

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

ANA CAROLINA CONCHON COSTA

Disposição cinética e excreção renal da gabapentina: o papel dos transportadores para cátions orgânicos e o efeito do controle glicêmico em pacientes com dor neuropática

Ribeirão Preto
2019

ANA CAROLINA CONCHON COSTA

Disposição cinética e excreção renal da gabapentina: o papel dos transportadores para cátions orgânicos e o efeito do controle glicêmico em pacientes com dor neuropática

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 18/09/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Costa, Ana Carolina Conchon

Disposição cinética e excreção da gabapentina: o papel dos transportadores para cátions orgânicos e o efeito do controle glicêmico em pacientes com dor neuropática. Ribeirão Preto, 2019.

107 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: de Moraes, Natália Valadares.

1. Gabapentina. 2. OCT2. 3. Dor neuropática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolina Conchon Costa

Disposição cinética e excreção renal da gabapentina: o papel dos transportadores para cátions orgânicos e o efeito do controle glicêmico em pacientes com dor neuropática

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus,
por abençoar, cuidar e guiar os meus sonhos e conquistas

Ao meu pai Carlos e à minha mãe Ivete,
por todo amor, apoio e exemplo em todos os aspectos da minha vida

Às minhas irmãs Sarah e Laura,
pelo companheirismo e apoio em todos os momentos da minha vida

Agradecimentos

À minha orientadora profa. dra. Natália Valadares de Moraes, pela sua paciência em ensinar e orientar, e pela contribuição ao meu crescimento científico e intelectual durante esses anos de convivência.

À responsável clínica profa. dra. Gabriela Rocha Lauretti, pela colaboração durante a etapa clínica do projeto e pela contribuição ao meu crescimento científico e intelectual durante esses anos de convivência.

Aos colaboradores profa. dra. Maria Cristina Foss de Freitas e prof. dr. Francisco José Albuquerque de Paula pela colaboração durante a etapa clínica do projeto, e ao prof. dr. Cleslei Fernando Zanelli pela colaboração durante a etapa genotípica do projeto.

Ao supervisor do estágio de doutoramento prof. dr. rer. nat. Giuliano Ciarimboli, pela sua paciência em supervisionar e ensinar, e pela contribuição ao meu crescimento científico e intelectual durante o tempo de estágio, na etapa de análise in vitro do projeto.

Ao corpo clínico do Ambulatório de Dor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (médicos, residentes e equipe de enfermagem), pela contribuição e orientação na seleção dos pacientes com dor neuropática.

Ao corpo clínico do Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (médicos, residentes e equipe de enfermagem), pela orientação na seleção dos pacientes diabéticos.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto por toda dedicação e pela competência no cuidado dos pacientes e na coleta das amostras.

Aos técnicos de laboratório Vinícius de Paula, Adriana Rocha, Maria Paula Costa Marques, Mariana Marchi Santoni Biasioli, Astrid Dirks, Ute Neugebauer e Rita Schröter pela assistência e dedicação durante a realização das várias etapas desse projeto.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, pela troca de conhecimento e por contribuírem para minha formação profissional durante a realização do doutorado.

Aos colegas do grupo de trabalho Priscila Akemi Yamamoto e Jhohann Richard de Lima Benzi por toda a dedicação e auxílio na realização desse projeto.

Aos amigos Agata Barradas, Alexandra Marie, Andressa Keiko, Ane Simionato, Bianca Malfará, Camila Mini, Carolina Higashi, Chiara Redel, Daniela Lorencini, Elly Wendt, Gabriela Meireles, Juciene Caris, Leandro Pippa, Maria Thereza, Milena

Locci, Otávio Rocha, Roberta Cestari e Vivien Barz pelo companheirismo, auxílio e força durante essa caminhada.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado, pela concessão da bolsa SWE para realização de estágio de doutoramento na University of Münster (Alemanha) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*“Alle Dinge sind Gift
und nichts ist ohne Gift,
allein die Dosis macht’s,
dass ein Ding kein Gift ist“.*

(Todas as coisas são venenosas,
e nada é sem veneno,
apenas a dose faz,
com que uma coisa não seja veneno)

Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (Paracelsus)

RESUMO

COSTA, A. C. C. **Disposição cinética e excreção renal da gabapentina: o papel dos transportadores para cátions orgânicos e o efeito do controle glicêmico em pacientes com dor neuropática.** 2019. 107f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A gabapentina (GBP), anticonvulsivante utilizado para tratamento de dor neuropática, é eliminada principalmente inalterada na urina. Estudos sugerem que a secreção tubular ativa nos rins contribui para a excreção de GBP. Estudos em ratos com diabetes experimental sugerem que a hiperglicemia reduz a atividade de transportadores de cátions orgânicos (Octs). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o papel dos OCTs na disposição cinética e na farmacodinâmica da GBP em pacientes com dor neuropática e verificar a regulação da atividade desses transportadores pelo controle glicêmico no diabetes. Foi realizado estudo in vitro para avaliar a interação de GBP e do provável inibidor de OCTs cetirizina (CTZ) com transportadores OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, MATE1 e MATE2-K expressos em células HEK. O estudo clínico cruzado foi realizado em pacientes com dor neuropática (n=10, Controle) para avaliar a influência da CTZ na disposição cinética da GBP. Para avaliar o efeito do controle glicêmico, foram investigados pacientes com DM2 controlado (DC, n=9) e DM2 não controlado (DNC, n=10). Todos os participantes investigados apresentavam dor neuropática de intensidade ≥ 4 na escala visual analógica de dor (EVA) e foram tratados com dose única oral de 300 mg de GBP (Fase 1) ou CTZ (20 mg/dia) durante 5 dias e dose única de GBP no último dia (Fase 2). Apenas os pacientes do grupo Controle participaram da Fase 2. Amostras seriadas de sangue e urina foram coletadas até 36 horas após a administração de GBP. A intensidade de dor foi avaliada nos mesmos tempos de coleta de sangue. Todos os participantes foram genotipados para os polimorfismos *SLC22A2* 808G>T e *SLC22A4* 1507C>T. Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados por análise não-compartimental. Os experimentos in vitro mostraram que a GBP é substrato para hMATE1 e hOCTN1, e que sua interação com hOCT2 não é clinicamente relevante. A CTZ inibiu os transportadores hOCTs e hMATEs. No estudo clínico, a coadministração de CTZ resultou em aumento de CL/F (14,6 L/h) e Vd/F (151,9 L) e redução de $AUC^{0-\infty}$ (20,6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$), quando comparados com a administração da GBP apenas (CL/F: 10,6 L/h; Vd/F 106,2 L; $AUC^{0-\infty}$ 28,2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). As menores concentrações plasmáticas de GBP quando coadministrada com CTZ resultaram em redução na atenuação de dor. O grupo DNC apresentou diferenças marginais nos parâmetros C_{max} (1,86 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p=0,08780$) e Vd/F (178,8 L, $p=0,0506$), em relação ao grupo Controle (C_{max} : 2,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Vd/F: 106,2 L). Não foi encontrada diferença na disposição cinética da GBP entre os genótipos para os polimorfismos investigados. Conclusão: a GBP é substrato dos transportadores renais hMATE1, hOCTN1 e hOCT2. O tratamento com CTZ e a hiperglicemia reduziram a exposição sistêmica da GBP, contudo essas alterações não podem ser explicadas por interação com os transportadores renais. Estes dados sugerem que a CTZ e a hiperglicemia reduzem a biodisponibilidade oral da GBP por saturação dos processos de absorção intestinal.

Palavras-chave: OCT2, GBP, CTZ, farmacocinética, diabetes tipo 2, dor neuropática

ABSTRACT

COSTA, A. C. C. **Gabapentin kinetic disposition and renal excretion: role of transporters for organic cations and the effect of glycemetic control in patients with neuropathic pain.** 2019. 107f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Gabapentin (GBP), anticonvulsant used to neuropathic pain treatment, is mainly eliminated unchanged in urine. Renal active tubular secretion has been suggested to contribute on GBP excretion by renal excretion. Studies performed on rats with experimental diabetes suggest that hyperglycemia reduces the activity of organic cation transporters (Oct). Thus, the aim of the study was to investigate the role of OCTs on kinetic disposition and pharmacodynamics of GBP in patients with neuropathic pain and to verify the regulation of these transporters' activity by glycemetic control in diabetes. An in vitro study was performed to evaluate the interaction of GBP and the probable OCTs inhibitor cetirizine (CTZ) with transporters OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, MATE1 and MATE2-K expressed in HEK cells. A cross-over clinical study was performed in patients with neuropathic pain (n=10, Control) to evaluate the influence of CTZ on GBP kinetic disposition. To evaluate the effect of glycemetic control, patients with controlled DM2 (DC, n=9) and uncontrolled DM2 (DNC, n=10) were investigated. All participants investigated had neuropathic pain of intensity ≥ 4 evaluated by analogue visual scale (EVA) and were treated with oral single-dose of 300 mg of GBP (Phase 1) or cetirizine (20 mg/day) for 5 days and single-dose of GBP on the last day (Phase 2). Only participants of Control group participated of Phase 2. Serial blood and urine samples were collected up to 36 hours after GBP administration. Pain intensity was evaluated on the same time of blood samples. All participants were genotyped for polymorphisms *SLC22A2* 808G>T and *SLC22A4* 1507C>T. The pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental analysis. The in vitro experiments showed that GBP is a substrate for hMATE and hOCTN1, and that the interaction with hOCT2 is not clinically relevant. CTZ inhibits the transporters hOCTs and hMATEs. In the clinical study, the coadministration of CTZ resulted in increase of CL/F (14.6 L) and Vd/F (151.9 L) and decrease of AUC^{0-∞} (20.6 µg.h/mL) when compared to the administration of GBP alone (CL/F: 10.6 L/h; Vd/F: 106.2 L; AUC^{0-∞}: 28.2 µg.h/mL). The lower plasma concentrations of GBP when coadministered with CTZ resulted in reduced pain attenuation. The DNC group showed marginal differences in parameters C_{max} (1.86 µg/mL, p=0.08780) and Vd/F (178.8 L, p=0.0506) in relation to Control group (C_{max}: 2.48 µg/mL; Vd/F: 106.2 L). No differences were found on GBP kinetic disposition between genotypes for investigated polymorphisms. Conclusion: GBP is a substrate for renal transporters hMATE, hOCTN1 and hOCT2. The treatment with CTZ and hyperglycemia reduced systemic exposure to GBP, although these changes cannot be explained by the interaction with renal transporters. These data suggest that CTZ and hyperglycemia reduce GBP oral bioavailability by saturation of intestinal absorption processes.

Keywords: OCT2, GBP, CTZ, pharmacokinetics, type-2 diabetes, neuropathic pain

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização dos transportadores para cátions orgânicos no túbulo proximal dos rins.....	20
Figura 2. Fórmula estrutural da GBP.....	23
Figura 3. Fórmula estrutural da CTZ.....	25
Figura 4. Fluxograma do preparo de amostra em lisado celular.....	34
Figura 5. Estudo do tamanho amostral em relação ao poder de teste.....	36
Figura 6. Desenho experimental para avaliação da influência do controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2 e da CTZ na disposição cinética da GBP em pacientes com dor neuropática.....	38
Figura 7. Escala Visual Analógica utilizada para classificar a intensidade de dor.....	39
Figura 8. Fluxograma do protocolo de preparo das amostras em plasma.....	40
Figura 9. Fluxograma do protocolo de preparo das amostras em urina.....	41
Figura 10. Curvas concentração-resposta para a inibição da captação de ASP ⁺ por GBP ou CTZ, mediado pelos transportadores para cátions orgânicos.....	45
Figura 11. Curva analítica de GBP e CTZ em lisado celular.....	47
Figura 12. Cromatogramas referentes a análise de lisado celular branco e enriquecido com GBP, CTZ e padrões internos deuterados por LC-MS/MS...	48
Figura 13. Transporte de GBP (0,1 µM) por transportadores para cátions orgânicos transfectados em células HEK.....	51
Figura 14. Transporte de CTZ (0,1 µM) por transportadores para cátions orgânicos transfectados em células HEK.....	52
Figura 15. Diagrama de fluxo do recrutamento de participantes da pesquisa (diagrama de fluxo segundo CONSORT 2010).....	53
Figura 16. Concentração plasmática e quantidade excretada na urina <i>versus</i> tempo no grupo Controle (n=10).....	58
Figura 17. Razão das médias geométricas (RMG, Fase2/Fase1) e intervalos de confiança 90% dos parâmetros farmacocinéticos nas fases 1 e 2.....	60
Figura 18. Atenuação de dor (%) dos participantes do grupo Controle, comparando-se Fase 1 e Fase 2.....	60

Figura 19. Concentração plasmática e quantidade excretada na urina <i>versus</i> tempo nos grupos Controle (n=10), DC (n=9) e DNC (n=10).....	62
Figura 20. Atenuação de dor (%), comparando-se os grupos Controle, DC e DNC.....	64
Figura 21. Efeito do polimorfismo genético <i>SLC22A2</i> 808G>T na concentração plasmática de GBP em pacientes com dor neuropática (n=29).....	66
Figura 22. Efeito do polimorfismo genético <i>SLC22A4</i> 1507C>T nas concentrações plasmáticas da GBP em pacientes com dor neuropática (n=29).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modo gradiente da fase móvel.....	33
Tabela 2 – Concentração de GBP ou CTZ necessárias para inibir em 50% (IC ₅₀) a captação de ASP ⁺ nos transportadores para cátions orgânicos expressos em células HEK	46
Tabela 3 – Parâmetros de validação do método de análise de GBP e CTZ em lisado celular.....	49
Tabela 4 - Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo (n=29).....	55
Tabela 5 - Exames bioquímicos dos participantes do estudo (n=29).....	56
Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos da GBP nas fases 1 e 2 (n=10). Dados apresentados como média geométrica (coeficiente de variação geométrico); mediana (percentis 25 e 75). Também estão apresentadas as razões das médias geométricas RMG Fase 2/Fase 1 com IC 90%.....	59
Tabela 7 - Influência do diabetes nos parâmetros farmacocinéticos da GBP em pacientes com dor neuropática. Dados apresentados como média geométrica (coeficiente de variação geométrico); mediana (percentis 25 e 75).....	63
Tabela 8 – Parâmetros farmacocinéticos da GBP nos grupos Controle (n=10), DC (n=9) e DNC (n=10). Dados apresentados como média geométrica (coeficiente de variação geométrico); mediana (percentis 25 e 75).....	64
Tabela 9 - Frequência alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos <i>SLC22A2</i> 808G>T e <i>SLC22A4</i> 1507C>T.....	65
Tabela 10 – Efeito do polimorfismo genético <i>SLC22A2</i> 808G>T nos parâmetros farmacocinéticos da GBP. Dados apresentados como mediana, percentis 25 e 75% e valor de p para o teste Mann-Whitney para dados não pareados e não paramétricos.....	66
Tabela 11 - Efeito do polimorfismo genético <i>SLC22A4</i> 1507C>T nos parâmetros farmacocinéticos da GBP. Dados apresentados como mediana, percentis 25 e 75% e valor de p para o teste Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
Ae	Quantidade excretada na urina de forma inalterada
AF	Ácido Fórmico
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASP ⁺	4-(4(dimetilamino)estéiril)-N-metilpiridínio
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva concentração plasmática versus tempo
Bcrp	Proteína de resistência ao câncer de mama
BHE	Barreira hematoencefálica
BT	Bilirrubina total
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	Centro de Controle de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFF	Conselho Federal de Farmácia
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CL/F	Clearance total aparente
CL _R	Clearance renal
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CTZ	Cetirizina
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450

DAAD	Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico
DC	Diabetes Controlado
DCM	Diclorometano
DM2	Diabetes tipo 2
DMEM	Dubelcoo's Modified Eagle Media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNC	Diabetes não Controlado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Eletronebulização
EVA	Escala Visual Analógica
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno
F _{el}	Fração excretada inalterada na urina
FM	Fase móvel
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GBP	Gabapentina
GGT	Gama glutamiltransferase
HbA1c	Hemoglobina glicada
HC	Hospital das Clínicas
HEK	Células de rim embrionário humano
IC	Intervalo de confiança
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
IDF	International Diabetes Federation
IMC	Índice de massa corporal
LAT	Transportador de aminoácido tipo L
LIQ	Limite inferior de quantificação
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LOD	Limite de detecção
MATE	Proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas

MCF-7	Células de adenocarcinoma mamário humano
MeOH	Metanol
MRM	Modo de monitoramento de reações múltiplas
Mrp	Proteína de resistência à múltiplos fármacos
NC	Não foi possível calcular
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
Oat	Transportador de ânions orgânicos
OC	Cátions orgânicos
OCT	Transportador de cátions orgânicos
OCTN	Transportador de cátions orgânicos novo
PCR-RT	Reação de cadeia em polimerase em tempo real
PEPT	Transportador de peptídeos
P-gp	Glicoproteína P
PI	Padrão interno
PK	Farmacocinética
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
RMG	Razão da média geométrica
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RP	Ribeirão Preto
rpm	Rotações por minuto
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SDS	Sulfato de sódio dodecyl
SEM	Erro padrão da média
SLC	Família de carreadores de soluto
SNP	Polimorfismo de base única
TEA	Tetraetilamônio
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
T _{max}	Tempo para atingir concentração plasmática máxima
TPA ⁺	Tetrapentilamônio
UHPLC	Cromatógrafo líquido de ultra eficiência
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica

USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
Vd/F	Volume de distribuição aparente
v.o.	Via oral
WHO	Organização Mundial da Saúde
WT	Células HEK não transfectadas - selvagem

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Transportadores renais para cátions orgânicos	19
1.2 Gabapentina (GBP)	22
1.3 Cetirizina (CTZ)	24
1.4 Diabetes mellitus tipo 2	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Estudo de interação GBP × CTZ e mecanismos de captação em transportadores para cátions orgânicos	29
3.1.1 Linhagens celulares	30
3.1.2 Inibição da captação do substrato ASP ⁺ por GBP e CTZ mediada por transportadores para cátions orgânicos	30
3.1.3 GBP e CTZ como substratos de transportadores para cátions orgânicos	31
3.1.3.1 Método de análise de GBP e CTZ em lisado celular	32
3.1.3.1.1 Reagentes e soluções	32
3.1.3.1.2 Condições cromatográficas e instrumentação	33
3.1.3.1.3 Procedimento de preparo da amostra	34
3.1.3.1.4 Preparo da curva analítica	34
3.1.3.1.5 Validação dos métodos analíticos	34
3.2 Casuística e Protocolo Clínico	35
3.2.1 Casuística	35
3.2.2 Protocolo Clínico	37
3.3 Análise da GBP em plasma e urina por CLAE-UV	39
3.4 Genotipagem para <i>SLC22A2</i> 808G>T e <i>SLC22A4</i> 1507C>T por reação em cadeia de polimerase em tempo real	41
3.5 Análise farmacocinética e farmacodinâmica	42
3.6 Análise estatística	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Inibição da captação de ASP ⁺ mediada pelos transportadores para cátions orgânicos	44
4.2 Estudos de transporte da GBP e CTZ	46
4.2.1 Validação do método de análise de GBP e CTZ em lisado celular	46
4.2.2 Experimentos de transporte	49
4.3 Estudo clínico da disposição cinética da GBP: Interação com CTZ e avaliação do efeito do controle glicêmico	53

4.3.1 Influência do inibidor de cátions orgânicos CTZ na disposição cinética da GBP.....	57
4.3.2 Influência do diabetes e seu controle glicêmico na disposição cinética da GBP.....	61
4.4 Influência dos polimorfismos <i>SLC22A2</i> 808G>T e <i>SLC22A4</i> 1507C>T na disposição cinética da GBP.....	65
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE(S).....	94
ANEXO(S).....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transportadores renais para cátions orgânicos

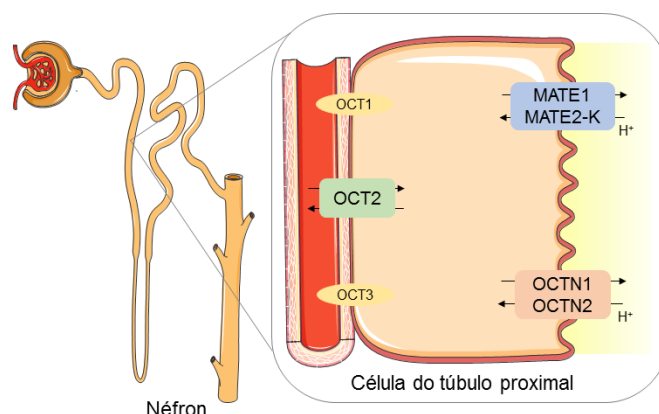
Estudos em Farmacometria mostram que os transportadores regulam a disposição de fármacos (farmacocinética) e a resposta (farmacodinâmica) (GIACOMINI *et al.*, 2010; POWELL, GOBBURU, 2007). Os transportadores de fármacos têm sido objeto de estudos clínicos que buscam identificar interações entre fármacos, interações fármaco-doenças, o papel da farmacogenômica, ou outras covariáveis que podem ter implicações na medicina de precisão (CIARIMBOLI, 2008; GIACOMINI *et al.*, 2010). A compreensão dos mecanismos de transporte de fármacos integrada aos estudos de absorção, metabolismo, distribuição e excreção são a base da abordagem mecanística da Farmacologia dos Sistemas. A caracterização de mecanismos complexos de interação envolvendo a disposição de fármacos dependente de transportadores poderão ser usados para o doseamento ou desenvolvimento de novas formulações que minimizem as interações entre fármacos ou interações fármaco-doença. Nesse contexto, podem ser elaboradas estratégias racionais de individualização da terapia para aumentar a efetividade e segurança na terapia farmacológica.

Uma vez que papel dos transportadores de fármacos na compreensão da terapia farmacológica tornou-se evidente, recomendações regulatórias de caracterização de interações fármaco-transportador passaram a fazer parte do desenvolvimento de fármacos e medicamentos. Organogramas para tomadas de decisão na elaboração de estudos em Farmacologia Clínica foram desenvolvidos pelo *International Transporter Consortium* (GIACOMINI *et al.*, 2010; GIACOMINI; HUANG, 2013). Novos desafios e novas metodologias na compreensão do papel de transportadores foram extensivamente explorados na última década (CHU *et al.*, 2018; GIACOMINI *et al.*, 2010; GIACOMINI; HUANG, 2013).

