenz, nelfinavir, and indinavir: Adult AIDS Clinical Trial Group Study 398. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 130-7.
202. Playfer JR, Eze LC, Bullen MF, Evans DA. Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. *J Med Genet.* 1976; 13: 337-42.
203. Podsadecki TJ, Vrijens BC, Tousset EP, Rode RA, Hanna GJ. "White Coat Compliance" Limits the Reliability of Therapeutic Drug Monitoring in HIV-1-Infected Patients. *HIV Clin Trials.* 2008; 9: 238-46.
204. Poirier JM, Robidou P, Jaillon P. Simple and simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir plus M8 nelfinavir metabolite and the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors Efavirenz and nevirapine in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Ther Drug Monit.* 2005; 27: 186-92.
205. Polgreen PM, Fultz SL, Justice AC, Wagner JH, Diekema DJ, Rabeneck L, Weissman S, Stapleton JT. Association of hypocholesterolaemia with hepatitis C virus infection in HIV-infected people. *HIV Med.* 2004; 5: 144-50.
206. Pomerantz RJ. Reservoirs, sanctuaries, and residual disease: the hiding spots of HIV-1. *HIV Clin Trials.* 2003; 4: 137-43.
207. Pozniak AL, Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Gazzard B, Campo RE, Chen SS, McColl D, Enejosa J, Toole JJ, Cheng AK. Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and Efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and Efavirenz in anti-retroviral-naïve patients: virologic, immunologic, and morphologic changes--a 96-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 43:535-40.
208. Rahmani M, Raiszadeh F, Allahverdian S, Kiaii S, Navab M, Azizi F. Coronary artery disease is associated with the ratio of apolipoprotein A-I/B and serum concentration of apolipoprotein B, but not with paraoxonase enzyme activity in Iranian subjects. *Atherosclerosis* 2002; 162: 381–389.

209. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest.* 2006; 116: 3090-100.
210. Ren Y, Nuttall JJ, Egbers C, Eley BS, Meyers TM, Smith PJ, Maartens G, McIlleron HM. High prevalence of subtherapeutic plasma concentrations of Efavirenz in children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007; 45: 133-6.
211. Rendón A, Núñez M, Jiménez-Nácher I, González de Requena D, González-Lahoz J, Soriano V. Clinical benefit of interventions driven by therapeutic drug monitoring. *HIV Med.* 2005; 6: 360-5.
212. Renton KW. Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab.* 2004; 5: 235-43.
213. Rhee MS, Greenblatt DJ. Pharmacologic Consideration for the Use of Anti-retroviral Agents in the Elderly *J. Clin. Pharmacol.* 2008; 48; 1212.
214. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON-1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics.* 1999; 9: 745-53.
215. Riddler SA, Smit E, Cole SR, Li R, Chmiel JS, Dobs A, Palella F, Visscher B, Evans R, Kingsley LA. Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA.* 2003; 289: 2978-82.
216. Riddler SA, Li X, Chu H, Kingsley LA, Dobs A, Evans R, Palella F, Visscher B, Chmiel JS, Sharrett A. Longitudinal changes in serum lipids among HIV-infected men on highly active anti-retroviral therapy. *HIV Med.* 2007; 8: 280-7.
217. Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, Peeples L, Powderly WG, Klingman KL, Garren KW, George T, Rooney JF, Brizz B, Lalloo UG, Murphy RL, Swindells S, Havlir D, Mellors JW; AIDS Clinical Trials Group Study A5142 Team. Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2008. 15; 358: 2095-106.
218. Rivero A, Mira JA, Pineda JA. Liver toxicity induced by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 342-6.
219. Robertson SM, Scarsi KK, Postelnick MJ, Lynch P. Elevated plasma concentrations of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis B or C: case series and literature review. *Pharmacotherapy.* 2005; 25: 1068-72.
220. Robertson SM, Penzak SR, Pau A. Drug interactions in the management of HIV infection: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2007; 8: 2947-63.
221. Rodríguez-Nóvoa S, Barreiro P, Rendon A, Jimenez-Nacher I, González-Lahoz J, Soriano V. Influence of 516G>T polymorphisms at the gene encoding the CYP450-2B6 isoenzyme on Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected subjects. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 1358-61.
222. Rose H, Woolley I, Hoy J, Dart A, Bryant B, Mijch A, Sviridov D. HIV infection and high-density lipoprotein: the effect of the disease vs the effect of treatment. *Metabolism.* 2006; 55: 90-95.
223. Rose H, Hoy J, Woolley I, Tchoua U, Bukrinsky M, Dart A, Sviridov D. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis.* 2008; 199: 79-86.
224. Rosenkranz SL, Yarasheski KE, Para MF, Reichman RC, Morse GD. Anti-retroviral Drug Levels and Interactions Affect Lipid, Lipoprotein, and Glucose Metabolism in HIV-1 Seronegative Subjects: A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis. *Metab Syndr Relat Disord.* 2007; 5: 163-73.
225. Rotger M, Colombo S, Furrer H, Bleiber G, Buclin T, Lee BL, Keiser O, Biollaz J, Décosterd L, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of Efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15: 1-5.
226. Rotger M, Csajka C, Telenti A. Genetic, ethnic, and gender differences in the pharmacokinetics of anti-retroviral agents. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2006; 3: 118-25.
227. Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Décosterd L, Bliedernicht J, Saussele T, Günthard HF, Schwab M, Eichelbaum M, Telenti A, Zanger UM. Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther.* 2007a; 81: 557-66.
228. Rotger M, Colombo S, Furrer H, Décosterd L, Buclin T, Telenti A. Does tenofovir influence efavirenz pharmacokinetics?

229. Saag MS, Cahn P, Raffi F, Wolff M, Pearce D, Molina JM, Powderly W, Shaw AL, Mondou E, Hinkle J, Borroto-Esoda K, Quinn JB, Barry DW, Rousseau F; FTC-301A Study Team. Efficacy and safety of emtricitabine vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a randomized trial. *JAMA*. 2004; 292: 180-9.
230. Sanathanan LP, Peck CC. The randomized concentration-controlled trial: an evaluation of its sample size efficiency. *Control Clin Trials*. 1991; 12: 780-94.
231. Sandstrom PA, Murray J, Folks TM, Diamond AM. Antioxidant defenses influence HIV-1 replication and associated cytopathic effects. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 1485-91.
232. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet*. 2001; 358: 383-4.
233. Sellmeyer DE, Grunfeld C. Endocrine and metabolic disturbances in human immunodeficiency virus infection and the acquired immune deficiency syndrome. *Endocr Rev*. 1996; 17: 518-32.
234. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S. Analytical methods validation: Bioavailability, Bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Eur J Drug Met Pharmacokinet*. 1991; 16: 249-55.
235. Shikuma CM, Yang Y, Glesby MJ, Meyer WA 3rd, Tashima KT, Ribaldo HJ, Webb N, Bastow B, Kuritzkes DR, Gulick RM. Metabolic effects of protease inhibitor-sparing anti-retroviral regimens given as initial treatment of HIV-1 Infection (AIDS Clinical Trials Group Study A5095). *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 44: 540-50.
236. Shlay JC, Bartsch G, Peng G, Wang J, Grunfeld C, Gibert CL, Visnegarwala F, Raghavan SS, Xiang Y, Farrough M, Perry HE, Kotler D, El-Sadr WM. Long-term body composition and metabolic changes in anti-retroviral naive persons randomized to protease inhibitor-, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-, or protease inhibitor plus nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based strategy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 44: 506-17.
237. Siagris D, Christofidou M, Theocharis GJ, Pagoni N, Papadimitriou C, Lekkou A, Thomopoulos K, Starakis I, Tsamandas AC, Labropoulou-Karatza C. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *J Viral Hepat*. 2006; 13: 56-61.