Aproximadamente 40% dos fármacos prescritos na prática clínica são cátions orgânicos (OC), substâncias que possuem carga positiva em pH fisiológico (KOESELL, 2013). Devido à carga positiva, o movimento dos OC através das membranas plasmáticas é mediado pelos transportadores de fármacos. A maioria dos transportadores para cátions orgânicos pertence à família de carreadores de soluto 22A (SLC22A) (transportador de cátions orgânicos (OCT) 1-3 e transportador de cátions orgânicos novo (OCTN) 1 e 2) ou à família de SLC47 (proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas (MATE) 1 e 2K) (NIES *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013). O

transportador de cátions orgânicos 2 humano (hOCT2) é expresso predominantemente na membrana basolateral do túbulo proximal dos rins, e promove transporte de cátions do sangue, para dentro das células do túbulo proximal, que representa o primeiro estágio no processo de secreção renal (XU *et al.*, 2013; ZAIR *et al.*, 2008). O processo é completado pelo transporte dos cátions orgânicos das células renais para a urina, promovido por hMATEs e hOCTNs, expressos na membrana plasmática luminal dos rins (Figura 1) (HARRACH; CIARIMBOLI, 2015). O hOCT1 é altamente expresso na membrana basolateral dos hepatócitos no fígado, e uma baixa expressão é encontrada nos rins e intestino, enquanto o hOCT3 é amplamente distribuído nos órgãos, com uma baixa expressão (NIES *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013;). As forças dirigentes do transporte mediado por essas proteínas são, além do gradiente químico dos substratos, o potencial de membrana no caso dos transportadores eletrogênicos de cátions orgânicos (OCTs) e o gradiente de pH oposto para antiportadores de cátions orgânicos (OCTNs e MATEs) (BUSCH *et al.*, 1996; DANGPRAPAI; WRIGHT, 2011; GRÜNDEMANN *et al.*, 1994; KEKUDA *et al.*, 1998; MEHRENS *et al.*, 2000; NIES *et al.*, 2011; OTSUKA *et al.*, 2005; TAMAI *et al.*, 1997; WU *et al.*, 1998). No caso de OCTN1, o gradiente de sódio iônico (Na^+) pode ser considerado uma força dirigente, visto que esse transportador também pode operar em uma maneira dependente de Na^+ (OHASHI *et al.*, 2001).

Figura 1. Localização dos transportadores para cátions orgânicos no túbulo proximal dos rins.



Fonte: próprio autor. OCT1: transportador de cátions orgânicos 1, baixa expressão nos rins; OCT2: transportador de cátions orgânicos 2, predominantemente expresso na membrana basolateral no túbulo proximal dos rins; OCT3: transportador de cátions orgânicos 3, baixa expressão nos rins; MATE1: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 1, altamente expresso na membrana apical do túbulo proximal dos rins; MATE2-K: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 2-K, predominantemente expresso nos rins; OCTN1: transportador de cátions orgânicos novo 1, altamente expresso nos rins; OCTN2: transportador de cátions orgânicos novo 2, altamente expresso nos rins.

Os substratos dos transportadores para cátions orgânicos podem ser de origem endógena, como acetilcolina, dopamina, epinefrina, norepinefrina, serotonina, histamina e colina, ou exógena, como os fármacos amantadina, cisplatina, cimetidina, ranitidina, metformina, GBP e CTZ (CIARIMBOLI, 2008; KOEPESELL, 2013; LAL *et al.*, 2010).

Aproximadamente 30% dos 200 medicamentos mais vendidos nos Estados Unidos tem eliminação principalmente renal (MORRISSEY *et al.*, 2013). Para os fármacos de excreção renal, os transportadores expressos nos rins podem explicar a variabilidade na disposição cinética, na efetividade e na segurança. A inibição da atividade desses transportadores leva a aumento na concentração plasmática de seus substratos, resultando em maior incidência de efeitos adversos e até mesmo casos de intoxicação (TSURUOKA *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2013).

Estudo realizado *in vitro* sugere que CTZ e pilsicainida sejam inibidores de OCT2, visto que os mesmos reduzem a captação do substrato tetraetilamônio (TEA) pelo transportador (TSURUOKA *et al.*, 2006). Além da CTZ e da pilsicainida, a cimetidina e a quinidina também são inibidores seletivos de OCT2 (GIACOMINI *et al.*, 2010). A CTZ também inibe a captação de TEA mediado pelos transportadores MATE1 e MATE2-K, o que também sugere que CTZ seja inibidor desses transportadores (TSUDA *et al.*, 2009). Não há dados sobre a influência da CTZ no OCTN1.

A atividade de transportadores pode ser regulada aguda ou cronicamente e situações patológicas alteraram a função de transportadores (CIARIMBOLI; SCHLATTER, 2005; SCHMIDT-LAUBER *et al.*, 2012). Ratos com DM2 induzido por dieta hipercalórica seguida de injeção de estreptozotocina (QIAN *et al.*, 2015; REED *et al.*, 2000) têm redução de 50% nos níveis renais do transportador Oct2, e de 4% nos níveis hepáticos da proteína de resistência à múltiplos fármacos 4 (Mrp4), o que sugere redução na atividade de ambos transportadores (NOWICKI *et al.*, 2008). Por outro lado, os níveis renais dos transportadores Mrp2, Mrp4, transportador de ânions orgânicos 2 (Oat2), e proteína de resistência ao câncer de mama (Bcrp) encontram-se aumentados em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (NOWICKI *et al.*, 2008). Até o momento, não há na literatura informações sobre o efeito do diabetes na expressão de MATEs e OCTNs.

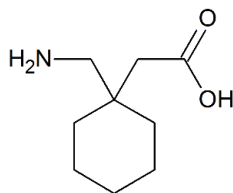
Além de situações patológicas, alterações genéticas podem regular a expressão e/ou função de transportadores. Foram identificados vários polimorfismos

de base única (SNPs), não sinônimos na região codificante do gene *SLC22A2*, responsável pela expressão de OCT2 (CIARIMBOLI, 2008; ZAIR *et al.*, 2008). A variante 808G>T (rs316019), localizada no éxon 4, é encontrada em europeus, americanos, africanos, leste e sul-asiáticos com frequência alélica de 11; 9,2, 18,5; 13,6 e 13,4%, respectivamente (*1000 Genomes*; CIARIMBOLI, 2008). No Brasil, a frequência alélica do alelo raro para essa variante é de 14,6% em pretos, 13,3% em pardos e 10,7% em brancos da região Sudeste do país (*REFARGEN*). Este SNP está associado à redução do transporte de metformina, o que sugere redução na atividade do transportador (CHOI; SONG, 2008; LEABMAN *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2008). Vários polimorfismos também foram encontrados em regiões codificantes do gene *SLC22A4*, responsável pela expressão de OCTN1 (URBAN *et al.*, 2007). A variante 1507C>T (rs1050152), localizada no éxon 9, é encontrada em europeus, americanos, africanos e sul-asiáticos com frequência alélica de 38,7; 24,4; 2,1 e 88%, respectivamente (*1000 Genomes*; TAHARA *et al.*, 2009). No Brasil, a frequência é de 21,4% em pretos, 27,2% em pardos e 38,2% em brancos, na região sudeste do país (*REFARGEN*). Estudos mostram que este SNP está associado à redução no transporte de carnitina e GBP (PELTEKOVA *et al.*, 2004).

1.2 Gabapentina (GBP)

A GBP é um anticonvulsivante com estrutura análoga ao neurotransmissor GABA (CLIVATTI; SAKATA; ISSY, 2009) (Figura 2) frequentemente indicado para tratamento de dor neuropática, sobretudo em casos de neuropatia diabética, e está dentre os fármacos de primeira linha para tratamento da dor neuropática, junto com antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (FINNERUP *et al.*, 2015; KAMERMAN *et al.*, 2016; MARCOLIN; TATSCH, 2000). A dor neuropática é definida como dor causada por uma lesão do sistema somatossensorial, devido à alteração da fisiologia do sistema nervoso (TREEDE *et al.*, 2008). Os sintomas são dor em agulhadas ou queimação e choque. Um dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da dor neuropática é a ativação das fibras de pequeno calibre do tipo C e A δ . Com a lesão das fibras, a atividade dos canais iônicos de sódio e cálcio é alterada, levando a um aumento na excitabilidade de fibras nociceptivas (BARON; BINDER; WASNER, 2010).

Figura 2. Fórmula estrutural da GBP



Fonte: próprio autor (ACD/ChemSketch, versão 14.01, Toronto, Ontário, Canadá)

Apesar de sua estrutura parecida com GABA, o fármaco não interage de modo significativo com esse neurotransmissor (CLIVATTI; SAKATA; ISSY, 2009). Sua ação anti-hiperálgica parece ocorrer por ligação na subunidade α -2-delta tipo 1 de canais de cálcio voltagem-dependentes nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, o que leva a diminuição de entrada de cálcio nas terminações nervosas, reduzindo assim a excitabilidade pós-sináptica e diminuindo a liberação de neurotransmissores (CLIVATTI; SAKATA; ISSY, 2009; MASON; QUELLO; SHADAN, 2018).

Estudos clínicos mostram que a administração de GBP, quando comparada com placebo, diminui significativamente a intensidade da dor neuropática. Backonja *et al.* (1998) trataram 70 pacientes com GBP de 900 a 3600 mg/dia e 65 pacientes com placebo. A média na pontuação de dor neuropática diabética foi significativamente menor ($p < 0,001$) ao final do estudo, com administração de GBP (basal: 6,4; final, 3,9; $n = 82$), em relação ao placebo (basal: 6,5; final, 5,1; $n = 80$). Serpell *et al.* (2002) avaliaram 122 pacientes com administração de até 2400 mg/dia de GBP e 112 pacientes com administração de placebo. Os autores observaram que a média na pontuação da dor diária diminuiu 21% nos pacientes tratados com GBP (7,1 para 5,6) e 14% nos pacientes tratados com placebo (7,3 para 6,3). Casos clínicos comprovam a eficácia da GBP na dor neuropática de pacientes com idade avançada que não conseguiram alívio da dor em tratamentos com antidepressivos ou opióides (SÁNCHEZ-VALIENTE, 1998).

A GBP apresenta biodisponibilidade variável em função de absorção saturável no trato gastrointestinal, de forma que quanto maior a dose, menor a biodisponibilidade, variando de uma biodisponibilidade absoluta de 60% a 27% com aumento da dose de 900 mg a 4800 mg por dia (BOCKBRADER *et al.*, 2010; CHEN; COWLES; SWEENEY, 2013; MAK *et al.*, 2016; STEWART *et al.*, 1993). Suas constantes de dissociação ácida e básica (pK_a e pK_b) são 3,7 e 10,7, respectivamente (BOCKBRADER *et al.*, 2010). Após dose única de 400 mg de GBP, a concentração

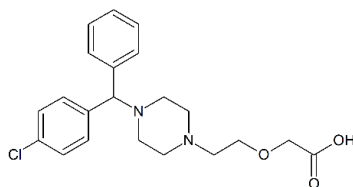
plasmática máxima de $3,7 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ é atingida após $3,6 \pm 1,1$ horas. Após dose única de 300 mg de GBP, o pico da concentração plasmática é de $2,7 \mu\text{g/mL}$, alcançado entre 2 e 3 horas (BOYD *et al.*, 1999; MARCOLIN; TATSCH, 2000; MCLEAN, 1994). Sua ligação às proteínas plasmáticas é mínima (aproximadamente 3%) e é amplamente distribuída a quase todos os órgãos. A GBP não é metabolizada em humanos; sua eliminação sob forma inalterada é predominantemente renal e a meia-vida é de aproximadamente 5 a 9 horas (BOYD *et al.*, 1999; CLIVATTI; SAKATA; ISSY, 2009).

O clearance renal da GBP é dependente da taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de creatinina (BOYD *et al.*, 1999). A diminuição da função renal resulta em redução do clearance total aparente e no clearance renal da GBP, sugerindo que não há reabsorção tubular da GBP (RAOUF *et al.*, 2017). Tais observações sugerem que o regime de dosagem em indivíduos com função renal reduzida deve ser ajustado de acordo com o clearance de creatinina (BLUM *et al.*, 1994). A excreção renal da GBP parece ser também dependente da secreção ativa via hOCT2 e hOCTN1, expressos nos rins. A cimetidina, substrato de OCT2, reduz o clearance renal da GBP sugerindo a participação do transportador OCT2 na excreção renal da GBP (LAL *et al.*, 2010). O transporte de GBP é facilitado pelo transportador OCTN1 e o polimorfismo 1507C>T reduz o transporte do fármaco em estudo *in vitro*, o que sugere a participação do transportador na eliminação renal do fármaco (URBAN *et al.*, 2008).

1.3 Cetirizina (CTZ)

A CTZ é um anti-histamínico de segunda geração, utilizada para tratar os sintomas de rinite alérgica, tanto sazonal quanto perene (Figura 3). Trata-se de um medicamento seguro, com poucos relatos de sinais clínicos graves após ingestão de altas doses. Os efeitos adversos da CTZ são raros, e estudos clínicos mostram que os mais frequentes são dor de cabeça leve (10,8% de 93 pacientes) e sonolência (12,9% de 93 pacientes) após o tratamento com 10 mg de CTZ (MELTZER; WEILER; WIDLITZ, 1996). De 146 pacientes com overdose de CTZ, 9 apresentaram sonolência, 7 apresentaram inquietude, houve 5 pacientes com taquicardia, 2 com pressão alta e apenas 1 paciente apresentou midríase. Cento e vinte e quatro (124) pacientes não relataram efeitos adversos, mesmo com overdose de CTZ (SPILLER *et al.*, 2001).

Figura 3. Fórmula estrutural da CTZ



Fonte: próprio autor (ACD/ChemSketch, versão 14.01, Toronto, Ontário, Canadá)

A concentração máxima no plasma ocorre em 1-2 horas, e aproximadamente 90% da CTZ no plasma encontra-se ligada às proteínas plasmáticas. Sua excreção ocorre pela urina, na maior parte, de forma inalterada (CURRAN; SCOTT; PERRY, 2004). Estudo feito em voluntários saudáveis, após administração de 5 mg de CTZ, mostrou concentração plasmática máxima média de $0,27 \mu\text{g/mL} \pm 0,04$, observada $0,75 \pm 0,50$ h após a administração, o que mostra a absorção rápida do fármaco. Esse mesmo estudo também mostrou que a CTZ se encontra altamente ligada às proteínas plasmáticas, com média de 96,1% de ligação após uma hora da administração de CTZ, 91,9% após 6 horas e 87,3% após 24 horas (BENEDETTI *et al.*, 2001).

A CTZ é eliminada, principalmente inalterada, na urina através de filtração glomerular e secreção tubular, sendo que a secreção tubular do enantiômero dextrocetirizina (44,5 mL/min) é 2 vezes maior que a da levocetirizina (23,1 mL/min) (STROLIN BENEDETTI *et al.*, 2008). Em um estudo *in vitro*, com oócitos de *Xenopus laevis* transfectados com hOCT2, a adição de 100 ng/mL de CTZ reduziu a captação do substrato de OCT2 ^{14}C -TEA de $3,1 \pm 0,1$ pmol/h/mg proteína para $2,3 \pm 0,1$ pmol/h/oócito, o que sugere a ação da CTZ como inibidor de OCT2 (TSURUOKA *et al.*, 2006). Em um estudo *in vitro* com células embrionárias de rim humano (HEK), transfectados com hMATE1 e hMATE2-K, a concentração de CTZ necessária para inibir em 50% a captação de ^{14}C -TEA (IC_{50}) foi de 317 e 817 μM , respectivamente, o que sugere interação de CTZ com ambos transportadores (TSUDA *et al.*, 2009). Em um estudo clínico com 6 voluntários saudáveis homens, houve diminuição no clearance renal de pilsicainida (50 mg) após a coadministração de CTZ (20 mg) (475 ± 101 mL/min para 270 ± 117 mL/min) (TSURUOKA *et al.*, 2006). Até o momento, não há dados na literatura relacionando o efeito da CTZ na atividade de OCTN1.

Além disso, a CTZ é um dos fármacos de primeira escolha (anti-histamínicos em geral) para o tratamento de alergia à insulina em pacientes diabéticos (AIRAGHI;

LORINI; TEDESCHI, 2001; GHAZAVI; JOHNSTON, 2011; HEINZERLING *et al.*, 2008; SOLA-GAZAGNES *et al.*, 2003).

1.4 Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma síndrome heterogênea, resultado de deficiência na secreção ou ação da insulina (CHAVES; ROMALDINI, 2002). A hiperglicemia resultante da deficiência de secreção ou ação de insulina é a principal característica dessa doença metabólica (*American Diabetes Association*, 2019a). O diabetes tipo 2 é a forma mais comum de diabetes (90-95% de pacientes com *diabetes* possuem DM2) e apesar de haver várias causas para o surgimento da doença, sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida (ALBERTI; ZIMMET, 1998; *American Diabetes Association*, 2019a). Alguns pacientes são hiperglicêmicos, mesmo com aumento na concentração plasmática de insulina, o que evidencia a resistência à ação da insulina (DEFRONZO, 1999). Outros pacientes têm ação normal de insulina, mas sua secreção é prejudicada (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

Estudos epidemiológicos mostram incidência de 9,4% nos Estados Unidos (30,3 milhões de pessoas) de diabetes diagnosticada em 2015, sendo que 23,8% (7,2 milhões de pessoas) não eram cientes ou não havia sido relatado que tinham a doença (CDC, 2017). A Organização Mundial da Saúde (WHO) reuniu alguns estudos que mostram a prevalência de DM2 diagnosticada e não diagnosticada, e a relação geralmente é grande, o que mostra a importância do diagnóstico e a severidade da doença (WHO, 2016). Além disso, de 1980 a 2014 houve um aumento de 4,7% a 8,5% na prevalência de diabetes. Em uma estimativa global, 108 milhões de pessoas tinham a doença em 1980, e 422 milhões de adultos conviviam com a doença em 2014 (WHO, 2016). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), no ano 2013 o Brasil possuía 6,2% de brasileiros (9,1 milhões de pessoas) com diabetes (PNS, 2014). A estimativa de brasileiros com diabetes em 2017 era de aproximadamente 13 milhões, com uma estimativa de 20,3 milhões de brasileiros com a doença em 2045 (IDF, 2017). Estudo realizado em 2018 pelo Conselho Federal de Farmácia (CFF) em parceria com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) relata uma prevalência de glicemia elevada em 18,4% da população brasileira, sendo o centro-oeste a região com maior prevalência e a região sudeste com a menor prevalência, 24,6% e 15,6%, respectivamente (CFF, 2018).

Um dos efeitos em longo prazo do diabetes é a neuropatia diabética, causada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (COLLOCA *et al.*, 2017). Vários mecanismos relacionados a patogênese da neuropatia diabética foram propostos. A hiperglicemia ativa várias vias bioquímicas bem caracterizadas, como a via do poliol, aumento dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), ativação de proteína quinase C, entre outras (SINGH; KISHORE; KAUR, 2014). As principais fibras periféricas afetadas são as fibras de fino calibre A δ e C, e as fibras de grosso calibre A α e A β (VINIK *et al.*, 2013), responsáveis pelos sintomas da neuropatia diabética, que são entorpecimento, formigamento, dor em queimação ou agulhadas e fraqueza. Os sintomas começam nas extremidades inferiores e se espalham em direção aos membros superiores, movimento conhecido como botas e luvas (CALLAGHAN *et al.*, 2012).

Estudo realizado em 118 hospitais do Reino Unido, com um total de 6487 pacientes diabéticos, mostrou prevalência de 32,1% de neuropatia diabética no diabetes tipo 2. A incidência de neuropatia diabética tende a aumentar com a idade, haja vista que a prevalência foi de 5% no grupo até 29 e aumentou para 44,2% no grupo até 79 anos. A duração do diabetes também influenciou a incidência da dor neuropática, que estava presente em 20,8% nos pacientes com a doença há menos de 5 anos e 36,8% em pacientes com a doença há mais de 10 anos (YOUNG, 1993).

Atualmente, os casos de alergia à insulina são raros, atingindo aproximadamente 1% dos pacientes diabéticos (DURAND-GONZALEZ *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; NÄF *et al.*, 2002; RADERMECKER; SCHEEN, 2007). A primeira linha de tratamento, quando esses casos ocorrem, são os anti-histamínicos para alívio sintomático (entre eles a CTZ) e a mudança da insulina do paciente para uma insulina que não contenha o agente específico que causou a reação alérgica (HEINZERLING *et al.*, 2008). Geralmente, as insulinas humanas recombinantes são as que apresentam menos risco de alergia e são as mais utilizadas na mudança de tratamento com insulina (AIRAGHI; LORINI; TEDESCHI, 2001; GHAZAVI; JOHNSTON, 2011; HEINZERLING *et al.*, 2008; JIXIONG *et al.*, 2004; NÄF *et al.*, 2002; RADERMECKER; SCHEEN, 2007).

O DM2 pode alterar absorção gastrointestinal, a distribuição, o metabolismo e a excreção renal dos fármacos em uso na clínica dependendo do tempo de diagnóstico da doença, da presença de complicações do diabetes e do substrato investigado (DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVVA, 2012). O tempo de trânsito intestinal pode

estar diminuído e retardado em 20-30% dos pacientes diabéticos (IIDA *et al.*, 2000). Tal efeito é resultante da hiperglicemia crônica que causa um prejuízo simpático e parassimpático dos nervos responsáveis pela motilidade intestinal. O diabetes também pode alterar a ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas alterando as fases de distribuição e eliminação, em função das altas concentrações de ácidos graxos livres e elevados níveis glicêmicos (LIPP *et al.*, 1997; PRESTON *et al.*, 2001). Um aumento na expressão de Mrp2 na barreira hematoencefálica é observado no diabetes experimental induzido por estreptozotocina, e a distribuição de fármacos substratos desse transportador no sistema nervoso central pode ser alterada em pacientes diabéticos (HAWKINS *et al.*, 2007). Dependendo da duração do DM2 ou do estágio da nefropatia diabética, a velocidade de filtração glomerular pode estar aumentada, normal ou diminuída. Além disso, anormalidades na secreção tubular renal em pacientes com DM2, podem influenciar o *clearance* renal de uma variedade de fármacos (DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVOVA, 2012).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o diabetes pode alterar o metabolismo de fármacos através de alterações em diversas enzimas, dentre as quais do sistema citocromo P450 (CYP) provocando modificações individualizadas na atividade de suas isoformas (CHENG; MORGAN, 2001; PRESTON; EPSTEIN, 1999; PRESTON *et al.*, 2001). O diabetes experimental induzido em ratos tende a suprimir a expressão do CYP1A2, CYP2C11, CYP2C13 e CYP3A2 e a induzir a expressão do CYP2A1, CYP2B1, CYP2C12, CYP4A1 e CYP2E1 (IBER *et al.*, 2001; SCHENKMAN, 1991). O tratamento com insulina mostrou ser efetivo na normalização das alterações do CYP tanto em relação ao conteúdo proteico quanto ao RNAm (DONG *et al.*, 1988; YAMAZOE *et al.*, 1989). Utilizando ratos espontaneamente diabéticos, Favreau e Schenkman (1988) observaram que o metabolismo da anilina, que se encontrava aumentado, foi normalizado nos animais que receberam insulina.

De acordo com as recomendações do *International Transporter Consortium* (GIACOMINI *et al.*, 2010), os dados da literatura referentes à disposição cinética da GBP justificam a necessidade de investigação da captação *in vitro* da GBP em células que expressam transportadores renais. Dessa forma, a interação e o transporte de GBP e CTZ foram avaliados em células que expressam transportadores renais. Foi realizado um estudo clínico cruzado e aleatório em pacientes com dor neuropática para avaliação de interação CTZ x GBP. A CTZ é considerada inibidor da atividade de OCT2, e possivelmente de MATE1 e MATE2-K (GIACOMINI *et al.*, 2010; TSUDA

et al., 2009; TSURUOKA *et al.*, 2006). A partir dos parâmetros farmacocinéticos, buscamos caracterizar a relevância da atividade dos transportadores renais na eliminação da GBP. Considerando que modelos experimentais sugerem que o diabetes reduz a atividade do OCT2 em aproximadamente 50%, foi realizado estudo clínico para investigação da influência do controle glicêmico do diabetes tipo 2 na farmacocinética e na farmacodinâmica da GBP em pacientes com dor neuropática. Buscamos dessa forma, caracterizar o papel dos transportadores renais na farmacocinética e farmacodinâmica da GBP e avaliar a regulação da atividade desses transportadores por interações fármaco-fármaco e pelo controle glicêmico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo visou investigar o papel dos transportadores de cátions orgânicos na disposição cinética e na farmacodinâmica da GBP, e a regulação da atividade desses transportadores pelo controle glicêmico.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a interação e o transporte in vitro da GBP e da CTZ, em células que expressam transportadores renais;
- Realizar estudo clínico cruzado para avaliar a influência da CTZ na farmacocinética e na farmacodinâmica da GBP em pacientes com dor neuropática;
- Avaliar a influência do diabetes tipo 2 e do controle glicêmico na farmacocinética e na farmacodinâmica da GBP em pacientes com dor neuropática;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudo de interação GBP x CTZ e mecanismos de captação em transportadores para cátions orgânicos

O estudo do transporte e da interação entre GBP e CTZ a nível dos transportadores renais para cátions orgânicos foi realizado em colaboração com o Prof. Giuliano Ciarimboli da *Westfälische Wilhelms-Universität Münster*, na Alemanha. O estágio de doutorado foi realizado no período de março de 2018 a fevereiro de 2019, com apoio do Programa Conjunto de Bolsas CAPES/CNPq/DAAD (Chamada CNPq nº 04/2017, Edital CAPES nº 15/2017) (ANEXO A).

3.1.1 Linhagens celulares

Células embrionárias de rim humano (HEK) foram mantidas com meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), contendo 3,7 g/L de NaHCO₃, 1,0 g/L de D-glicose e 2 mM de L-glutamina, adicionado de soro bovino fetal 10% e dos antibióticos penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 mg/L) (Biochrom, Alemanha). As células HEK transfectadas com hOCT1, hOCT2 ou hOCT3 foram mantidas em meio enriquecido com antibiótico de seleção geneticina (0,8 mg/mL, G418; Biochrom, Alemanha) (LEE *et al.*, 2009). As linhagens transfectadas com hMATE1 e hMATE2-K foram mantidas em meio enriquecido com higromicina B (0,4 – 0,5 mg/mL, Roth, Karlsruhe, Alemanha) como antibiótico de seleção (HUCKE *et al.*, 2018). A linhagem transfectada com hOCTN1 foi mantida em meio enriquecido com puromicina (3 mg/L, Invivogen, Toulouse, França), e a expressão do transportador foi induzida por doxaciolina (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) 24 horas antes dos experimentos (BACH *et al.*, 2007; GRIGAT *et al.*, 2009). As células cresceram em garrafas de 25 mL (Cellstar® Greiner Bio-one, Alemanha), e foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

Os experimentos foram realizados em células confluentes, crescidas de 2 a 5 dias, com passagem de 6-69, dependendo do tipo celular utilizado. A cultura e análise funcional dessas células foi aprovada pelo escritório ambiental do governo do estado da Renânia do Norte-Vestefália, Essen, Alemanha (nº: 521.-M-1.14/00).

3.1.2. Inibição da captação do substrato ASP⁺ por GBP e CTZ mediada por transportadores para cátions orgânicos

A interação da GBP e da CTZ com transportadores para cátions orgânicos foi investigada usando o cátion orgânico fluorescente 4-(4(dimetilamino)esteril)-N-metilpiridínio (ASP⁺, Molecular Probes®, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Bleiswijk, Holanda) como substrato dos transportadores (WILDE *et al.*, 2009). Resumidamente, células confluentes em microplacas de 96 poços (Nunclon 96 Flat bottom, Nunc, Wiesbaden, Alemanha) foram excitadas como luz monocromática de 465 nm e emissão de fluorescência, filtrada por um segundo monocromador a 590 nm e medidas pelo detector de fluorescência monocromador-baseado Tecan infinity F200 (Tecan Trading AG, Suíça), controlado pelo programa Tecan i-control (versão 2.0.10.0, Tecan Trading AG, Suíça). Essa técnica permite realizar medidas de captação em tempo real com resolução de tempo < 5 segundos e obter representação

dinâmica do processo de captação (CIARIMBOLI; SCHLATTER, 2016). A fluorescência foi medida em cada poço antes e depois da injeção de uma solução de ASP⁺ contendo ou não diferentes concentrações de GBP ou CTZ. Foram determinados os valores de concentração inibitória 50% (IC₅₀) para a inibição da captação de ASP⁺ pela GBP e CTZ. Com base nos valores de IC₅₀ foi possível inferir a afinidade aparente dos fármacos pelos transportadores. Todos os experimentos foram realizados a 37 °C.

Soluções de ASP⁺ foram preparadas por diluição do padrão analítico em solução tipo Ringer para uma concentração final de 1 µM para experimentos com OCTs e de 5 µM para experimentos com MATEs e OCTN1. Soluções de trabalho de GBP e CTZ foram preparadas por diluição dos padrões analíticos (ambos da Tokyo Chemical Industry, Zwijndrecht, Bélgica) em solução tipo Ringer, para concentrações finais de 10⁻² M a 10⁻¹¹ M. A solução tipo Ringer contém (em mM): NaCl (145), K₂HPO₄ (1,6), KH₂PO₄ (0,4), D-glicose (5), MgCl₂ (1), gluconato de cálcio (1,3), e pH ajustado para 7,4.

3.1.3. GBP e CTZ como substratos de transportadores para cátions orgânicos

Como a determinação de afinidades aparentes aos transportadores para GBP e CTZ não predizem se essas substâncias são substratos reais dos transportadores, a capacidade de células HEK transfectadas com transportadores para cátions orgânicos em transportar GBP e CTZ foram avaliadas.

Para os experimentos de transporte, uma solução tipo Ringer (pH 7,4, 37 °C) contendo GBP ou CTZ (ambos da Tokyo Chemical Industry, Zwijndrecht, Bélgica) em concentração pré-estabelecida de 0,1 µM foi adicionada à células HEK não transfectadas (selvagens – WT) ou transfectadas com um único transportador crescidas até atingirem confluência em placas de 24 poços (Nunclon 24 Flat bottom, Nunc, Wiesbaden, Alemanha). O tempo de incubação variou de 15 seg. a 10 min., e após esse processo, os experimentos terminaram com a adição de solução tipo Ringer gelada para interromper qualquer processo de transporte depois da remoção do tampão de incubação. Após lavagem com a solução tipo Ringer gelada, as células foram adicionadas de 150 µL de ácido fórmico (AF) 0,1%. A lise das células continuou com a sonicação das mesmas por 15 minutos. Uma alíquota de 40 µL do lisado foi separada para estimar as proteínas, usando o kit de ensaio para determinação de proteínas pelo método de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Thermo

Scientific, Rockford, IL, EUA; Protein Standard BSA 2 mg/vial, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

3.1.3.1 Método de análise de GBP e CTZ em lisado celular

As concentrações celulares de GBP e CTZ foram medidas pelo sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS), desenvolvido e validado em cooperação com o grupo de Química Analítica da Faculdade de Química da Universidade de Münster.

3.1.3.1.1 Reagentes e soluções

Soluções estoque de GBP a 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e CTZ a 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram preparadas em água destilada a partir dos padrões analíticos certificados. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque, nas concentrações de 0,2, 0,4, 1, 2, 5, 10, 20, 200, 400, 1000 e 2000 ng/mL, tanto para GBP quanto para CTZ. As soluções estoque foram armazenadas em freezer a -20 °C e as soluções de trabalho foram armazenadas em freezer a -4 °C. As soluções estoque dos padrões internos gabapentina deuterada (GBP-d4) e cetirizina deuterada (CTZ-d4) (ambos da Toronto Research Chemicals Inc, Toronto, Canadá) foram preparadas em água destilada na concentração de 1 mg/mL, e as soluções de trabalho foram preparadas por diluição nas concentrações de 20 ng/mL a 2 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas em freezer a -20 °C.

No preparo da amostra, a água destilada utilizada para dissoluções e diluições nas soluções de trabalho foi obtida da Farmácia da Clínica Universitária de Münster, e o solvente acetonitrila (Fisher Scientific, Geel, Bélgica) e o reagente AF (99,5%, Optima™, Fisher Scientific, Geel, Bélgica) eram ambos de grau cromatográfico. Para a análise das amostras, foram utilizados o solvente acetonitrila (VWR International GmbH, Darmstadt, Alemanha) e o reagente AF (99%, ChemSolute Th.Geyer, Renningen, Alemanha), assim como a água destilada obtida do sistema de purificação Aquatron A4000D (Bibby Scientific, Stone, Reino Unido).

3.1.3.1.2 Condições cromatográficas e instrumentação

Foi utilizado o sistema LC-MS/MS com cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC) Advance™ UHPLC e espectrômetro de massas EVOQ® Elite (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), com fonte de ionização por eletronebulização (ESI). A infusão direta das soluções contendo os padrões certificados foi realizada com bomba de infusão utilizando seringa KDS 100 CE (kdScientific, Holliston, EUA). Para injeção das amostras no sistema LC-MS/MS foi utilizado o injetor automático PAL HTC-xt (CTC Analytics AG, Zwingen, Suíça).

A separação da GBP e CTZ foi realizada usando a coluna Accucore™ C18 RP (50 x 3,0 mm, 2,6 µM, Thermo Scientific, Alemanha), com fase móvel A constituída de AF 0,1% (em água) e ACN como fase móvel B. Foi utilizado o modo gradiente (Tabela 1), e vazão de 1 mL/min. A aquisição e análise dos dados foram realizadas com auxílio dos programas MS Workstation, versão 8.2 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), OriginPro 2018 (versão 95E b9.5.1.195, OriginLab Corporation, EUA) e Excel 2016 (Microsoft Office).

Tabela 1 – Modo gradiente da fase móvel

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase Móvel B (%)
0,00	1	2
0,25	1	2
1,25	1	90
1,75	1	90
2,00	1	2
2,50	1	2

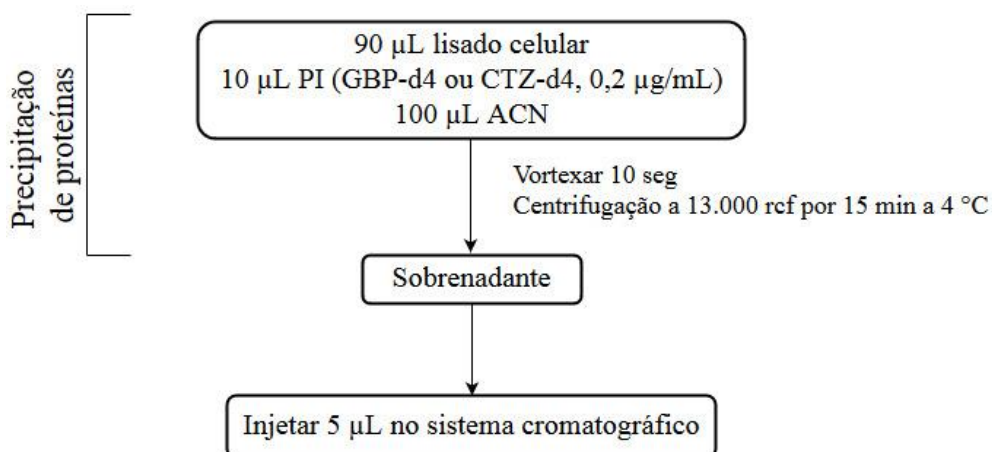
Fonte: próprio autor

A análise por espectrometria de massas foi realizada no modo positivo com voltagem de *spray* de 3500 V. As temperaturas das *probes* e do cone foram ajustadas a 350 °C e o fluxo dos gases do cone, *probe* e nebulizador foram ajustados a 20, 50 e 60 unidades, respectivamente. O sistema foi colocado em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), ou seja, foram monitorados íons fragmentados a partir dos íons precursores dos analitos. As transições MRM dos analitos foram obtidas pela infusão direta de soluções de GBP e CTZ, em um fluxo de 10 µL/min. As seguintes transições (razão m/z) foram monitoradas: 172,1 → 154,1/137,1/119,1 para GBP; 176,1 → 158,1/139,1/122,2 para GBP-d4; 389,0 → 200,9/165,0 para CTZ e 393,0 → 200,9/166,2 para CTZ-d4.

3.1.3.1.3 Procedimento de preparo da amostra

As amostras de 90 μL de lisado celular foram adicionadas de 10 μL da solução do padrão interno GBP-d4 ou CTZ-d4 e de 100 μL de ACN. Os tubos foram agitados em vórtex por 10 seg. e centrifugados por 15 min. a 13.000 $\times g$ a 4 $^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante (100 μL) foi separado e uma alíquota de 5 μL foi injetada no sistema (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma do preparo de amostra em lisado celular



Fonte: próprio autor (<https://www.draw.io>)

3.1.3.1.4 Preparo da curva analítica

A curva analítica foi preparada seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.1.3.1.3, pela adição de 10 μL de cada solução de trabalho de GBP, CTZ e dos PIs GBP-d4 e CTZ-d4 em 60 μL de lisado celular branco, de forma a obter concentrações finais de 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 20, 40, 100 e 200 ng/mL para GBP e CTZ, e 10 ng/mL para os PIs.

3.1.3.1.5 Validação dos métodos analíticos

O método de análise de GBP e CTZ em lisado celular foram validados considerando os parâmetros limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LIQ), linearidade, efeito residual, precisão e exatidão, seletividade e estabilidade. Para avaliar precisão e exatidão, foram utilizados os controles de qualidade de baixa concentração (CQB: 2 ng/mL para GBP e 1 ng/mL para CTZ), de média concentração (CQM: 20 ng/mL para ambos GBP e CTZ) e de alta concentração (CQA: 100 ng/mL para ambos GBP e CTZ). A estabilidade foi avaliada usando CQB e CQA. O método foi considerado linear quando os desvios dos padrões de calibração em relação aos valores nominais foram inferiores a 15%, exceto para o LIQ, o qual se aceita um desvio

de até 20%. O método foi considerado preciso, exato e estável quando o coeficiente de variação (CV) e o erro padrão relativo (EPR) dos controles de qualidade em relação aos valores nominais foram inferiores a 15%.

3.2 Casuística e Protocolo Clínico

3.2.1 Casuística

Este estudo descreve a influência do diabetes mellitus tipo 2 e do inibidor de transportadores renais CTZ (GIACOMINI *et al.*, 2010; TSUDA *et al.*, 2009; TSURUOKA *et al.*, 2006) na farmacocinética-farmacodinâmica da GBP em pacientes com dor neuropática. A etapa clínica do projeto foi realizada na Unidade de Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) em colaboração com os Profs. Drs. Gabriela Rocha Lauretti, Maria Cristina Foss de Freitas e Francisco José Albuquerque de Paula. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP (Processo nº. 352, ANEXO B) e teve anuência do CEP do HC-FMRP-USP e do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (ANEXOS C e D).

Foram investigados pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), todos com dor neuropática, adultos (18 a 59 anos), de ambos os sexos. Para a realização do protocolo de pesquisa, os participantes selecionados foram internados na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC-HC-FMRP-USP). Os participantes foram divididos nos seguintes grupos: (a) pacientes não diabéticos com dor neuropática (grupo Controle); (b) pacientes com diabetes tipo 2 controlado e neuropatia diabética [grupo Diabetes Controlado (DC)]; e (c) pacientes com diabetes tipo 2 não controlado e neuropatia diabética [grupo Diabetes não Controlado (DNC)].

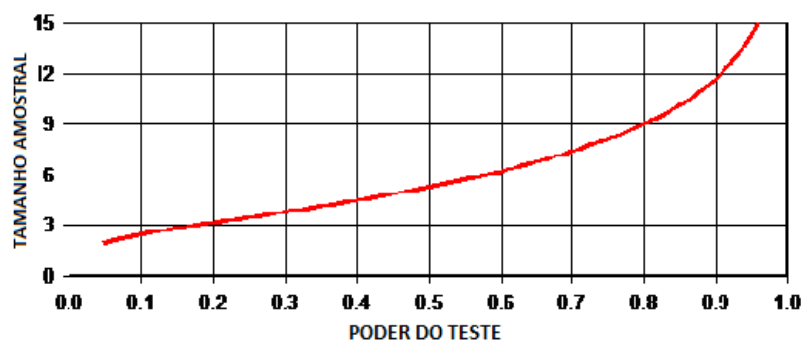
No grupo Controle foram incluídos participantes com dor neuropática devido a outras causas que não o diabetes, como por exemplo: síndrome do túnel do carpo, hérnia de disco lombar ou cervical, entre outras. O diagnóstico de dor neuropática foi realizado com base na presença dos seguintes sinais: a) dor crônica moderada a grave diária nas extremidades inferiores por período superior a 90 dias; b) escore de 4 cm (ou superior a 4 cm) em uma escala visual analógica de dor de 10 cm (sendo 0=ausência de dor; 10=pior dor possível) (GEBER *et al.*, 2009; TREEDE *et al.*, 2008).

O diagnóstico de diabetes foi realizado de acordo com os critérios da *American Diabetes Association* (2019a). Foram incluídos apenas participantes com diagnóstico

de DM2 por pelo menos seis meses. Os participantes diabéticos incluídos no projeto foram estratificados entre os grupos DC e DNC de acordo com o controle do nível glicêmico, apesar do uso regular de insulina, hipoglicemiantes orais e recomendações nutricionais. Os participantes que apresentaram hemoglobina glicada (HbA1c) menor que 8,0% foram considerados com diabetes controlado e incluídos no grupo DC, enquanto os participantes que apresentaram HbA1c maior ou igual a 8,0% foram incluídos no grupo DNC (*American Diabetes Association, 2019b*).

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation* versão 2.1.30 (DUPONT; PLUMMER, 1997) com base na variabilidade da farmacocinética da GBP previamente estudada em voluntários sadios (YAGI *et al.*, 2012) (Figura 5). Neste estudo a média \pm desvio padrão da área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) foi $20,5 \pm 7,3 \mu\text{g.h.mL}^{-1}$ após a administração de GBP na dose de 200 mg. Nossa hipótese de trabalho foi a de que o diabetes iria elevar em pelo menos 50% a AUC da GBP quando comparada com o grupo Controle. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em 5%, poder de 0,80, diferença entre as médias de AUC da GBP em 50%. A Figura 4 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral. Como pode ser observada, a inclusão de 10 pacientes em cada grupo acarreta poder do teste acima de 80%.

Figura 5. Estudo do tamanho amostral em relação ao poder de teste



Fonte: Próprio autor

Foram excluídos do protocolo de estudo os participantes com insuficiência renal aguda ou crônica grave (clearance de creatinina ≤ 30 mL/min), doenças gastrointestinais, histórico de abuso de álcool ou drogas, insuficiência aguda do miocárdio, indivíduos em uso crônico de analgésicos, indivíduos com outro tipo de dor crônica tão severa quanto a dor neuropática, e em uso crônico de medicamentos que

interagem com GBP (antiácidos e cimetidina) (LAL *et al.*, 2010; YAGI *et al.*, 2012). Quando havia necessidade do uso crônico de analgésicos para o tratamento da dor neuropática, os participantes tiveram o medicamento suspenso por período de aproximadamente 10 meias-vidas antes de participarem do protocolo de pesquisa com acompanhamento do médico responsável (Dra. Gabriela Rocha Lauretti ou Dra. Maria Cristina Foss de Freitas).

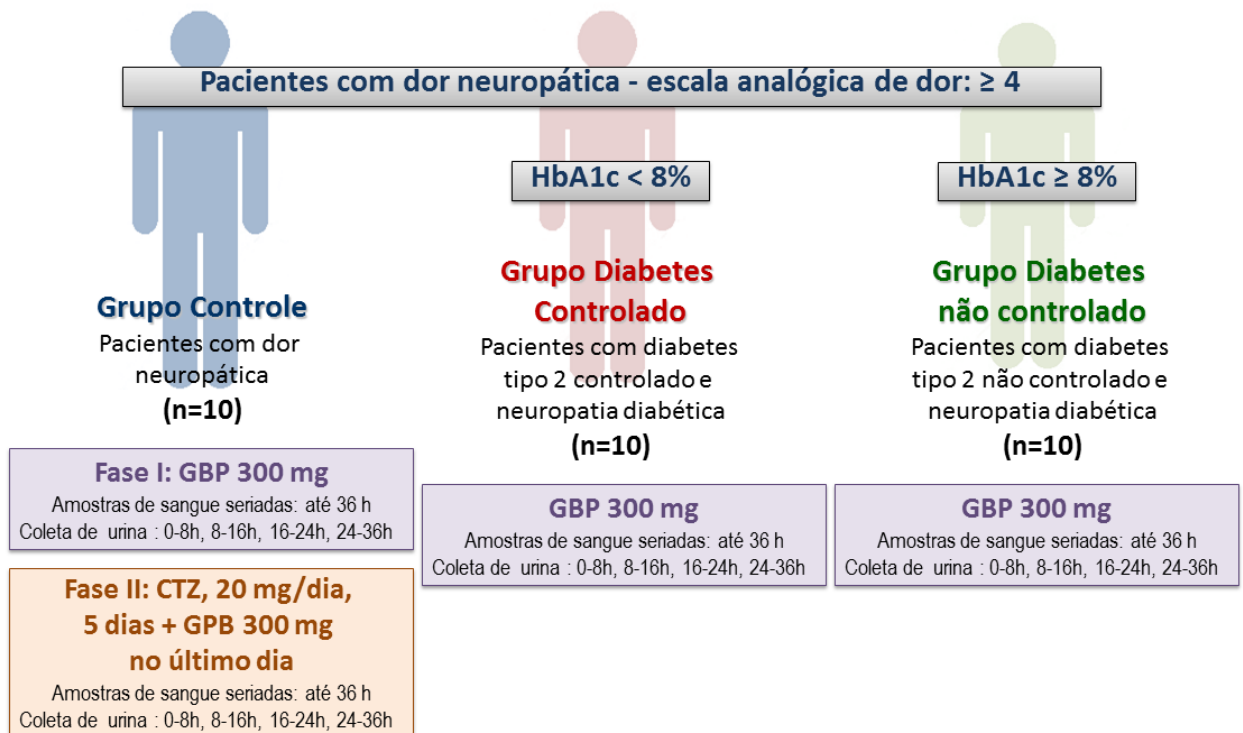
No momento do recrutamento, os participantes da pesquisa foram submetidos à consulta médica (história clínica e exame físico) pelos médicos residentes e professores do HC-FMRP-USP. Os participantes elegíveis foram incluídos no estudo após receber informações sobre o protocolo clínico, assim como possíveis riscos, concordar em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICES A e B). Foi garantida a liberdade do participante da pesquisa se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer período, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado e/ou tratamento. No caso de intercorrências, como aparecimento de reações adversas ou outros eventos adversos, foi garantido o afastamento do participante do protocolo de pesquisa e o tratamento apropriado no HC-FMRP-USP. O estudo foi registrado no clinicaltrials.gov (NTC03047278).