238. Slain D, Pakyz A, Israel DS, Monroe S, Polk RE. Variability in activity of hepatic CYP3A4 in patients infected with HIV. *Pharmacotherapy*. 2000; 20: 898-907.
239. Smith PF, DiCenzo R, Morse GD. Clinical pharmacokinetics of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 2001; 40: 893-905.
240. Sotaniemi EA, Arranto AJ, Pelkonen O, Pasanen M. Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. *Clin Pharmacol Ther*. 1997; 61: 331-9.
241. Stähle L, Moberg L, Svensson JO, Sonnerborg A. Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients: inter- and intraindividual variability and clinical effects. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 267-70.
242. Stöhr W, Back D, Dunn D, Sabin C, Winston A, Gilson R, Pillay D, Hill T, Ainsworth J, Pozniak A, Leen C, Bansi L, Fisher M, Orkin C, Anderson J, Johnson M, Easterbrook P, Gibbons S, Khoo S; Liverpool TDM Database; UK CHIC Study. Factors influencing efavirenz and nevirapine plasma concentration: effect of ethnicity, weight and co-medication. *Antivir Ther*. 2008; 13:675-85.
243. Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*. 2007; 73: 1573-81.
244. Störmer E, von Moltke LL, Perloff MD, Greenblatt DJ. Differential modulation of P-glycoprotein expression and activity by non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in cell culture. *Pharm Res*. 2002; 19: 1038-45.
245. Sulkowski MS, Thomas DL, Mehta SH, Chaisson RE, Moore RD. Hepatotoxicity associated with nevirapine or Efavirenz-containing anti-retroviral therapy: role of hepatitis C and B infections. *Hepatology*. 2002; 35: 182-9.
246. Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit*. 2004; 10: RA5-14.
247. Takahashi M, Ibe S, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Suzuki T, Mamiya N, Hamaguchi M, Kaneda T. No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentrations in Japanese HIV type 1-infected

- patients treated with EFV containing HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23: 983-7.
248. Tashima KT, Caliendo AM, Ahmad M, Gormley JM, Fiske WD, Brennan JM, Flanigan TP. Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) suppression and Efavirenz drug concentrations in HIV-1-infected patients receiving combination therapy. *J Infect Dis*. 1999; 180: 862-4.
  249. Tashima KT, Bausserman L, Alt EN, Aznar E, Flanigan TP. Lipid changes in patients initiating Efavirenz- and indinavir-based anti-retroviral regimens *HIV Clin Trials*. 2003; 4: 29-36.
  250. Taylor S, Reynolds H, Sabin CA, Drake SM, White DJ, Back DJ, Pillay D. Penetration of Efavirenz into the male genital tract: drug concentrations and antiviral activity in semen and blood of HIV-1-infected men. *AIDS*. 2001; 15: 2051-3.
  251. Telenti A. New developments in laboratory monitoring of HIV-1 infection. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 137-43.
  252. Titier K, Lagrange F, Péhourcq F, Edno-Mcheik L, Moore N, Molimard M. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the six HIV-protease inhibitors and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma. *Ther Drug Monit*. 2002; 24: 417-24.
  253. Thomson MM, Najera R. Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe. *J Infect Dis*. 2007; 196: 1120-4.
  254. Thyagarajan B, Jacobs DR Jr, Carr JJ, Alozie O, Steffes MW, Kailash P, Hayes JH, Gross MD. Factors associated with paraoxonase genotypes and activity in a diverse, young, healthy population: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Clin Chem*. 2008; 54: 738-46.
  255. Torti C, Quiros-Roldan E, Regazzi-Bonora M, De Luca A, Lo Caputo S, Di Giambenedetto S, Patroni A, Villani P, Micheli V, Carosi G; Resistance and Dosage Adapted Regimens Study Group of the MASTER Cohort. Lipid abnormalities in HIV-infected patients are not correlated with lopinavir plasma concentrations. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004; 35: 324-6.