3.2.2. Protocolo clínico

O protocolo clínico foi realizado na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP. No dia da investigação, os participantes foram tratados com dose única oral de GBP 300 mg (Gabapentina, EMS, Hortolândia/SP) em cápsulas após jejum de 12 horas (Fase 1). Para a investigação da farmacocinética da GBP, amostras de 10 mL de sangue foram coletadas em tubos heparinizados nos tempos 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, e 36 horas após a administração de GBP. As coletas de sangue foram realizadas por punção com cateter venoso, o qual foi mantido preferencialmente no membro superior não dominante do participante para a realização de todas as coletas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $1400 \times g$ por 10 minutos a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras de plasma foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise (PARK *et al.*, 2007). A urina dos participantes da pesquisa foi coletada nos intervalos de 0-8h, 8-16h, 16-24h, 24-36h após administração de GBP. O volume total de urina foi registrado e uma alíquota de 10 mL foi armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Apenas os indivíduos incluídos no grupo Controle participaram da Fase 2 do estudo. Nessa fase, os participantes foram tratados com 20 mg de CTZ (Cloridrato de Cetirizina, Medley, Campinas/SP) em comprimidos foram administrados v.o. por cinco dias. No último dia de tratamento com CTZ, os participantes compareceram a Unidade de Pesquisa Clínica do HC-FMRP-USP para receber uma dose única oral de GBP 300 mg. Amostras seriadas de sangue e a urina dos participantes foram coletadas até 36 horas após a administração da GBP, de maneira similar ao realizar na Fase 1. O período de *wash-out* entre as duas fases foi de pelo menos 15 dias (figura 6).

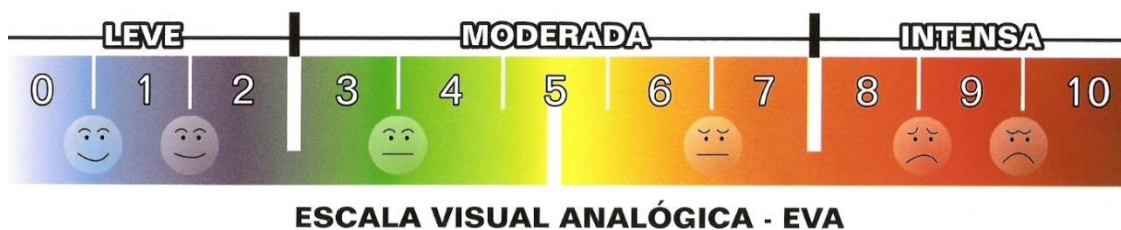
Figura 6. Desenho experimental para avaliação da influência do controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2 e da CTZ na disposição cinética da GBP em pacientes com dor neuropática.



Fonte: próprio autor

A intensidade da dor foi avaliada em cada tempo de coleta de sangue através da Escala Visual Analógica (figura 7). Para esta avaliação, foram realizadas as seguintes perguntas aos participantes da pesquisa: a) Você tem dor? b) Como você classifica sua dor? Após a observação da EVA, o paciente classifica sua dor de acordo com a escala. A classificação varia de zero (sem dor) a dez (dor intensa).

Figura 7. Escala Visual Analógica utilizada para classificar a intensidade de dor



Fonte: <https://www.joinville.sc.gov.br/wp-content/uploads/2017/05/Exame-Escala-Visual-Anal%C3%B3gica-EVA.pdf>. A cada tempo de coleta, os participantes observam a EVA e classificam a intensidade de dor, que varia de zero (sem dor) a dez (dor intensa).

Foram coletadas amostras de sangue em 2 tubos contendo EDTA para a genotipagem. Também foram coletadas amostras de sangue de todos os pacientes incluídos na presente investigação para a avaliação de marcadores bioquímicos (glicemia, AST, ALT, GGT, bilirrubinas (total, direto e indireto), creatinina sérica, ureia e hemoglobina glicada). A partir da creatinina sérica calculou-se a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe), com base na equação CKD-EPI 2009, conforme recomendado pelo National Kidney Foundation (LEVEY *et al.*, 2009):

$$TFG = 141 \times \min(SCr/k, 1)^\alpha \times \max(SCr/k, 1)^{-1,209} \times 0,993^{Idade} \times 1,018 [se\ mulher] \\ \times 1,159 [se\ preto]$$

onde, k = 0,7 se mulher; k = 0,9 se homem; α = -0,329 se mulher; α = -0,411 se homem; min = o mínimo de SCr/k ou 1; max = o máximo de SCr/k ou 1.

3.3 Análise da GBP em plasma e urina por CLAE-UV

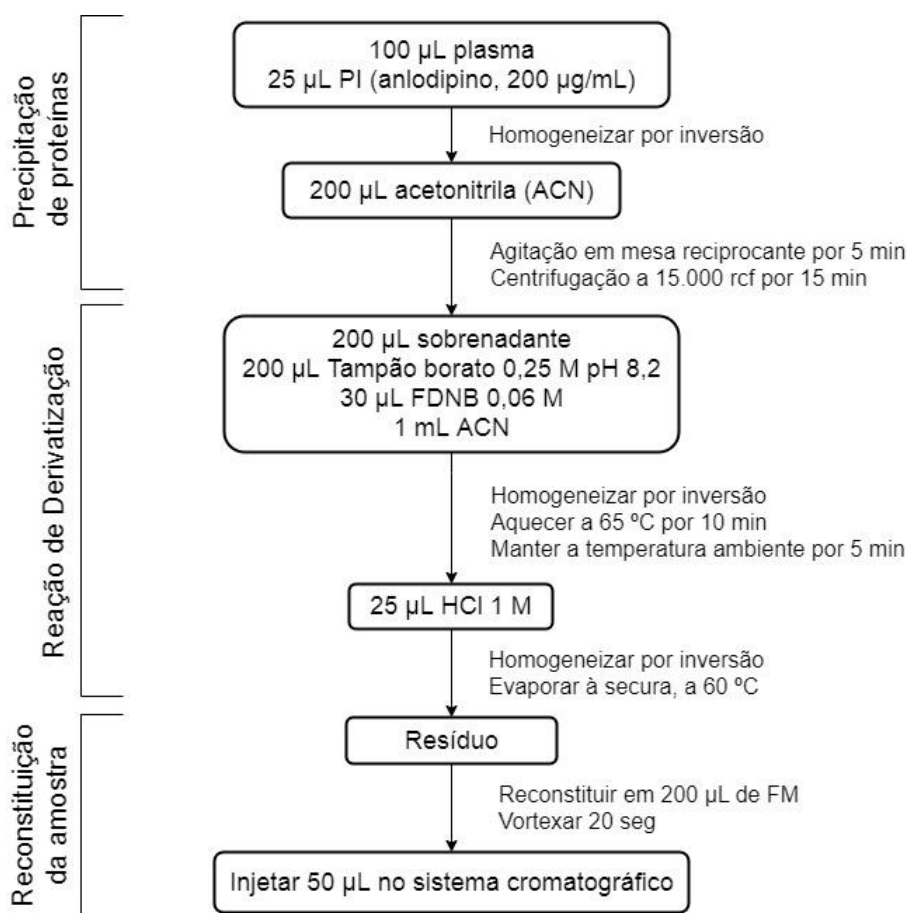
A análise da GBP em plasma e urina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) da Shimadzu (Shimadzu Inc., Kioto, Japão), composto por sistema quaternário de bombas LC-20AT, detector UV-VIS SDP-20AT e desgaseificador DGV-20A_{5R}, no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara – UNESP. O método foi desenvolvido e validado pelo grupo de pesquisa (YAMAMOTO, 2018).

Por ser um produto controlado pela portaria SVS/MS nº 344/1998, foi necessário autorização especial concedida pela ANVISA a FCF-UNESP para a compra do padrão analítico certificado (ANEXO E, Brasil 2014). O padrão analítico certificado de GBP (99,2%, Cerilliant, Texas, EUA) foi utilizado para preparar as soluções de trabalho para análise em plasma e urina nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 20, 30 e 70 µg/mL e 5, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200 e 300 µg/mL,

respectivamente. A solução de besilato de anlodipino (99,7%, EDQM, Estrasburgo, França) na concentração de 200 µg/mL em água foi utilizada como padrão interno (PI). O 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB, 98%, Sigma) na concentração de 0,06 M em ACN foi utilizado como agente derivatizante.

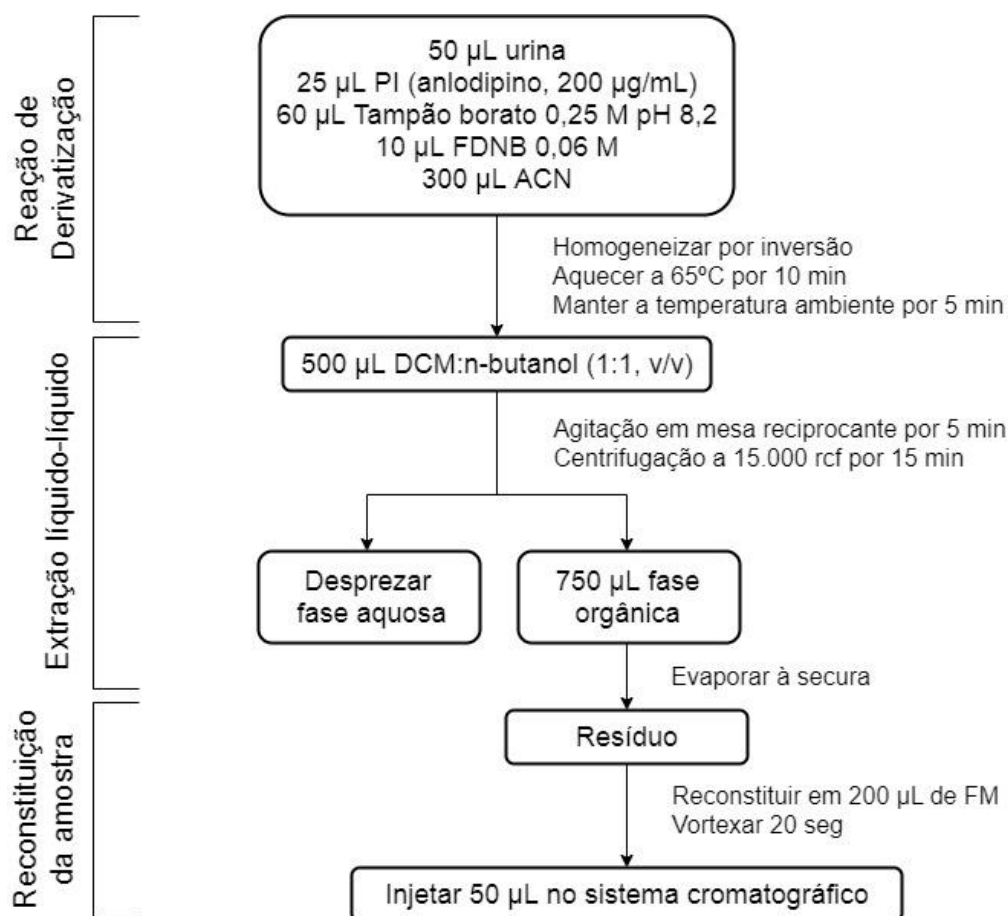
Em resumo, após o preparo das amostras de plasma (figura 8) ou das amostras de urina (figura 9), alíquotas foram injetadas no sistema cromatográfico. A GBP e o PI foram resolvidos em uma coluna LiChrospher® C18 RP (125 × 4,0 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha), com pré-coluna LiChroCART® 4-4 Purospher® RP-18 capeada (5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída de tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M (pH 3,9):metanol (MeOH), na proporção 27:73 (v/v), em fluxo de 1,2 mL em modo isocrático. A leitura foi realizada pelo detector no ultravioleta a 360 nm, e a corrida teve duração de 10 minutos. A aquisição de dados e quantificação das amostras foi realizada com o programa Shimadzu LabSolutions (Shimadzu Inc., Kioto, Japão, versão 5.57 SP1).

Figura 8. Fluxograma do protocolo de preparo das amostras em plasma



Fonte: próprio autor (<https://www.draw.io>)

Figura 9. Fluxograma do protocolo de preparo das amostras em urina



Fonte: próprio autor (<https://www.draw.io>)

3.4. Genotipagem para *SLC22A2* 808G>T e *SLC22A4* 1507C>T por reação em cadeia de polimerase em tempo real

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue total, coletado em tudo contendo EDTA, pelo método de salting-out (LAHIRI, NURNBERGER, 1991). Brevemente, as hemácias foram lisadas após a adição de solução de lise I gelada ao sangue total e centrifugação (6 minutos, 1.780 × g, 4 °C). O botão de células se precipitou no fundo do tubo, e foi ressuspensão com tampão de lise II, SDS 10% e perclorato de sódio 5 M. Após agitação, os glóbulos brancos foram lisados. A adição de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl 6 M) e subsequente centrifugação (8 minutos, 2.000 × g) levou à desnaturação de proteínas. O sobrenadante (onde se encontra o DNA) foi transferido para um tubo limpo, adicionado de isopropanol absoluto, e o tubo foi homogeneizado até a formação de uma “teia de aranha” (precipitação do DNA). O DNA foi então transferido para um eppendorf limpo,

adicionado de etanol 70% gelado e então centrifugado (5 minutos, 5.000 rpm) para limpar o DNA de qualquer impureza. O DNA foi evaporado à secura para retirar o excesso de etanol e reconstituído em solução de Tris-EDTA.

A quantificação do DNA genômico foi realizada utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000 (versão 1.5, Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, EUA), o qual fornece a razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (razão de absorbância do DNA pela absorbância de proteínas) utilizada para verificar a pureza da amostra. O DNA foi considerado puro quando se a razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ foi próxima de 1,8 (MATLOCK, 2015).

Os polimorfismos genéticos *SLC22A2* 808G>T (rs316019) e *SLC22A4* 1507C>T (rs1050152) foram avaliados em colaboração com Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF-UNESP). A genotipagem foi feita por reação de polimerase em cadeia em tempo real (PCR-RT) utilizando os kits *TaqMan Drug Metabolism SNP Genotyping Assay* da *Applied Biosystems*[®] (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda., Itapevi, Brasil), ensaios C_3111809_20 e C_3170459_30, respectivamente. As amostras de DNA genômico extraídas com o método *salting-out* foram diluídas para a concentração de 1,5 ng/μL, adicionadas de Master Mix (TaqMan) e *SNP Genotyping Assay*. A reação de PCR em tempo real foi realizada no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems[®], Foster City, EUA) utilizando as seguintes condições: aquecimento à 95 °C por 10 minutos pra ativação enzimática, manutenção da temperatura de 95 °C por 15 segundos para desnaturação e redução da temperatura para 60 °C por 90 segundos para o processo de anelamento e extensão.

3.5. Análise farmacocinética e farmacodinâmica

As análises farmacocinéticas foram realizadas por meio do Excel *add-in* Pk Solver versão 2.0; (ZHANG *et al.*, 2010). O Pk Solver é uma ferramenta gratuita para análise de dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos cuja confiabilidade foi demonstrada por comparação dos resultados encontrados com aqueles obtidos com o software WinNonlin (ZHANG *et al.*, 2010). Foi utilizado o modelo não-compartimental para determinar os parâmetros farmacocinéticos área sob a curva (AUC) extrapolada ao infinito ($AUC^{0-\infty}$), clearance total aparente (CL/F), volume de distribuição aparente (Vd/F), concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo para atingir C_{max} (T_{max}) e meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$). A quantidade excretada na urina de forma inalterada (Ae) foi calculada pela multiplicação da concentração da GBP na urina pelo volume de urina

coletado a cada intervalo de tempo. A fração da dose de GBP eliminada de forma inalterada na urina (F_{el}) foi estimada pela fração $F_{el}=Ae/dose$. O clearance renal (CL_R) foi calculado pela seguinte equação:

$$CL_R = F_{el} \times CL/F$$

A análise farmacodinâmica foi realizada por normalização da EVA em porcentagem, considerando como 100% de dor a dor basal dos participantes no primeiro tempo de coleta. O parâmetro atenuação da dor foi definido pela redução da dor basal, em porcentagem, sendo que a atenuação da dor foi considerada 0% quando dor = 100%.

3.6 Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi usado o software GraphPad Prism (versões 5.02 e 7.0 para Windows; GraphPad, San Diego, CA). A significância estatística foi definida como $P < 0,05$. No estudo de transporte in vitro em células HEK, a estatística descritiva foi obtida para todas as variáveis de interesse e os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) e intervalo de confiança de 95%. Os valores da inibição da captação de ASP⁺ de (IC_{50}) foram estimados pela curva sigmoideal dose-resposta. As concentrações intracelulares foram comparadas por análise de variância entre dois grupos (teste t não pareado) ou entre mais de dois grupos independentes (ANOVA com o pós-teste Dunnett para comparações múltiplas).

Os dados farmacocinéticos foram expressos como médias geométricas (coeficiente de variação geométrico) e mediana e percentis 25 e 75%. Em geral, os parâmetros farmacocinéticos apresentam distribuição log-normal, e, portanto, a estatística geométrica é mais apropriada para descrever a farmacocinética (PANDYA; MULLAPUDI, 2011). Na comparação das duas fases do grupo controle, as razões das médias geométricas (RMGs) para os parâmetros farmacocinéticos foram calculadas considerando a razão Fase 2/Fase 1, com intervalo de confiança (IC) de 90%. A interação GBP \times CTZ é confirmada estatisticamente se as RMGs na presença e ausência de CTZ encontrarem-se fora do intervalo de 0,80-1,25 para o parâmetro AUC ou fora do intervalo 0,70-1,43 para o parâmetro C_{max} . O teste t para dados pareados e não paramétricos (Wilcoxon) foi empregado para comparar as duas fases do grupo Controle. Na comparação do grupo Controle com os grupos DC e DNC, a influência do elevado nível de glicose na farmacocinética da GBP é demonstrado se houver

alteração estatisticamente significativa nos parâmetros AUC ou C_{max} e CL_R . O teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos foi empregado para comparar os grupos Controle, DC e DNC.

Os dados farmacodinâmicos foram expressos como média \pm SEM. Foram utilizados os testes Wilcoxon para dados pareados e não paramétricos para comparar as duas fases do grupo Controle, e o teste Kruskal-Wallis para dados não paramétricos na comparação dos grupos Controle, DC e DNC, uma vez que os dados não seguiram distribuição normal.

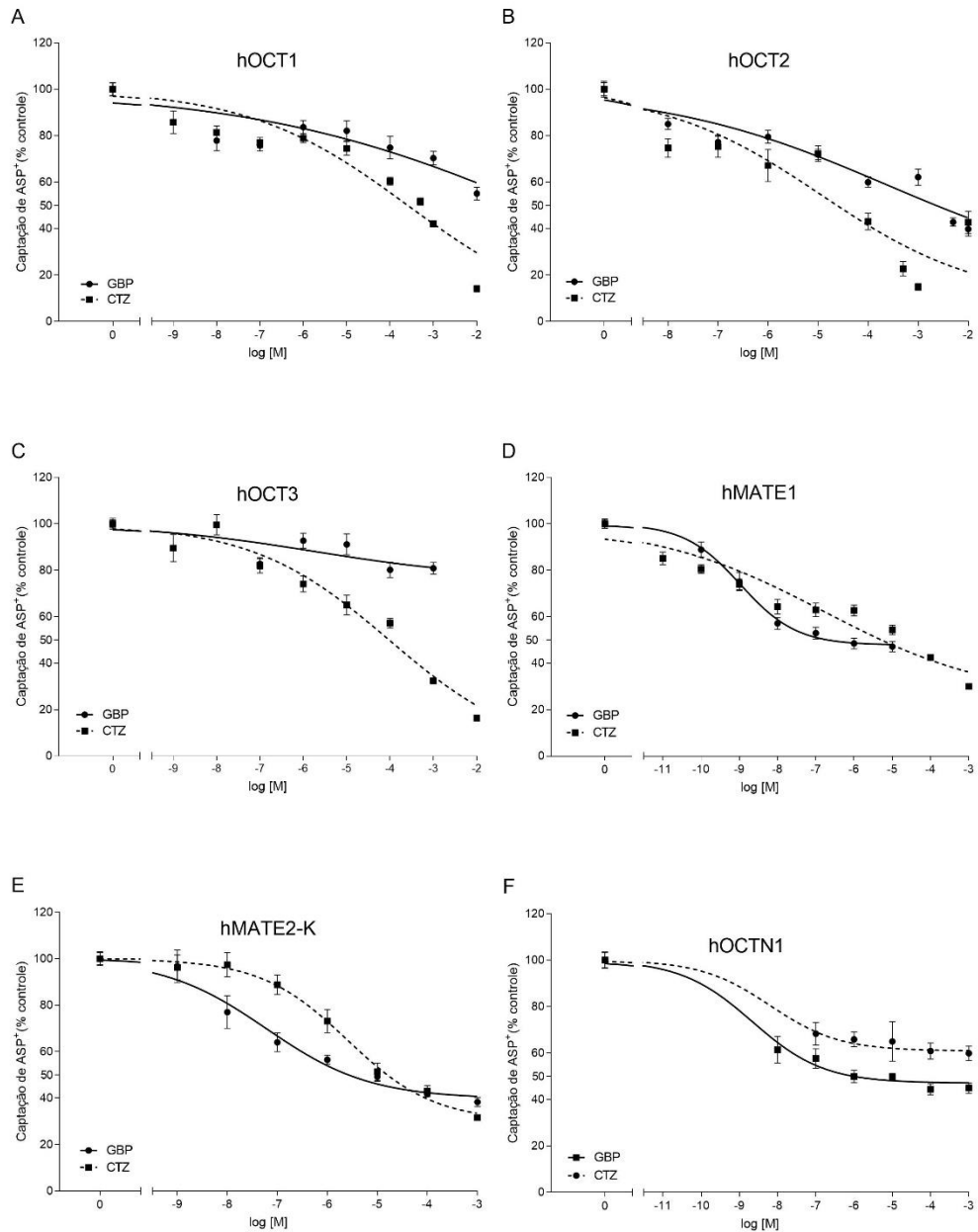
A distribuição dos genótipos para cada um dos polimorfismos investigados foi avaliada para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste do χ^2 . Os genótipos foram comparados por análise de variância entre dois grupos utilizando o teste Mann-Whitney para dados não pareados e não paramétricos, ou entre mais de dois grupos utilizando o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Os dados foram apresentados como mediana e percentis 25 e 75%.

4. RESULTADOS

4.1 Inibição da captação de ASP^+ mediada pelos transportadores para cátions orgânicos

O estudo do papel de transportadores de cátions orgânicos na excreção renal da GBP iniciou-se pela avaliação da inibição da captação do substrato fluorescente ASP^+ em células HEK transfectadas com hOCT1, hOCT2, hOCT3, hMATE1, hMATE2-K ou hOCTN1. As curvas de concentração-resposta para a inibição da captação de ASP^+ por GBP ou CTZ, mediada por cada transportador (Figura 10) foram usadas para o cálculo da afinidade aparente (IC_{50}) (Tabela 2). Com relação à GBP, foram medidos valores de IC_{50} de 237 μM , 1,06 nM, 39 nM e 2,1 nM para os transportadores hOCT2, hMATE1, hMATE2-K e hOCTN1, respectivamente. Não foi possível calcular o IC_{50} para os transportadores hOCT1 e hOCT3 na faixa de concentração testada, uma vez que mesmo em concentração de 10^{-2} M, não se atinge uma inibição próxima a 50% na captação de ASP^+ . Com relação à CTZ, foram medidos valores de IC_{50} de 256 μM , 11,6 μM , 95 μM , 0,16 μM e 2,5 μM para os transportadores hOCT1, hOCT2, hOCT3, hMATE1 e hMATE2-K, respectivamente. Não foi possível calcular o IC_{50} para o transportador hOCTN1 na faixa de concentração testada, uma vez que mesmo nas maiores concentrações não se atinge uma inibição próxima a 50% na captação de ASP^+ .

Figura 10. Curvas concentração-resposta para a inibição da captação de ASP⁺ por GBP ou CTZ, mediado pelos transportadores para cátions orgânicos.



Fonte: próprio autor. Inibição da captação de ASP⁺ por GBP (linha contínua) e CTZ (linha pontilhada). A: mediado por hOCT1. B: mediado por hOCT2. C: mediado por hOCT3. D: mediado por hMATE1. E: mediado por hMATE2-K. F: mediado por hOCTN1. ASP⁺: 4-(4(dimetilamino)esteril)-N-metilpiridínio; hOCT1: transportador de cátions orgânicos 1 humano; hOCT2: transportador de cátions orgânicos 2 humano; hOCT3: transportador de cátions orgânicos 3 humano; hMATE1: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 1 humano; hMATE2-K: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 2-K humano; hOCTN1: transportador de cátions orgânicos novo 1 humano; GBP: gabapentina; CTZ: cetirizina; [M]: concentração molar. Dados são expressos como médias \pm SEM como porcentagem da captação da ASP⁺ na ausência dos competidores. (N= 6-66).

Tabela 2 - Concentração de GBP ou CTZ necessárias para inibir em 50% (IC₅₀) a captação de ASP⁺ nos transportadores para cátions orgânicos expressos em células HEK.

Transportadores	IC ₅₀	
	GBP	CTZ
hOCT1	NC	256 µM (99,55 µg/mL)
hOCT2	237 µM (40,58 µg/mL)	11.6 µM (4,51 µg/mL)
hOCT3	NC	95 µM (36,94 µg/mL)
hMATE1	1.06 nM (0,18 ng/mL)	0.16 µM (62,22 ng/mL)
hMATE2-K	39 nM (6,71 ng/mL)	2.5 µM (0,97 µg/mL)
hOCTN1	2.1 nM (0,36 ng/mL)	NC

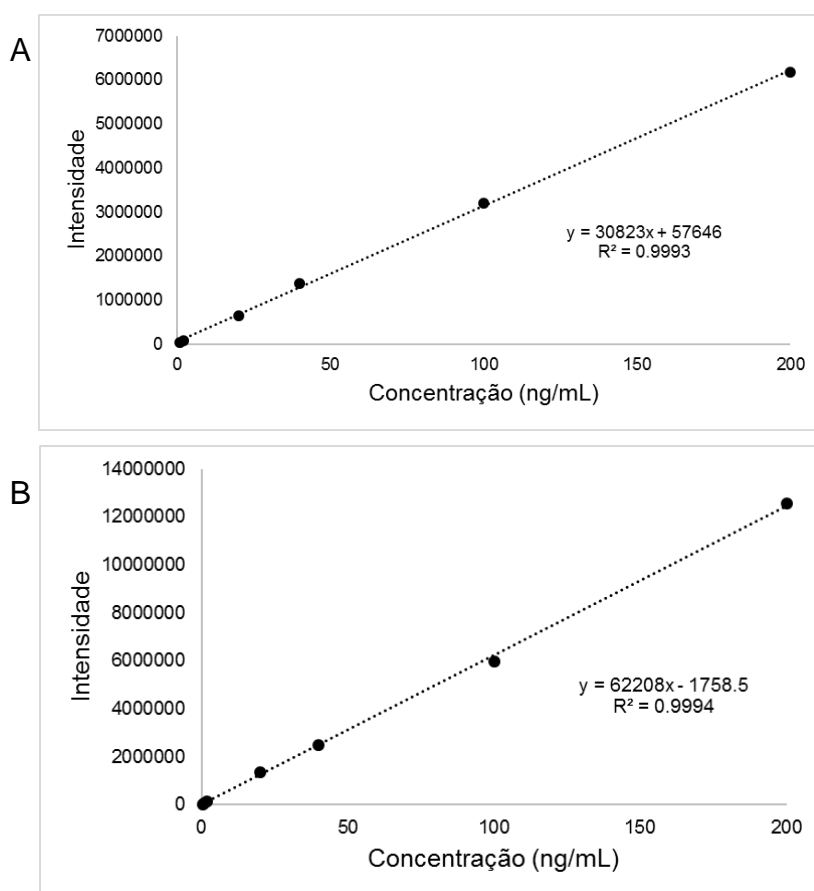
Fonte: próprio autor. IC₅₀: concentração necessária para inibir em 50% a captação de ASP⁺; GBP: gabapentina; CTZ; cetirizina; hOCT1: transportador de cátions orgânicos 1 humano; hOCT2: transportador de cátions orgânicos 2 humano; hOCT3: transportador de cátions orgânicos 3 humano; hMATE1: transportador de extrusão de toxinas e multidroga 1 humano; hMATE2-K: transportador de extrusão de toxinas e multidroga 2-K humano; hOCTN1: transportador de cátions orgânicos novo 1 humano; NC: não foi possível calcular.

4.2. Estudos de transporte da GBP e CTZ

4.2.1 Validação do método de análise de GBP e CTZ em lisado celular

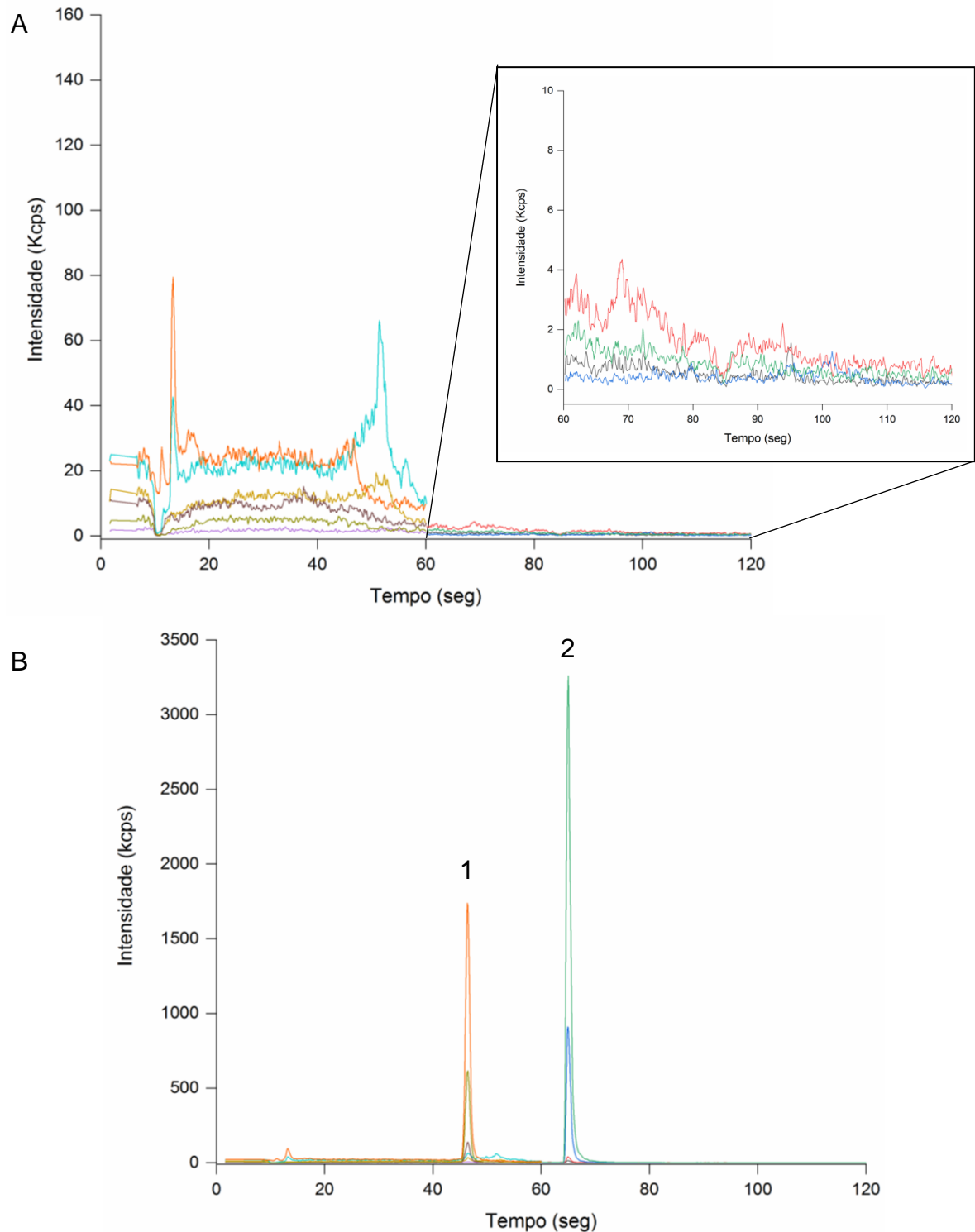
O método de análise da GBP e CTZ em lisado celular foi desenvolvido e validado usando LC-MS/MS. Foram avaliados os parâmetros linearidade, seletividade, precisão e exatidão e estabilidade (Tabela 3). Os coeficientes de determinação (r^2) de 0,99 para ambos fármacos, nos intervalos de concentrações de 1 a 200 ng/mL para GBP e 0,5 a 200 ng/mL para CTZ, e os desvios em relação aos valores nominais inferiores a 15%, revelam que o método foi linear nos intervalos de concentrações supracitado (Figura 11A e B). Os LIQ de 1 ng/mL para GBP e de 0,5 ng/mL para CTZ resultaram em determinações com precisão (CV%) e exatidão (EPR%) inferiores a 5%. O método foi considerado seletivo, pois não houve interferentes próximos ao tempo de retenção da GBP, CTZ e PIs, como pode ser observado no cromatograma do lisado celular branco (Figura 12A). O cromatograma mostra a resolução entre GBP/GBP-d4 e CTZ/CTZ-d4, que eluem nos tempos de retenção de 48 e 66 seg, respectivamente (Figura 12B). O método foi considerado preciso, exato e estável, uma vez que o CV e EPR para os controles de qualidade foram inferiores a 15%.

Figura 11. Curva analítica de GBP e CTZ em lisado celular



Fonte: próprio autor. A: Curva analítica da GBP no intervalo de concentrações de 1 a 200 ng/mL em lisado celular. B: Curva analítica da CTZ no intervalo de concentrações de 0,5 a 200 ng/mL em lisado celular. Condições cromatográficas: coluna Accucore™ C18 RP (50 × 3 mm, 2.6 μM, Thermo Scientific); fase móvel constituída de AF 0,1% (em água):ACN, em fluxo de 1 mL/min.

Figura 12. Cromatogramas referentes a análise de lisado celular branco e enriquecido com GBP, CTZ e padrões internos deuterados por LC-MS/MS.



Fonte: próprio autor. A: Lisado celular branco; B: lisado celular enriquecido com GBP e CTZ na concentração de 0,5 ng/mL de lisado celular e padrões internos na concentração de 20 ng/mL de lisado celular. Picos: 1 – GBP e GBP-d4 (48 seg); 2 – CTZ e CTZ-d4 (66 seg). Condições cromatográficas: coluna Accucore™ C18 RP (50 × 3 mm, 2,6 μM, Thermo Scientific); fase móvel constituída de ACN:AF 0,1% (em água), fluxo de 1 mL/min. Foram monitoradas as seguintes transições m/z: GBP - 172,1 → 154,1/137,1/119,1; GBP-d4 - 176,1 → 158,1/139,1/122,2; CTZ - 389,0 → 200,9/165,0 e CTZ-d4 - 393,0 → 200,9/166,2.

Tabela 3 - Parâmetros de validação do método de análise de GBP e CTZ em lisado celular

	GBP		CTZ	
Linearidade				
LOD (ng/mL)	0,04		0,02	
LIQ (ng/mL)	1		0,5	
Equação da reta	y=30823x + 57646		y=62208x – 1758,5	
(r ²)	0,9993		0,9994	
Precisão e Exatidão Intra-ensaio (n=3)	CV (%)	EPR (%)	CV (%)	EPR (%)
LIQ	1,52	2,97	2,01	0,04
CQB	2,99	8,22	1,45	-1,88
CQM	2,42	-1,73	0,60	8,58
CQA	2,03	-3,11	1,55	-0,47
Precisão e Exatidão Interensaios (n=3, em 3 ensaios distintos)				
LIQ	4,69	4,39	2,64	1,77
CQB	2,66	11,21	2,85	1,43
CQM	1,61	-0,16	2,08	6,16
CQA	2,49	-1,04	0,68	-0,08
Estabilidades (n=3)				
Longa duração (25 °C, 10 dias)				
CQB	12,68		3,02	
CQA	-0,05		0,13	

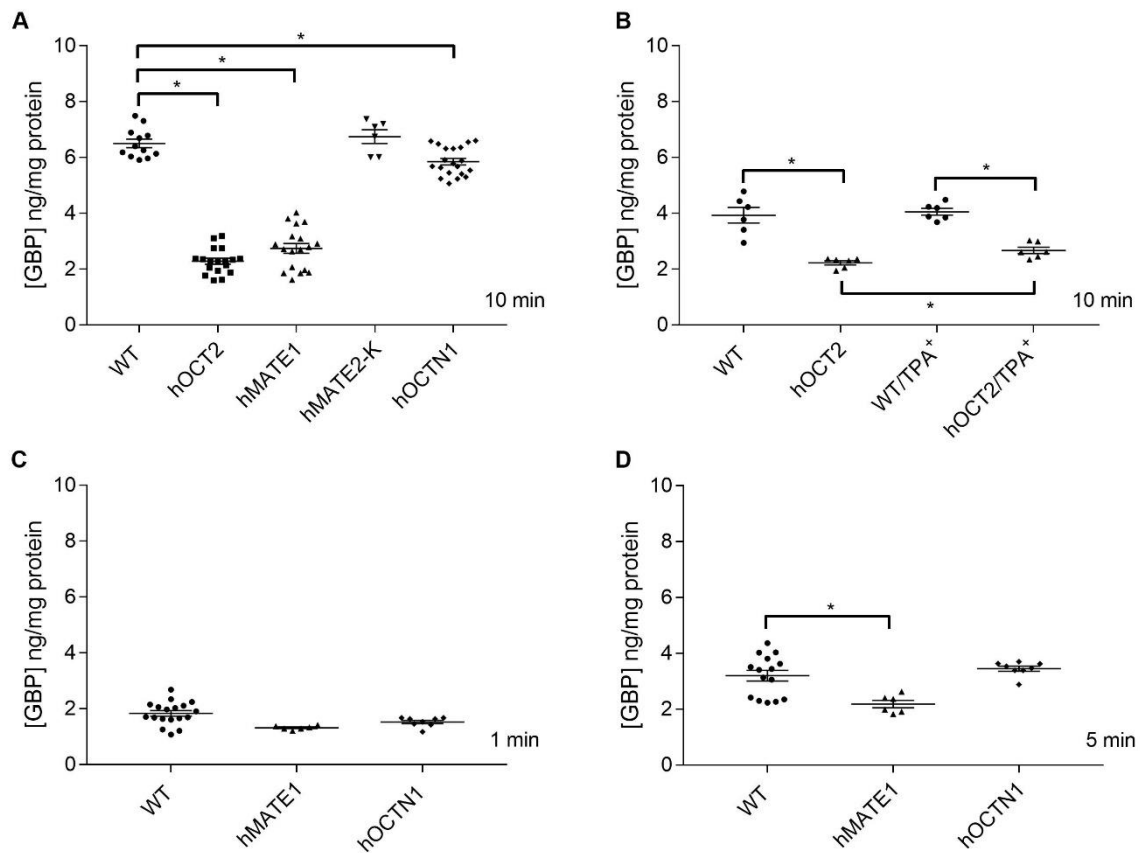
Fonte: próprio autor. Limites de confiança do método para quantificar GBP ou CTZ em lisado celular. LOD: limite de detecção; LIQ: limite de qualificação; r²: coeficiente de regressão; CQB: controle de qualidade de baixa concentração (2 ng/mL para GBP e 1 ng/mL para CTZ); CQM: controle de qualidade de média concentração (20 ng/mL para GBP e CTZ); CQA: controle de qualidade de alta concentração (100 ng/mL para GBP e CTZ); CV: coeficiente de variação; EPR: erro padrão relativo. CV EPR são aceitos quando os valores são inferiores a 15%.

4.2.2 Experimentos de Transporte

Para determinar se GBP ou CTZ são substratos para os transportadores para cátions orgânicos, experimentos de transporte foram realizados após incubação com GBP ou CTZ em concentração de 0,1 µM por 1 a 10 minutos a 37 °C, a temperatura fisiológica humana. A concentração intracelular da GBP após 10 minutos de incubação foi menor em células HEK expressando hOCT2, hMATE1 e hOCTN1, quando comparados com células WT (WT: 6,499 ± 0,15 ng/mg de proteína; hOCT2: 2,323 ± 0,14 ng/mg de proteína; hMATE1: 2,638 ± 0,23 ng/mg de proteína; hOCTN1: 5,847 ± 0,11 ng/mg de proteína, p<0,0001, Figura 13A). Não houve diferença entre células hMATE2-K e WT (6,499 ± 0,15 ng/mg de proteína vs. 6,739 ± 0,24 ng/mg de proteína, Figura 13A). A coincubação com 1 mM de tetrapentilamônio (TPA⁺, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), um conhecido inibidor dos transportadores, aumentou

a concentração intracelular de GBP em células HEK que expressam hOCT2 ($2,22 \pm 0,07$ ng/mg de proteína vs. $2,667 \pm 0,11$ ng/mg de proteína, $p < 0,05$), apesar das concentrações intracelulares permanecerem menores em comparação com células WT ($4,049 \pm 0,12$ ng/mg de proteína vs. $2,667 \pm 0,11$ ng/mg de proteína, $p < 0,05$, Figura 13B). Após 1 minuto de incubação, não houve diferença entre células HEK expressando hMATE1 e células WT ($1,83 \pm 0,007$ ng/mg de proteína vs. $1,316 \pm 0,029$, Figura 13C), e após 5 min de incubação a diferença na concentração intracelular entre células hMATE1 e WT foi menor do que a encontrada após 10 minutos de incubação ($3,195 \pm 0,18$ ng/mg de proteína vs. $2,181 \pm 0,13$ ng/mg de proteína, $p < 0,05$, Figura 13D). Para as células que expressam hOCTN1, não houve diferença na concentração intracelular de GBP após 1 e 5 minutos de incubação (1 min.: $1,83 \pm 0,007$ ng/mg de proteína vs. $1,521 \pm 0,060$ ng/mg de proteína; 5 min.: $3,195 \pm 0,18$ ng/mg de proteína vs. $3,448 \pm 0,09$ ng/mg de proteína, Figura 13C e D).

Figura 13. Transporte de GBP (0,1 μM) por transportadores para cátions orgânicos transfectados em células HEK.