  256. Torti C, Quiros-Roldan E, Regazzi M, De Luca A, Mazzotta F, Antinori A, Ladisa N, Micheli V, Orani A, Patroni A, Villani P, Lo Caputo S, Moretti F, Di Giambenedetto S, Castelnuovo F, Maggi P, Tinelli C, Carosi G; RADAR-MASTER Study Group. A randomized controlled trial to evaluate antiretroviral salvage therapy guided by rules-based or phenotype-driven HIV-1 genotypic drug-resistance interpretation with or without concentration-controlled intervention: the Resistance and Dosage Adapted Regimens (RADAR) study. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 1828-36.
  257. Tribut O, Arvieux C, Michelet C, Chaplain JM, Allain H, Bentué-Ferrer D. Simultaneous quantitative assay of six HIV protease inhibitors, one metabolite, and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma by isocratic reversed-phase liquid chromatography. *Ther Drug Monit*. 2002; 24: 554-62.
  258. Trotta MP, Ammassari A, Melzi S, Zaccarelli M, Ladisa N, Sighinolfi L, Mura MS, d'Arminio Monforte A, Antinori A; AdICoNA Study Group. Treatment-related factors and highly active anti-retroviral therapy adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002; 31: S128-31.
  259. Troughton JA, Woodside JV, Yarnell JW, Arveiler D, Amouyel P, Ferrières J, Ducimetière P, Patterson CC, Luc G; PRIME Study Group. Paraoxonase activity and coronary heart disease risk in healthy middle-aged males: the PRIME study. *Atherosclerosis*. 2008; 197: 556-63.
  260. Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Homozygous CYP2B6 \*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma Efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard Efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 319: 1322-6.
  261. van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*. 1995; 96: 2758-67.
  262. van Leth F, Phanuphak P, Ruxrungtham K, Baraldi E, Miller S, Gazzard B, Cahn P, Laloo UG, van der Westhuizen IP, Malan DR, Johnson MA, Santos BR, Mulcahy F, Wood R, Levi GC, Reboledo G, Squires K, Cassetti I, Petit D, Raffi F, Katlama C, Murphy RL, Horban A, Dam JP, Hassink E, van Leeuwen R, Robinson P, Wit FW, Lange JM; 2NN Study team. Comparison of first-line antiretroviral therapy with regimens including nevirapine, efavirenz, or both drugs, plus stavudine and lamivudine: a randomised open-label trial, the 2NN Study. *Lancet*. 2004a; 363: 1253-63.
  263. van Leth F, Phanuphak P, Stroes E, Gazzard B, Cahn P, Raffi F, Wood R, Bloch M, Katlama C, Kastelein JJP, Schechter M, Murphy RL, Horban A, Hall DB, Lange JMA, Reiss P. Nevirapine and Efavirenz elicit different changes in lipid profiles in anti-retroviral-therapy-naive patients infected with HIV-1. *PLoS Med* 2004b; 1: e19.
  264. van Leth FV, Kappelhoff BS, Johnson D, Losso MH, Boron-Kaczmarek A, Saag MS, Livrozet JM, Hall DB, Leith J, Huitema

- AD, Wit FW, Beijnen JH, Lange JM; 2NN Study Group. Pharmacokinetic parameters of nevirapine and Efavirenz in relation to anti-retroviral efficacy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22: 232-9.
265. Vaz da Silva. Antivíricos, em Osswald W e Guimarães S, Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. 2001. Porto Editora. 4ª edição. 960-99.
266. Villani P, Regazzi MB, Castelli F, Viale P, Torti C, Seminari E, Maserati R. Pharmacokinetics of efavirenz (EFV) alone and in combination therapy with nelfinavir (NFV) in HIV-1 infected patients. *Br J Clin Pharmacol*. 1999; 48: 712-5.