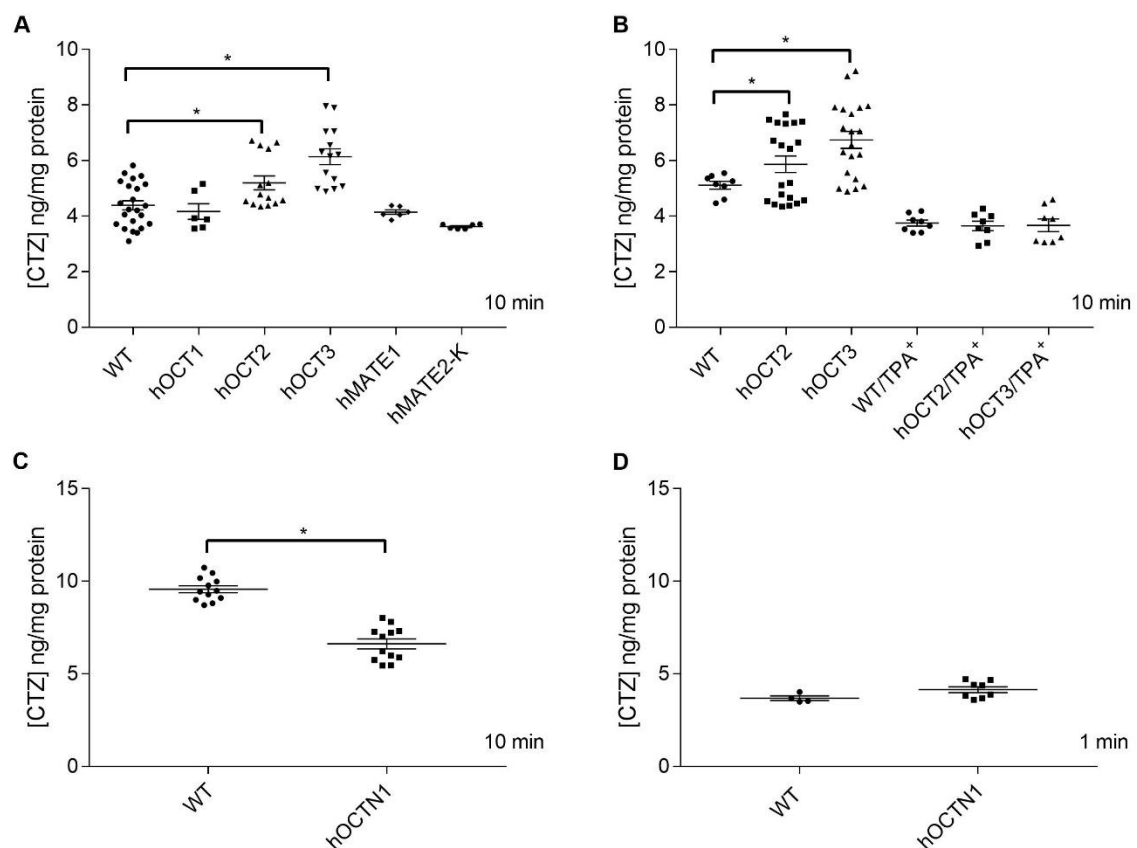


Fonte: próprio autor. A: Células HEK incubadas com 0,1 μM de GBP por 10 min a 37 °C. B: Incubação de células WT e hOCT2 com 0,1 μM de GBP sozinho ou com 1 mM de TPA⁺, um inibidor conhecido do transportador, por 1 min a 37 °C. C: Incubação de células HEK WT, hMATE1 e hOCTN1 com 0,1 μM de GBP, por 1 min a 37 °C. D: Incubação de células HEK WT, hMATE1 e hOCTN1 com 0,1 μM de GBP, por 5 min a 37 °C. GBP: gabapentina; WT: células wild-type; hOCT2: transportador de cátions orgânicos 2 humano; hMATE1: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 1 humana; hMATE2-K: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 2-K humana; hOCTN1: transportador de cátions orgânicos novo 1 humano; TPA⁺: tetrapentilamônio. Dados são mostrados como média \pm SEM. *valor de $p < 0,05$.

As concentrações intracelulares de CTZ após 10 minutos de incubação foram maiores em células HEK que expressam hOCT2 ($5,196 \pm 0,25$ ng/mg de proteína, $p < 0,05$) e hOCT3 ($6,141 \pm 0,28$ ng/mg de proteína, $p < 0,0001$) quando comparados com células WT ($4,386 \pm 0,17$ ng/mg de proteína, Figura 14A). Não houve diferença entre células HEK transfectadas com hOCT1 ($4,165 \pm 0,28$ ng/mg de proteína), hMATE1 ($4,14 \pm 0,08$ ng/mg de proteína) e hMATE2-K ($3,619 \pm 0,04$ ng/mg de proteína) quando comparados com células WT (Figura 14A). A coincubação com 1 mM de TPA⁺ reduziu a concentração intracelular de CTZ de maneira que não diferença entre células hOCT2 ou hOCT3 quando comparadas com células WT (WT: $3,744 \pm 0,10$ ng/mg de proteína; hOCT2: $3,643 \pm 0,17$ ng/mg de proteína e hOCT3: $3,666 \pm$

0,22 ng/mg proteína, Figura 14B). A concentração intracelular de CTZ após 10 minutos de incubação foi menor nas células transfectadas com hOCTN1 quando comparada com células WT ($9,573 \pm 0,19$ ng/mg de proteína vs. $6,614 \pm 0,27$ ng/mg de proteína, $p < 0,0001$, Figura 14C), enquanto após 1 min de incubação não houve diferença entre células hOCTN1 e células WT ($3,68 \pm 0,12$ ng/mg de proteína vs. $4,141 \pm 0,16$ ng/mg de proteína, Figura 14D).

Figura 14. Transporte de CTZ ($0,1 \mu\text{M}$) por transportadores para cátions orgânicos transfectados em células HEK.

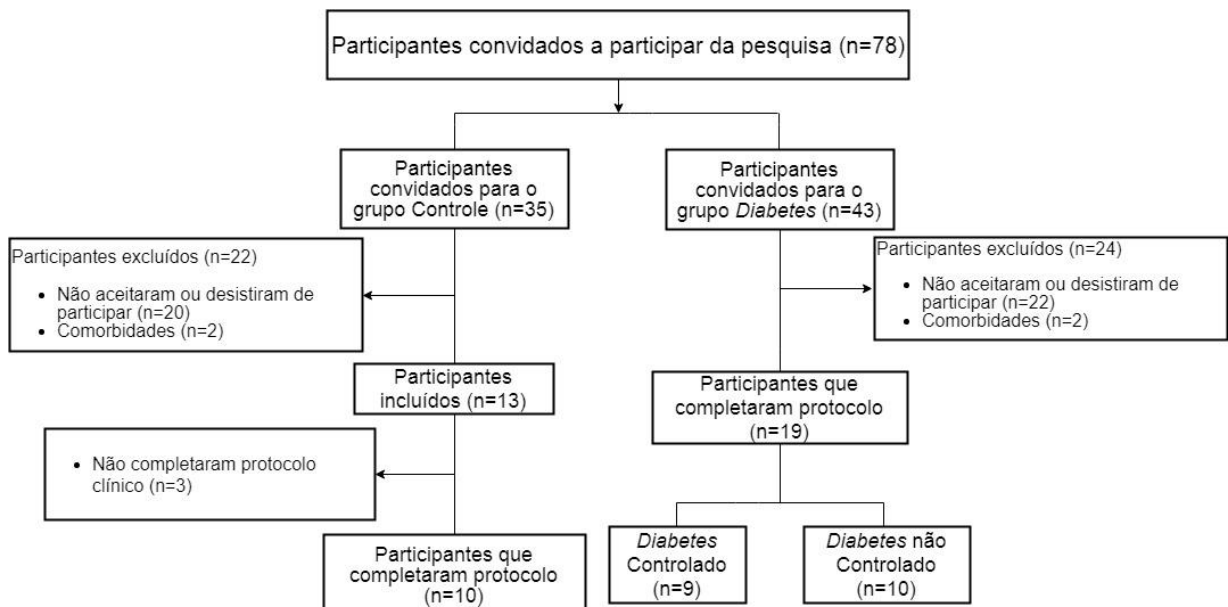


Fonte: próprio autor. A: Células HEK incubadas com $0,1 \mu\text{M}$ de CTZ por 10 min a 37°C . B: Incubação de células WT, hOCT2 e hOCT3 com $0,1 \mu\text{M}$ de CTZ sozinho ou com 1 mM de TPA^+ , um inibidor conhecido do transportador, por 10 min a 37°C . C: Células HEK incubadas com $0,1 \mu\text{M}$ de CTZ por 10 min a 37°C . D: Incubação de células HEK WT, hMATE1 e hOCTN1 com $0,1 \mu\text{M}$ de CTZ, por 1 min a 37°C . CTZ: cetirizina; WT: células wild-type; hOCT1: transportador de cátions orgânicos 1 humano; hOCT2: transportador de cátions orgânicos 2 humano; hOCT3: transportador de cátions orgânicos 3 humano; hMATE1: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 1 humana; hMATE2-K: proteína de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 2-K humana; hOCTN1: transportador de cátions orgânicos novo 1 humano; TPA^+ : tetrapentilamônio. Dados são mostrados como média \pm SEM. *valor de $p < 0,05$.

4.3 Estudo clínico da disposição cinética da GBP: interação com CTZ e avaliação do efeito do controle glicêmico

Um total de 78 participantes foram considerados elegíveis e foram convidados a participar do estudo, sendo que 35 atendiam os critérios para alocação no Grupo Controle e 43 nos grupos de pacientes com diabetes (DC e DNC). No grupo Controle, 20 participantes não aceitaram ou desistiram de participar e 2 foram excluídos por comorbidades. Dos participantes incluídos no estudo no Grupo Controle, 3 não completaram o protocolo clínico. Portanto, 10 participantes foram incluídos no grupo Controle e concluíram o protocolo clínico. No grupo diabético, 22 participantes desistiram ou não aceitaram participar e 2 foram excluídos por comorbidades. Considerando os valores de hemoglobina glicada (HbA1c), os participantes com diabetes foram alocados nos grupos Diabetes Controlado (DC) (HbA1c < 8,0%, n=9) e Diabetes não Controlado (DNC) (HbA1c > 8,0%, n=10) (Figura 15). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de iniciar o protocolo clínico.

Figura 15. Diagrama de fluxo do recrutamento de participantes da pesquisa (diagrama de fluxo segundo CONSORT 2010)



Fonte: próprio autor (<https://www.draw.io>)

A idade dos participantes variou de 37 a 58 anos no grupo Controle e de 39 a 59 anos no grupo Diabético. No grupo Controle, o IMC variou de 20,3 kg/m² a 36,8

kg/m², e no grupo Diabético, de 19,9 kg/m² a 41,8 kg/m². Todos os participantes apresentaram clearance de creatinina > 30 mL/min/1,73m². Não houve diferença estatística entre os grupos em termos de idade, peso, IMC, ureia, creatinina sérica, taxa de filtração glomerular estimada (TFGe), AST, ALT, gama GT ou BT. Não foi observada diferença significativa na glicemia entre os participantes do grupo DC e do grupo Controle. Os participantes do grupo DNC apresentaram aumento significativo na glicemia em relação ao grupo Controle ($p < 0,0001$) e ao grupo DC ($p < 0,05$). Os participantes com diabetes apresentaram HbA1c significativamente maior do que os participantes do grupo Controle ($p < 0,0001$). Dentre os participantes com diabetes, o grupo DNC apresentou HbA1c significativamente maior do que o grupo DC ($p < 0,0001$). As características clínicas e demográficas dos participantes do estudo estão descritas na tabela 4 e os resultados dos exames bioquímicos estão descritos na tabela 5.

Tabela 4 - Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo (n=29)

Controle (n=10)	Sexo	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	IMC (kg/m ²)	Dor neuropática (EVA)
2	F	57	81,1	158	32,5	Hérnia de disco cervical (10)
3	F	57	92,1	158	36,8	Hérnia de disco lombar (10)
4	F	47	79,9	164	29,7	Hérnia de disco cervical (6)
5	M	58	88,7	171	30,3	Hérnia de disco lombar (6)
8	F	48	75,5	163	28,4	Hérnia de disco lombar (7)
11	M	49	83,5	175	27,3	Hérnia de disco lombar (7)
12	F	37	54,5	164	20,3	Hérnia de disco lombar (7)
17	F	49	67,8	150	30,1	Hérnia de disco lombar (9)
28	M	54	74,8	174	24,7	Hérnia de disco lombar (10)
29	F	42	98,4	165	36,1	Hérnia de disco lombar (7)
Média ± desvio padrão		49,8 ± 6,8	79,6 ± 12,5	164,2 ± 7,7	29,6 ± 4,9	7 ± 1,9
Mínimo - Máximo		37 - 58	54,5 - 98,4	150 - 175	20,3 - 36,8	4 - 10
DC (n=9)						
9	F	42	102,0	164	37,9	Neuropatia diabética (10)
13	M	54	97,6	165	35,8	Neuropatia diabética (6)
15	F	59	90,0	151	39,4	Neuropatia diabética (10)
16	F	56	97,1	161	37,5	Neuropatia diabética (8)
18	M	56	103,1	172	34,8	Neuropatia diabética (7)
24	F	46	96,9	158	38,8	Neuropatia diabética (8)
30	F	40	90,9	154	38,3	Neuropatia diabética (7)
31	M	52	99,7	176	32,2	Neuropatia diabética (8)
32	F	56	55,5	156	22,8	Neuropatia diabética (9)
Média ± desvio padrão		51,2 ± 6,8	92,5 ± 14,6	161,9 ± 8,2	35,3 ± 5,2	8 ± 1,3
Mínimo - Máximo		40 - 59	55,5 - 103,1	151 - 176	22,8 - 39,4	6 - 10
DNC (n=10)						
1	F	39	97,2	170	35,6	Neuropatia diabética (8)
10	F	52	55,7	148	25,5	Neuropatia diabética (8)
14	F	50	84,6	175	27,6	Neuropatia diabética (6)
20	M	59	61,0	175	19,9	Neuropatia diabética (7)
21	M	52	140	183	41,8	Neuropatia diabética (8)
22	F	53	85,9	160	33,5	Neuropatia diabética (10)
23	F	58	81,8	168	29	Neuropatia diabética (8)
25	M	58	118,9	171	40,6	Neuropatia diabética (5)
26	M	55	109,2	178	34,3	Neuropatia diabética (6)
27	F	57	53,4	155	22,2	Neuropatia diabética (10)
Média ± desvio padrão		53,3 ± 5,9	88,7 ± 28,3	168,3 ± 10,9	30,8 ± 7,3	7,6 ± 1,6
Mínimo - Máximo		39 - 59	53,4 - 140,0	148 - 184	19,9 - 41,8	5 - 10

Fonte: próprio autor. F: feminino; M: masculino; IMC: índice de massa corporal; kg: quilograma; cm: centímetros; kg/m²: quilogramas por metro quadrado; EVA: escala visual analógica.

Tabela 5 – Exames bioquímicos dos participantes do estudo (n=29)

Controle (n=10)	Exames bioquímicos								
	Ureia (mg/dL) ¹	Creatinina (mg/dL) ²	TFGe (mL/min/1,73m ²)	AST (U/L) ³	ALT (U/L) ⁴	Gama GT (U/L) ⁵	BT (mg/dL) ⁶	Glicemia (mg/dL) ⁷	HbA1c (%) ⁸
2	28,0	0,68	97	21,0	26,0	21,0	0,40	97,0	5,6
3	36,0	0,92	69	26,6	18,2	25,0	0,40	82,0	5,4
4	25,0	0,64	106	20,3	19,8	25,0	0,20	82,0	5,0
5	47,0	2,06	34	17,2	12,6	28,0	0,63	74,0	5,8
8	39,0	1,23	52	22	19,5	21,0	0,55	81,0	5,9
11	36,1	0,99	89	13,6	19,4	29,8	0,60	85,2	5,6
12	26,7	0,92	80	15,1	6,9	11,7	0,50	86,3	4,5
17	32,0	0,66	104	21,8	29,1	11,7	0,30	84,5	5,5
28	20,9	1,10	76	20,9	10,9	9,9	0,43	93,1	5,7
29	23,1	0,88	81	16,7	30,2	49,3	0,26	84,9	4,6
Média ± desvio padrão	31,4 ± 8,1	1,0 ± 0,4	78,8 ± 22,7	19,5 ± 3,8	19,2 ± 7,6	23,2 ± 11,5	0,42 ± 0,14	85 ± 6,4	5,3 ± 0,5
Mínimo - máximo	20,9 - 47	0,64 - 2,06	34 - 106	13,6 - 26,6	6,9 - 30,2	9,9 - 49,3	0,20 - 0,63	74 - 97	4,5 - 5,5
Diabetes Controlado (n=9)									
9	19,9	0,61	112	15,3	11,8	26,9	0,40	112,4	6,4
13	32,9	0,93	93	26,9	29,9	43,4	0,51	108,7	6,1
15	61,7 ^a	0,92	68	22,5	12,7	139,9 ^c	0,45	95,4	7,1
16	30,0	0,80	82	40,3 ^b	44,9 ^b	69,1 ^c	0,40	135,5	7,0
18	31,4	0,59	113	13,9	18,9	18,4	0,48	118,3	7,9
24	32,4	0,80	88	16,5	12,6	29,1	0,19	157,3	6,6
30	29,1	0,44	126	13,3	18,4	30,1	1,31	109,8	6,8
31	50,6	1,42	56	21,8	23,9	42,5	0,57	68,2	7,3
32	24,6	0,74	105	17,4	17,8	26,9	0,53	113,4	7,1
Média ± desvio padrão	34,7 ± 13,1	0,80 ± 0,3	93,6 ± 22,7	20,9 ± 8,5	21,2 ± 10,6	47,4 ± 37,7	0,54 ± 0,30	113,2 ± 24,6	6,9 ± 0,5*
Mínimo - Máximo	19,9 - 61,7	0,44 - 1,42	56 - 126	13,3 - 40,3	11,8 - 44,9	18,4 - 139,9	0,19 - 1,31	68,2 - 157,3	6,1 - 7,9
Diabetes não Controlado (n=10)									
1	37,0	0,74	102	10,1	12,7	53,0 ^c	0,35	191,0	8,3
10	24,7	0,61	104	17,0	28,2	122,5 ^c	0,54	207,5	10,5
14	38,9	0,65	104	-	21,5	18,9	1,15	110,8	8,9
20	26,9	0,91	92	32,3	22,3	15,5	0,63	309,6	10,2
21	43,5	0,81	102	52,9 ^b	21,7	28,9	0,73	132,3	10,6
22	57,8 ^a	0,72	96	20,1	29,5	116,1 ^c	0,45	225,8	10,7
23	121,9	1,43	47	16,0	16,9	50,8	0,50	178,5	10,5
25	74,7	1,74	42	35,9 ^b	44,4 ^b	40,6	0,56	157,1	9,4
26	22,7	1,10	75	21,3	19,9	23,7	0,46	155,4	8,7
27	36,2	0,77	86	24,1	18,9	49,6	0,62	116,9	9,5
Média ± desvio padrão	48,4 ± 30,3	0,95 ± 0,4	85,0 ± 23,2	25,5 ± 13,0	23,6 ± 8,8	51,9 ± 38,0	0,60 ± 0,22	178 ± 59,5**	9,7 ± 0,9**
Mínimo - Máximo	22,7 - 121,9	0,61 - 1,74	42 - 104	10,1 - 52,9	12,7 - 44,4	15,5 - 122,5	0,35 - 1,15	110,8 - 309,6	8,3 - 11,5

Fonte: próprio autor. TGFe: clearance de creatinina estimado pelo cálculo CKD-EPI (2009); AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; Gama GT: gamaglutamíil transpeptidase; BT: bilirrubinas totais; HbA1c: hemoglobina glicada. Valores de referência: 1: 10,00 – 50,00 mg/dL; 2: 0,7 - 1,5 mg/dL; 3: até 32,0 U/L; 4: até 31,0 U/L; 5: 11,0 – 50,00 U/L; 6: 0,2 - 1,2 mg/dL; 7: 70,00 – 100,00 mg/dL; 8: 4,3 – 6,1%. ^aPode estar alterado mesmo com TGFe normal (TRAYNOR *et al.*, 2006; MEHTA *et al.*, 2008). ^bPequenas elevações podem ocorrer em indivíduos normais (PRATT; KAPLAN, 2000). ^cPode estar elevada em condição de diabetes (GOLDBERG; MARTIN, 1975). *One-way ANOVA (p<0,05) em relação ao grupo Controle. **One-way ANOVA (p<0,05) em relação ao grupo DC.

4.3.1 Influência do inibidor de cátions orgânicos CTZ na disposição cinética da GBP

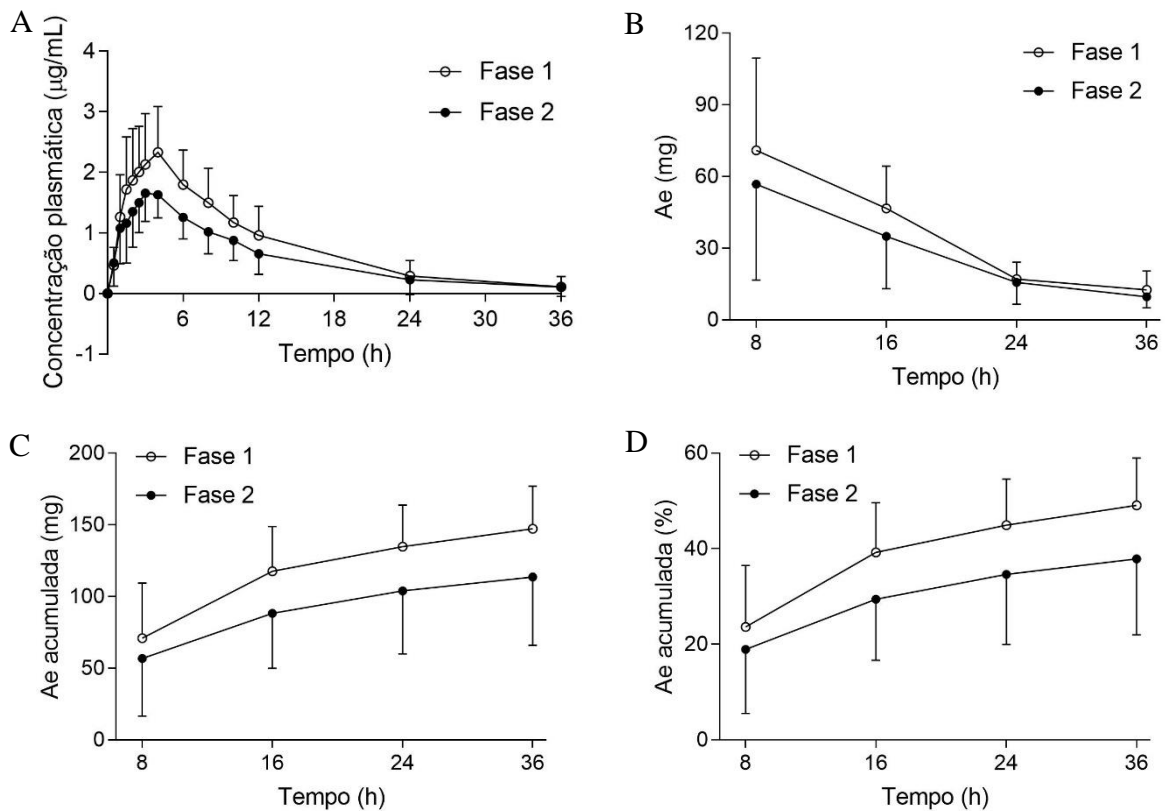
O método de análise da GBP foi desenvolvido e validado pelo grupo de pesquisa (YAMAMOTO, 2018). Em resumo, a análise da GBP usando HPLC-UV apresentou linearidade no intervalo de 0,2 a 14 µg/mL em plasma, e 2 a 120 µg/mL em urina. Os limites de quantificação (LIQ) foram 0,2 µg/mL e 2 µg/mL, para os métodos de análise em plasma e urina, respectivamente. A precisão e exatidão foram avaliadas para controles de qualidade em cinco níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), com coeficientes de variação e erro padrão relativo compatíveis com os guias de validação vigentes. As estabilidades de curta duração, longa duração, pós-processamento e após ciclos de congelamento e descongelamento foram avaliadas para os controles de qualidade CQB e CQA, com erro padrão relativo inferior a 15%.