267. von Hentig N, Koenigs C, Elanjikal S, Linde R, Dunsch D, Kreuz W, Funk MB. Need for therapeutic drug monitoring in HIV-1 infected children receiving Efavirenz doses according to international guidelines. *Eur J Med Res*. 2006; 11: 377-80.
268. Vrijens B, Urquhart J. Patient adherence to prescribed antimicrobial drug dosing regimens. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55: 616-27.
269. Walubo A. The role of cytochrome P450 in anti-retroviral drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2007; 3: 583-98.
270. Wang M, Briggs MR. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev*. 2004; 104: 119-37.
271. Wang H, Tompkins LM. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme. *Curr Drug Metab*. 2008; 9: 598-610.
272. Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of Efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of Efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 306: 287-300.
273. Warnke D, Barreto J, Temesgen Z. Anti-retroviral drugs. *J Clin Pharmacol*. 2007; 47: 1570-9.
274. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995; 96: 2882-2891.
275. Weiss J, Theile D, Ketabi-Kiyanvash N, Lindenmaier H, Haefeli WE. Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Metab Dispos*. 2007; 35:340-4.
276. Weiss J, Weis N, Ketabi-Kiyanvash N, Storch CH, Haefeli WE. Comparison of the induction of P-glycoprotein activity by nucleotide, nucleoside, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2008; 579:104-9.
277. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjö B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, Costagliola D, De Luca A, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hatzakis A, Hemmer R, Hoepelman A, Horban A, Korn K, Kücherer C, Leitner T, Loveday C, MacRae E, Maljkovic I, de Mendoza C, Meyer L, Nielsen C, Op de Coul EL, Ormaasen V, Paraskevis D, Perrin L, Puchhammer-Stöckl E, Ruiz L, Salminen M, Schmit JC, Schneider F, Schuurman R, Soriano V, Stanczak G, Stanojevic M, Vandamme AM, Van Laethem K, Violin M, Wilbe K, Yerly S, Zazzi M, Boucher CA; SPREAD Programme. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis*. 2005; 192: 958-66.
278. Williams FM, Nicholson EN, Woolhouse NW, Adjepon-Yamoah KK, Rawlins MD. Activity of esterases in plasma from Ghanaian and British subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986; 31: 485-9.
279. Winzer R, Langmann P, Zilly M, Tollmann F, Schubert J, Klinker H, Weissbrich B. No influence of the P-glycoprotein polymorphisms MDR1 G2677T/A and C3435T on the virological and immunological response in treatment naïve HIV-positive patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005; 4: 3.
280. Wyen C, Hendra H, Vogel M, Hoffmann C, Knechten H, Brockmeyer NH, Bogner JR, Rockstroh J, Esser S, Jaeger H, Harrer T, Mauss S, van Lunzen J, Skoetz N, Jetter A, Groneuer C, Fätkenheuer G, Khoo SH, Egan D, Back DJ, Owen A; German Competence Network for HIV/AIDS. Impact of CYP2B6 983T>C polymorphism on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61: 914-8.
281. Yeni P. French expert group's recommendations for medical management of HIV infection. French Guidelines. 2006. [http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/yeni\\_sida/rapport\\_experts\\_angl\\_2006.pdf](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/yeni_sida/rapport_experts_angl_2006.pdf)
282. Young J, Weber R, Rickenbach M, Furrer H, Bernasconi E, Hirschel B, Tarr PE, Vernazza P, Battegay M, Bucher HC. Lipid profiles for anti-retroviral-naive patients starting PI- and NNRTI-based therapy in the Swiss HIV cohort study. *Antivir Ther*. 2005; 10: 585-91.
283. Zanger UM, Klein K, Saussele T, Blievernicht J, Hofmann MH, Schwab M. Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and

emerging clinical significance. *Pharmacogenomics*. 2007; 8: 743-59.

284. Zangerle R, Sarletti M, Gallati H, Reibnegger G, Wachter H, Fuchs D. Decreased plasma concentrations of HDL cholesterol in HIV-infected individuals are associated with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1994; 7: 1149-56.