As curvas de concentração plasmática *versus* tempo foram usadas para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos da GBP (Figura 16A, Tabela 6, APÊNDICE III). Observa-se que as concentrações plasmáticas de GBP foram menores na Fase 2 quando comparadas a Fase 1. Entretanto, o decaimento das concentrações plasmáticas tem taxa similar entre as duas fases (Figura 16A). A análise entre os dados pareados revelou que a coadministração de CTZ na dose 20 mg/dia por 5 dias resultou em redução na $AUC^{0-\infty}$ e C_{max} , sem alteração do T_{max} (Tabela 6). O intervalo de confiança 90% (IC 90%) da razão das médias geométricas (RMG) Fase 2/Fase 1 para os parâmetros farmacocinéticos $AUC^{0-\infty}$ e C_{max} foi 73 (65% - 81%) e 71 (59% - 86%), respectivamente (Tabela 6, Figura 17). A coadministração de CTZ resultou em maior CL/F (14,6 L/h) e maior Vd/F (151,9 L) quando comparado com a administração de GBP apenas (CL/F: 10,6 L/h; Vd/F: 106,2 L). Apesar do aumento de CL/F na Fase 2, não foram observadas diferenças no CL_R (5,14 L/h) quando comparado a Fase 1 (5,2 L/h), embora a fração excretada inalterada na urina (F_{el}) seja menor na Fase 2 quando comparada com a Fase 1 (35,2 vs. 48,2; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas no T_{max} e $T_{1/2}$ da GBP entre os tratamentos (Tabela 6).

A quantidade de GBP excretada na urina a cada intervalo de tempo, bem como a quantidade acumulada em função do tempo mostram que a GBP tem excreção principalmente renal (Figura 16B e C). Em média, 48% da dose administrada foram recuperados inalterados na urina após 36 horas na Fase 1, e 35% na Fase 2 (Tabela 6, Figura 16D).

A atenuação de dor foi significativamente reduzida principalmente no intervalo de 0,5 a 2,5 horas após a administração de GBP na Fase 2, quando comparado com a Fase 1 ($p < 0,05$, Figura 18A). A atenuação máxima média de dor nas Fases 1 e 2 foi de aproximadamente 40% e 30%, respectivamente ($p < 0,005$, Figura 18B). A alteração observada na farmacodinâmica está diretamente relacionada com a farmacocinética da GBP, uma vez que as concentrações plasmáticas de GBP foram menores após coadministração de CTZ.

Figura 16. Concentração plasmática e quantidade excretada na urina *versus* tempo no grupo controle (n=10).



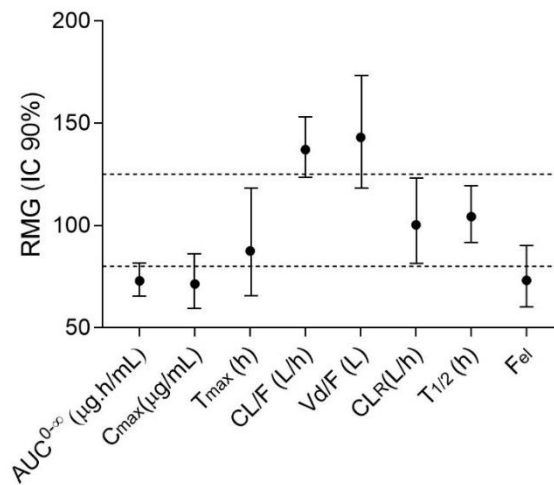
Fonte: próprio autor. A: Concentração plasmática da GBP *versus* tempo. B: Quantidade de GBP excretada na urina de forma inalterada (Ae) *versus* tempo. C: Ae acumulada *versus* tempo. D: Ae acumulada em porcentagem da dose *versus* tempo. Dados mostrados como média ± desvio padrão (GraphPad Prism, versão 7.0). Fase 1 – administração em dose única de 300 mg de GBP; Fase 2 – tratamento com 20 mg/dia de CTZ por 5 dias e dose única de 300 mg de GBP no último dia de tratamento com CTZ.

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos da GBP nas fases 1 e 2 (n=10). Dados apresentados como média geométrica (coeficiente de variação geométrico); mediana (percentis 25 e 75). Também estão apresentadas as razões das médias geométricas RMG Fase 2/Fase 1 com IC 90%.

Parâmetros	Fase 1 (n=10)	Fase 2 (n=10)	RMG (IC 90%)
AUC ^{0-∞} (µg.h/mL)	28,2 (46)	20,6 (52)*	0,73 (0,65 – 0,81)
C _{max} (µg/mL)	27,3 (20,9 – 34,1)	18,4 (16,7 – 24,3)	0,71 (0,59 – 0,86)
	2,48 (32)	1,77 (35)*	
T _{max} (h)	2,6 (1,9 – 3,2)	1,8 (1,6 – 2,2)	-
	3,3 (38)	2,7 (56)	
CL/F (L/h)	3,5 (2,5 – 4)	3,5 (2,4 – 4)	-
	10,6 (46)	14,6 (52)*	
Vd/F (L)	11,0 (8,8 – 14,4)	16,0 (12,4 – 18,0)	-
	106,2 (40)	151,9 (33)*	
T _½ (h)	99,9 (80,3 – 141,4)	144,8 (126,2 – 176,7)	-
	6,9 (35)	7,2 (43)	
CL _R (L/h)	7,0 (5,1 – 8,2)	7,4 (5,7 – 7,9)	-
	5,12 (47)	5,14 (90)	
F _{el}	5,6 (4,6 – 5,9)	6,1 (4,6 – 7,4)	-
	48,2 (22)	35,2 (48)*	
	49,2 (40,4 – 57,5)	34,5 (28,3 – 44,1)	

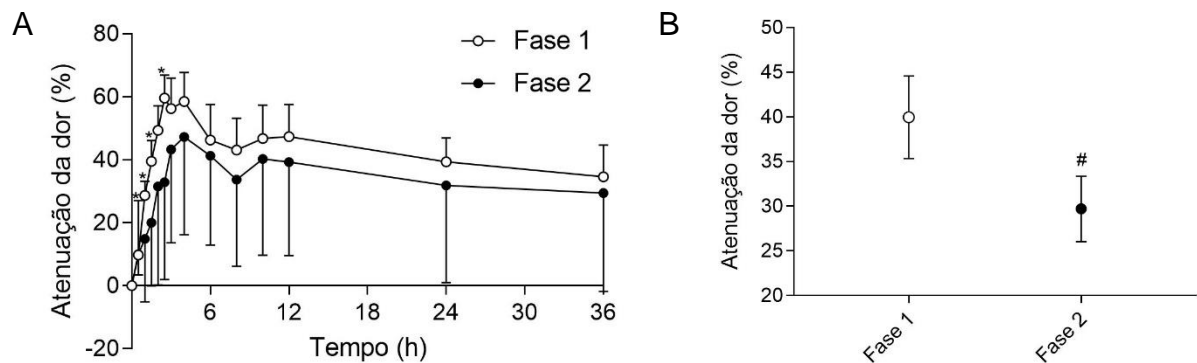
Fonte: próprio autor. Fase 1: administração de dose única de 300 mg de GBP; Fase 2: tratamento com 20 mg/dia de CTZ por 5 dias e administração de dose única de 300 mg de GBP no último dia de tratamento com CTZ. *Teste Wilcoxon para dados pareados e não paramétricos, considerando nível de significância de 5%. AUC^{0-∞}: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar concentração plasmática máxima; CL/F: clearance total aparente; Vd/F: volume de distribuição aparente; T_½: meia-vida; CL_R: clearance renal; F_{el}: fração excretada inalterada na urina; RMG: razão da média geométrica; IC: intervalo de confiança.

Figura 17. Razão das médias geométricas (RMG, Fase 2/Fase 1) e intervalos de confiança de 90% dos parâmetros farmacocinéticos nas fases 1 e 2.



Fonte: próprio autor. Fase 1: administração de dose única de 300 mg de GBP; Fase 2: tratamento com 20 mg/dia de CTZ por 5 dias e administração de dose única de 300 mg de GBP no último dia de tratamento com CTZ. AUC^{0-∞}: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar concentração plasmática máxima; CL/F: clearance total aparente; Vd/F: volume de distribuição aparente; T_{1/2}: meia-vida. O intervalo 80-125 está marcado com a linha pontilhada (GraphPad Prism, versão 7.0).

Figura 18. Atenuação da dor (%) dos participantes do grupo Controle, comparando-se Fase 1 e Fase 2.



Fonte: próprio autor. A: atenuação da dor em porcentagem versus tempo nas Fases 1 e 2, em escala linear. B: atenuação máxima da dor em porcentagem comparando Fase 1 e Fase 2. Dados são mostrados como média ± SEM. Fase 1 – administração em dose única de 300 mg de GBP; Fase 2 – tratamento com 20 mg/dia de CTZ por 5 dias e dose única de 300 mg de GBP no último dia de tratamento com CTZ. *Teste Wilcoxon para dados pareados e não paramétricos, considerando nível de confiança de 5%. #Teste Mann-Whitney para dados não paramétricos, considerando nível de confiança de 5%.

4.3.2 Influência do diabetes e seu controle glicêmico na disposição cinética da GBP

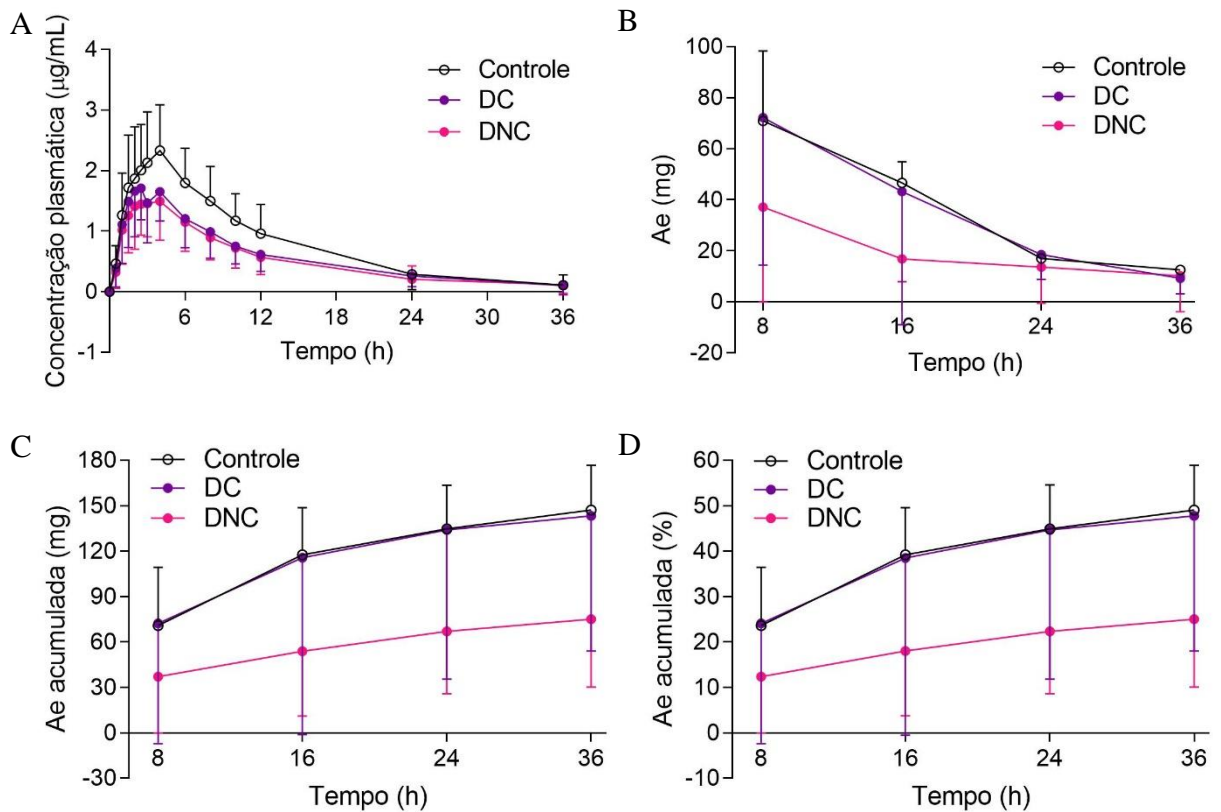
O efeito do diabetes e do controle glicêmico na disposição cinética da GBP foi avaliado em pacientes com dor neuropática a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo (Figura 19A, APÊNDICE IV). Os participantes com diabetes apresentaram redução na C_{max} da GBP (C_{max} : 1,73 $\mu\text{g/mL}$) se comparados aos participantes não diabéticos (C_{max} : 2,48 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,05$). Foi observado também aumento no volume de distribuição aparente nos participantes com diabetes (V_d/F : 169,3 L vs. V_d/F 106,2 L, $p < 0,05$, Tabela 7).

Os resultados sugerem que o controle glicêmico está associado as alterações na disposição cinética da GBP induzidas pelo diabetes. Quando categorizados pelo controle glicêmico, os participantes com diabetes não controlado apresentaram diferenças marginais ($p = 0,08780$) no parâmetro C_{max} em relação ao grupo Controle (Controle: 2,48 $\mu\text{g/mL}$; DNC: 1,6 $\mu\text{g/mL}$). O volume de distribuição aparente apresentou uma diferença marginal ($p = 0,0506$) nos participantes com diabetes não controlado quando comparados ao grupo Controle (DNC: 178,8 L vs. Controle 106,2, Tabela 8). A F_{el} foi significativamente menor nos participantes com diabetes não controlado (20,7%) se comparado àqueles sem diabetes (48,2%, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os parâmetros farmacocinéticos $AUC^{0-\infty}$, T_{max} , CL/F , CL_R e $T_{1/2}$ (Tabela 8).

A quantidade de GBP excretada na urina a cada intervalo de tempo, bem como a quantidade acumulada em função do tempo mostram participantes com diabetes não controlado apresentam uma menor taxa de excreção renal de GBP, em comparação com grupo Controle, apesar da excreção continuar sendo principalmente renal (Figura 19B e C). Em média, 48% da dose foram recuperados na urina após 36 horas no grupo Controle, 39% no grupo DC e 20% no grupo DNC (Tabelas 7 e 8, Figura 19D).

Apesar do efeito da hiperglicemia na disposição cinética da GBP, não houve diferença significativa na atenuação de dor comparando-se os tempos de coleta dos grupos Controle, DC e DNC (Figura 20A). A atenuação máxima de dor nos grupos Controle e DC foi de aproximadamente 40%, e no grupo DNC foi de aproximadamente 45% (Figura 20B).

Figura 19. Concentração plasmática e quantidade excretada na urina *versus* tempo nos grupos controle (n=10), DC (n=9) e DNC (n=10).



Fonte: próprio autor. A: concentração plasmática da GBP *versus* tempo. B: quantidade de GBP excretada na urina de forma inalterada (Ae) *versus* tempo. C; Ae acumulada *versus* tempo. D: Ae acumulada em porcentagem da dose *versus* tempo. Dados mostrados como média \pm desvio padrão (GraphPad Prism, versão 7.0). Em todos os grupos foi feito tratamento com administração de dose única de 300 mg de GBP. DC (diabetes controlado) - participantes com hemoglobina glicada < 8,0%; DNC (diabetes não controlado) - participantes com hemoglobina glicada > 8,0%.

Tabela 7 - Influência do diabetes nos parâmetros farmacocinéticos da GBP em pacientes com dor neuropática. Dados apresentados como média geométrica (coeficiente de variação geométrico); mediana (percentis 25 e 75).

Parâmetros	Controle (n=10)	Diabéticos (n=19)
AUC ^{0-∞} (µg.h/mL)	28,2 (46)	19,9 (65)
	27,3 (20,9 – 34,1)	20,2 (12,1 – 29,1)
C _{max} (µg/mL)	2,48 (32)	1,73 (47)*
	2,6 (1,9 – 3,2)	1,9 (1,4 – 2,1)
T _{max} (h)	3,3 (38)	2,6 (47)
	3,5 (2,5 – 4,0)	3,0 (2,0 – 4,0)
CL/F (L/h)	10,6 (46)	15,1 (65)
	11,0 (8,8 – 14,4)	14,8 (10,3 – 24,8)
Vd/F (L)	106,2 (40)	169,3 (58)*
	99,9 (80,3 – 141,4)	154,9 (119,4 – 259,9)
T _½ (h)	6,9 (35)	7,8 (67)
	7,0 (5,1 – 8,2)	7,3 (5,5 – 8,9)
CL _R (L/h)	5,12 (47)	4,2 (101)
	5,6 (4,6 – 5,9)	4,3 (2,3 – 6,3)
F _{el}	48,2 (22)	27,9 (101)*
	49,2 (40,4 – 57,5)	31,4 (19,6 – 42,3)

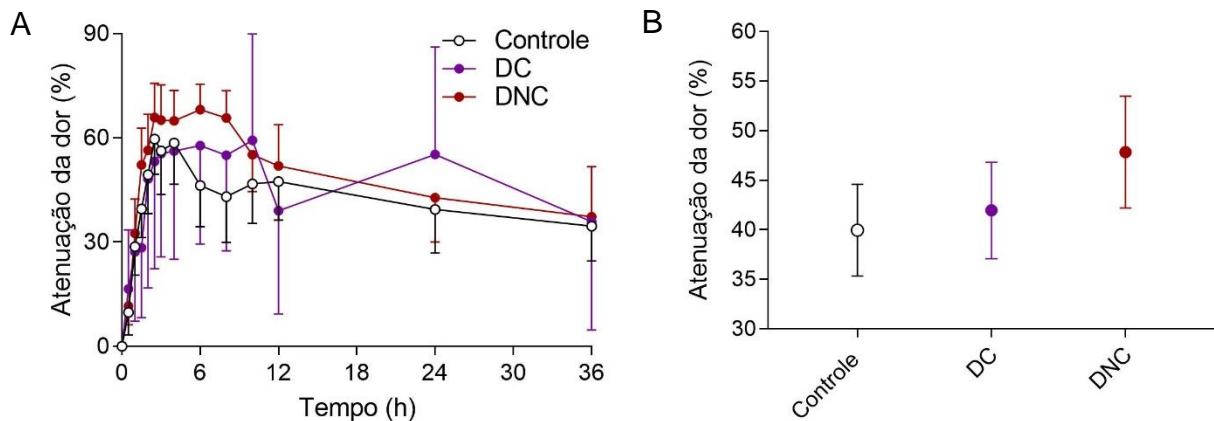
Fonte: próprio autor. Em todos os grupos foi feito tratamento com administração de dose única de 300 mg de GBP. *Teste Mann-Whitney para dados não pareados e não paramétricos, considerando nível de significância de 5%. AUC^{0-∞}: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar concentração plasmática máxima; CL/F: clearance total aparente; Vd/F: volume de distribuição aparente; T_½: meia-vida; CL_R: clearance renal; F_{el}: fração eliminada inalterada na urina.

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos da GBP nos Grupos Controle (n=10), DC (n=9) e DNC (n=10). Dados apresentados como média geométrica (coeficiente de variação geométrico); mediana (percentis 25 e 75).

Parâmetros	Controle (n=10)	DC (n=9)	DNC (n=10)
AUC ^{0-∞} (µg.h/mL)	28,2 (46)	21,8 (58)	18,3 (72)
C _{max} (µg/mL)	27,3 (20,9 – 34,1)	20,7 (14,9 – 31,3)	17,8 (10,7 – 28,5)
T _{max} (h)	2,48 (32)	1,86 (37)	1,6 (55) [#]
	2,6 (1,9 – 3,2)	1,9 (1,5 – 2,3)	1,9 (1,2 – 2,1)
	3,3 (38)	2,7 (37)	2,5 (58)
	3,5 (2,5 – 4,0)	3,0 (2,2 – 3,5)	2,7 (1,9 – 4,0)
CL/F (L/h)	10,6 (46)	13,7 (59)	16,3 (72)
	11,0 (8,8 – 14,4)	14,5 (9,6 – 20,8)	17,1 (10,5 – 28,1)
Vd/F (L)	106,2 (40)	159,3 (57)	178,8 (61) [#]
	99,9 (80,3 – 141,4)	144,3 (117,7 – 260,8)	180,9 (117,5 – 260,5)
T _½ (h)	6,9 (35)	8,0 (71)	7,6 (67)
	7,0 (5,1 – 8,2)	6,9 (5,8 – 8,7)	7,9 (5,2 – 10,7)
CL _R (L/h)	5,12 (47)	5,35 (90)	3,38 (102)
	5,6 (4,6 – 5,9)	6,0 (3,3 – 8,1)	4,0 (1,9 – 5,6)
F _{el}	48,2 (22)	39 (80)	20,7 (98) [*]
	49,2 (40,4 – 57,5)	32,9 (25,1 – 46,3)	20,9 (9,7 – 40,8)

Fonte: próprio autor. Em todos os grupos foi feito tratamento com administração de dose única de 300 mg de GBP. DC (diabetes controlado) - participantes com hemoglobina glicada < 8,0%; DNC (diabetes não controlado) - participantes com hemoglobina glicada > 8,0%. *Teste de Kruskal-Wallis (dados não pareados e não paramétricos) com nível de significância fixado a 5% (p=0,05). [#]Diferenças marginais – Teste de Kruskal-Wallis. AUC^{0-∞}: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar concentração plasmática máxima; CL/F: clearance total aparente; Vd/F: volume de distribuição aparente; T_½: meia-vida; CL_R: clearance renal; Fel: fração excretada inalterada na urina.

Figura 20. Atenuação da dor (%), comparando-se os grupos Controle, DC e DNC



Fonte: próprio autor. A: atenuação da dor em porcentagem *versus* tempo nos grupos Controle (n=10), diabetes controlado (DC, n=9) e diabetes não controlado (DNC, n=10). B: atenuação máxima da dor em porcentagem. Dados apresentados como média ± SEM. Em todos os grupos, Os participantes receberam tratamento com dose única de 300 mg de GBP. DC (diabetes controlado) - participantes com hemoglobina glicada < 8,0%; DNC (diabetes não controlado) - participantes com hemoglobina glicada > 8,0%.

4.4 Influência dos polimorfismos *SLC22A2* 808G>T e *SLC22A4* 1507C>T na disposição cinética da GBP

A frequência dos alelos variantes dos polimorfismos *SLC22A2* 808G>T (rs316019) e *SLC22A4* 1507C>T (rs1050152) foram de 0,12 e 0,39, respectivamente (APÊNDICE V). A distribuição dos genótipos dos SNPs avaliados seguiram o princípio do equilíbrio gênico de Hardy-Weinberg (Tabela 9).

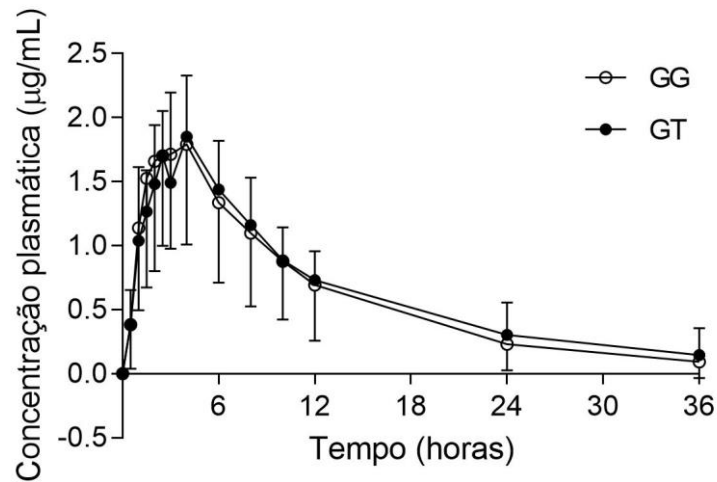
Tabela 9 - Frequência alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos *SLC22A2* 808G>T e *SLC22A4* 1507C>T

Polimorfismo	Frequência Genotípica (%)	Frequência Alélica (%)	n. participantes	Equilíbrio HW (valor de p)
808G>T	GG = 0,76	G = 0,88 T = 0,12	22	0,760
	GT = 0,24		7	
	TT = 0	0		
1507C>T	CC = 0,38	C = 0,60 T = 0,39	11	0,943
	CT = 0,45		13	
	TT = 0,17	5		

Fonte: próprio autor. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos 808G>T (A270S) e 1507C>T (L503F) nos participantes do estudo. n.: número; HW: Hardy-Weinberg. *O equilíbrio de HW foi avaliado pelo teste de Chi-quadrado. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

As figuras 21 e 22 mostram as curvas de concentração plasmática *versus* tempo da GBP em pacientes genotipados para os polimorfismos *SLC22A2* 808G>T e *SLC22A4* 1507C>T, respectivamente. Não foram observadas associações entre os polimorfismos *SLC22A2* 808G>T ou *SLC22A4* 1507C>T e os parâmetros farmacocinéticos da GBP na população investigada (Tabelas 10 e 11).

Figura 21. Efeito do polimorfismo genético *SLC22A2* 808G>T na concentração plasmática de GBP em pacientes com dor neuropática (n=29).



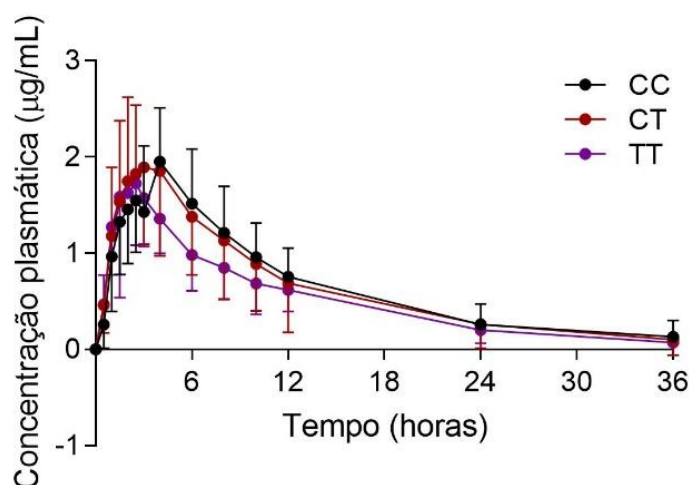
Fonte: próprio autor. Dados mostrados como média \pm desvio padrão (GraphPad Prism, versão 7.0). GG: participantes genotipados como homocigoto selvagem (n=22); GT: participantes genotipados como heterocigotos (n=7)

Tabela 10 - Efeito do polimorfismo genético *SLC22A2* 808G>T nos parâmetros farmacocinéticos da GBP. Dados apresentados como mediana, percentis 25 e 75% e valor de p para o teste Mann-Whitney para dados não pareados e não paramétricos.

Parâmetro	AUC ^{0-∞} (µg.h/mL)		C _{max} (µg/mL)		CL/F (L/h)		CL _R	
	GG	GT	GG	GT	GG	GT	GG	GT
Mediana	23,5	22,8	1,9	2,0	12,8	13,2	5,0	5,7
Percentil 25%	13,9	18,9	1,5	1,7	10,4	6,8	3,5	2,0
Percentil 75%	28,8	44,2	3,0	2,1	21,7	15,8	6,0	6,3
Valor de p	0,4383		0,8227		0,4383		0,8617	

Fonte: próprio autor. Polimorfismo 808G>T do gene *SLC22A2* que codifica o transportador OCT2. GG: homocigoto selvagem (n=22); GT: heterocigoto (n=7). Não houve diferença estatística entre os parâmetros comparando-se os genótipos.

Figura 22. Efeito do polimorfismo genético *SLC22A4* 1507C>T nas concentrações plasmáticas da GBP versus tempo em pacientes com dor neuropática (n=29).



Fonte: próprio autor. Concentração plasmática da GBP versus tempo. Dados mostrados como média \pm desvio padrão (GraphPad Prism, versão 7.0). CC: homozigoto selvagem (n=11); CT: heterozigoto (n=13); TT: homozigoto mutante (n=5).

Tabela 11 - Efeito do polimorfismo genético *SLC22A4* 1507C>T nos parâmetros farmacocinéticos da GBP. Dados apresentados como mediana, percentis 25 e 75% e valor de p para o teste Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

Parâmetro	AUC ^{0-∞} (µg.h/mL)			C _{max} (µg/mL)			CL/F (L/h)			CL _R		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Mediana	26	21,6	18,9	2,0	1,9	1,6	11,5	13,9	15,8	6,2	4,6	5,7
Percentil 25%	20,2	16,6	13,3	1,7	1,7	1,3	10,3	9,6	11,7	4,3	3,0	2,5
Percentil 75%	29,1	31,5	27,1	2,5	3,1	2,6	14,8	18,2	22,7	9,8	5,6	6,2
Valor de P	0,5476			0,5446			0,5476			0,3774		

Fonte: próprio autor. CC: homozigotos selvagem (n=11); CT: heterozigotos (n=13); TT: homozigotos mutantes (n=5). Não houve diferença estatística para os parâmetros farmacocinéticos entre os genótipos (Kruskal-Wallis: dados não pareados e não paramétricos).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho buscou caracterizar o papel dos transportadores de cátions orgânicos na farmacocinética e farmacodinâmica da GBP através de estudos *in vitro* usando células HEK e estudo clínico cruzado. A potencial interação CTZ x GBP foi sugerida para o estudo clínico, uma vez que a literatura descreve a CTZ como inibidor dos transportadores OCT2, MATE1 e MATE2-K (GIACOMINI *et al.*, 2010; TSUDA *et al.*, 2009; TSURUOKA *et al.*, 2006). Os resultados deste estudo sugerem que a GBP é substrato de hMATE1 e hOCTN1, enquanto CTZ inibe os transportadores OCTs e MATEs. Entretanto, os dados clínicos sugerem que a interação CTZ x GBP não ocorre a nível dos transportadores renais, visto que não houve alteração no clearance renal

da GBP neste estudo clínico. A coadministração de CTZ levou à redução na concentração plasmática de GBP, e aumento no clearance e no volume de distribuição e redução na atenuação da dor.

No estudo clínico, os participantes do grupo Controle tratados com dose única de 300 mg de GBP apenas (Fase 1) apresentaram valor médio de AUC de 28,2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Os valores encontrados são consistentes com os valores médios observados em voluntários sadios após a administração de GBP 300 mg, que variam de 23,26 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ a 24,60 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (GOA; SORKIN, 1993; TJANDRAWINATA *et al.*, 2014). Apenas Elwes e Binnie (1996) observaram concentrações plasmáticas mais baixas após a administração de GBP 300 mg, com AUC de 8,10 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Os valores médios de C_{max} e T_{max} foram de 2,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3,3 h, respectivamente, na Fase 1. Outros estudos após a administração de GBP 300 mg em voluntários sadios observaram C_{max} que variou de 2,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e valores de T_{max} que variaram de 2,0 h a 3,2 h (ELWES; BINNIE, 1996; GOA; SORKIN, 1993; MCLEAN, 1999; TJANDRAWINATA *et al.*, 2014). A média geométrica para CL/F de 10,6 L/h na Fase 1 é similar ao CL/F previamente observado em voluntários sadios com médias que variaram de 9,6 a 12,8 L/h após a administração de doses únicas de 300 a 600 mg de GBP (BLUM *et al.*, 1994; BOYD *et al.*, 1999; ELWES; BINNIE, 1996; TOH *et al.*, 2013). O CL_R de 5,12 L/h está dentro dos valores de CL_R observados em voluntários sadios após a administração de 300 a 600 mg de GBP, com médias que variaram de 4,6 a 8,24 L/h (BLUM *et al.*, 1994; BOYD *et al.*, 1999; ELWES; BINNIE, 1996; GOA; SORKIN, 1993; TOH *et al.*, 2013). A meia-vida de eliminação de 6,9 h encontrada nesse estudo está dentro dos valores de 4,9 a 9 h previamente relatados para voluntários sadios (ELWES; BINNIE, 1996; GOA; SORKIN, 1993; MCLEAN, 1999; TJANDRAWINATA *et al.*, 2014).

Neste trabalho, foi relatada pela primeira vez a afinidade *in vitro* da GBP pelos transportadores OCT1, OCT3 e MATEs. Baixas concentrações plasmáticas de GBP são suficientes para interação com hMATE1, hMATE2-K e OCTN1 com IC_{50} estimado em 0,18 ng/mL, 6,71 ng/mL e 0,36 ng/mL, respectivamente. Para a CTZ, os valores de IC_{50} de 99,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4,51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 36,94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62,22 ng/mL e 0,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram observados para os transportadores hOCT1, hOCT2, hOCT3, hMATE1 e hMATE2-K, respectivamente. Esses resultados mostram que a afinidade aparente de GBP é menor do que da CTZ para o hOCT2. Já a afinidade aparente da GBP pelos transportadores de efluxo hMATE1 e hMATE2-K é maior do que para CTZ. A afinidade

aparente de ambos GBP e CTZ é maior para os transportadores de efluxo hMATEs e hOCTN1 do que para os transportadores de influxo hOCTs. Ensaios realizados em células HEK expressando hOCTN2 mostram que esse transportador não está envolvido no transporte de GBP (GRIGAT *et al.*, 2009).

Até o momento, a literatura havia mostrado evidências do transporte renal da GBP via OCT2 e OCTN1 a partir de estudos *in vitro*. Ao contrário do observado por Feng *et al.* (2013), as concentrações intracelulares de GBP foram reduzidas em células que expressam hOCT2 cerca de 2,8 vezes em relação as células WT. A razão do transporte da GBP foi maior que 2 em células HEK que expressam hOCT2 em relação a células HEK que não expressam o transportador, o que indica que a GBP é substrato de OCT2 (FENG *et al.*, 2013). Tal observação sugere não apenas que hOCT2 não tem papel na captação de GBP, mas que a GBP tem uma afinidade para hOCT2 na configuração de efluxo. Apesar deste transportador normalmente atuar na configuração de influxo nos rins, o OCT2 pode mediar transportador bidirecional de acordo com o gradiente eletroquímico do substrato (CIARIMBOLI, 2008). No cérebro, é sugerido que hOCT2 regule a concentração de neurotransmissores monoamina, por agir em ambas as direções quando necessário (BUSCH *et al.*, 1998). A coincubação com TPA⁺ aumenta a concentração intracelular de GBP por 1,2 vezes, quando comparado com a incubação de GBP sozinha. Este achado confirma que a GBP é substrato para hOCT2 na configuração de efluxo, pelo menos nesse modelo *in vitro*, em que a captação celular é provavelmente mediada por difusão passiva e/ou outro sistema de transporte ainda não identificado.

Este estudo baseou-se na hipótese de que a CTZ iria reduzir a excreção renal da GBP mediada por transportadores renais, entre eles OCT2 (GIACOMINI *et al.*, 2010; TSURUOKA *et al.*, 2006), com consequente aumento nas concentrações plasmáticas da GBP. A CTZ parece ser substrato não apenas para hOCT2 (TSURUOKA *et al.*, 2006), mas também para hOCT3, uma vez que a concentração dentro das células é 1,18 e 1,4 vezes maior quando comparados com WT, respectivamente. A coincubação com TPA⁺ diminuiu significativamente a concentração de CTZ em células hOCT2 e hOCT3, o que confirma que esses transportadores são responsáveis pela captação de CTZ. hOCTN1 parece ser responsável pelo efluxo de CTZ, considerando que a concentração intracelular é 30% menor em células hOCTN1 do que em WT. Em tempo menor de incubação foi observada concentração de CTZ similar entre células hOCTN1 e WT, o que confirma

que CTZ é substrato de hOCTN1. Entretanto, a interação da CTZ com hOCT2 e hOCT3 não parece ser clinicamente relevante uma vez que as concentrações plasmáticas máximas de CTZ variam de 200-500 ng/mL em adultos recebendo 10 mg uma vez por dia (PITSIU *et al.*, 2004). Em outras palavras, a interação da CTZ com hOCT2 e hOCT3 ocorre apenas em concentrações mais elevadas do que aquelas observadas no plasma após doses terapêuticas. Apesar de não ser ter sido possível calcular o IC₅₀ para a inibição da captação de ASP⁺ pelo hOCTN1, a CTZ parece ter uma afinidade aparente com este transportador mesmo em baixas concentrações, o que sugere que a interação da CTZ com este transportador tem relevância clínica.

Os resultados apresentados no estudo in vivo não suportam a hipótese previamente formulada. A coadministração da CTZ reduziu a AUC da GBP em 27% e aumentou o clearance total aparente em 37%. Portanto, a interação farmacocinética entre GBP e CTZ não parece ser mediada por transportador renal de cátions orgânicos OCT2. Estudo experimental do grupo de pesquisa mostra que o inibidor de Oct2 cimetidina e o substrato de Oct2 metformina, não alteraram a disposição cinética da GBP em ratos (BENZL *et al.*, 2018). Após dose terapêutica única administrada por via oral, as concentrações plasmáticas máximas da GBP variaram de 2,22 a 6,13 µg/mL (BLUM *et al.*, 1994; BOYD *et al.*, 1999; CUNDY *et al.*, 2008; ELWES; BINNIE, 1996; GALITZ *et al.*, 2015; GIDAL *et al.*, 1996; GIDAL *et al.*, 2000; HOOPER *et al.*, 1991; KANG; CHO; LEE, 2007; MAK *et al.*, 2016; TJANDRAWINATA *et al.*, 2014). Em regimes de doses múltiplas, as concentrações plasmáticas podem variar de 6,9 a 11 µg/mL (BACKONJA; CANAFAX; CUNDY, 2011; GORDI *et al.*, 2008; MUSCAS *et al.*, 2000; SWEARINGEN *et al.*, 2018; YAMAMOTO *et al.*, 2019). Assim, podemos inferir que em doses terapêuticas, a GBP interage principalmente com MATE1 e OCTN1 (mesmo com dose única de 300 mg) enquanto a interação de GBP com hOCT2 não tem relevância para a farmacocinética clínica.

O gene que codifica o hOCT2 (*SLC22A2*) tem diversos SNPs descritos na literatura (CHOI; SONG, 2008; LEABMAN *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2008; ZAÏR *et al.*, 2008). Entre eles, o SNP 808G>T (A270S, rs316019) parece estar associado à redução da atividade do transportador (CHOI; SONG, 2008; LEABMAN *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2008). Esta variante leva à modificação de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 808 (808G>T) e é o SNP com maior frequência alélica no gene *SLC22A2* (CHOI; SONG, 2008). Muitos estudos mostram que o SNP 808G>T está associado à redução do transporte de metformina. Participantes GT e homozigotos

mutantes (TT) tiveram redução de 37,7% e 61,8% no clearance da metformina quando comparados com GG, respectivamente (SONG *et al.*, 2008). O clearance renal da metformina é reduzido em 26,1% nos participantes TT quando comparados com GG (WANG *et al.*, 2008). Foi observado aumento na AUC em GT ($6,24 \pm 1.07$ mg.h.L⁻¹) em relação aos GG (5.14 ± 1.46 mg.h.L⁻¹), devido à redução no clearance total aparente (84.1 L/h vs. 109.5 L/h) (YOON *et al.*, 2013).

Neste estudo, todos os participantes foram investigados para o polimorfismo *SLC22A2* 808G>T (A270S) e a frequência observada para o alelo variante (0,12) foi semelhante ao relatado para brasileiros (0,119) (*REFARGEN*). Os nossos resultados mostram que a presença do alelo mutante (T) não teve efeito sobre a concentração plasmática ou aos parâmetros farmacocinéticos da GBP, quando comparado com o homocigoto selvagem, o que nos sugere que a disposição cinética da GBP não é influenciada por esse polimorfismo. De maneira similar, o polimorfismo *SLC22A2* 808G>T não alterou a disposição cinética da GBP em pacientes tratados com doses múltiplas (YAMAMOTO *et al.*, 2019).

A GBP tem estrutura relacionada com a carnitina, um substrato do transportador de cátions orgânicos novo (OCTN1/2). O OCTN1 (codificado pelo gene *SLC22A4*) é expresso nos rins, intestino, músculo esquelético, placenta, próstata e coração (KOEPSELL *et al.*, 2004; MEIER *et al.*, 2007). Urban *et al.* (2008) caracterizaram a GBP como substrato de hOCTN1, uma vez que observaram aumento de 4 vezes na captação da GBP em células HEK que expressam hOCTN1 quando comparado com células que não expressam o transportador ($18,3 \pm 2,1$ pmol/min/mg de proteína vs. $4,6 \pm 0,6$ pmol/min/mg de proteína, respectivamente) (URBAN *et al.*, 2008). Os resultados desta tese revelaram que a excreção renal da GBP é dependente do transporte de efluxo mediado não apenas por hOCTN1, mas também por hMATE1, uma vez que a concentração nas células foi de 1,1 e 2,37 vezes menor em comparação com células WT, respectivamente. A incubação por tempos inferiores a 10 minutos mostrou concentração de GBP similar entre células hMATE1 ou hOCTN1 e WT, o que confirma que GBP é um substrato para ambos transportadores na configuração de efluxo.

A interação farmacocinética GBP x CTZ não pode ser explicada por interação com MATE1 expressos em células renais já que os valores de AUC mudaram na direção oposta ao esperado por inibir o transporte ativo de efluxo. Além de sua expressão nos rins, hMATE1 também é abundantemente expresso na membrana

apical dos hepatócitos e regula o transporte de cátions orgânicos para o canalículo biliar (CIARIMBOLI, 2016). Para alguns cátions orgânicos, como metformina, MATE1 pode ter um papel duplo tanto em distribuição para o fígado quanto excreção renal. A atividade reduzida de MATE1 pode não refletir concentrações plasmáticas alteradas significativamente, mas concentrações altas do fármaco no fígado (TZVETKOV; DALILA; FALTRACO, 2016). Entretanto, a secreção biliar não é uma via de eliminação importante para a GBP, assim como é para a metformina. Portanto, a possível inibição de hMATE1 nos hepatócitos por CTZ não iria afetar a farmacocinética da GBP.

Além da sua expressão nos rins, o transportador OCTN1 também está presente no intestino e é sugerido que esteja envolvido na absorção intestinal de metformina e GBP (FUTATSUGI *et al.*, 2016). A absorção de GBP é um processo saturável (STEWART *et al.*, 1993), e o OCTN1 pode ser um dos transportadores intestinais responsáveis por esse processo. Os nossos resultados sugerem que a CTZ é substrato de OCTN1 (Figura 14C e D). A possível inibição de OCTN1 nos enterócitos pela CTZ poderia explicar a redução da AUC e aumento do CL/F e de Vd/F da GBP observados *in vivo*, uma vez que as alterações nas concentrações plasmáticas foram observadas principalmente na fase da absorção (Figura 16A). Portanto, acredita-se que os processos saturáveis de absorção sejam o principal determinante de variabilidade na disposição cinética da GBP, alterando a biodisponibilidade do fármaco, visto que ambos clearance e volume de distribuição aparentes são dependentes da biodisponibilidade (FUTATSUGI *et al.*, 2016; STEWART *et al.*, 1993).

O impacto de polimorfismos genéticos do *SLC22A4* na captação *in vitro* da GBP (FUTATSUGI *et al.*, 2016; URBAN *et al.*, 2008) foi investigado em células HEK transfectadas com gene de OCTN1. A variante L503F, que leva à modificação de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 1507 (1507C>T), é um dos SNPs com maior frequência alélica dentre os SNPs encontrados no gene *SLC22A4*, que codifica do transportador (URBAN *et al.*, 2007). A captação de GBP em células HEK que expressam o transportador com o alelo mutante 1507C>T foi aproximadamente duas vezes menor, em comparação com células que expressam o transportador selvagem. Em voluntários sadios homozigotos mutantes para *SLC22A4* c.1507C>T o clearance renal da GBP encontrou-se reduzido quando comparados com homozigotos selvagens (URBAN *et al.*, 2008). Neste estudo, a frequência do alelo mutante (0,39) foi similar a encontrada na população brasileira (0,329) (REFARGEN). Entretanto, não foram encontradas associações entre o SNP *SLC22A4* c.1507C>T e a disposição

cinética da GBP, provavelmente em função do baixo número de participantes investigados e baixo poder estatístico.

Outros transportadores de fármacos podem estar envolvidos nessa interação farmacocinética, como os transportadores de ácido tipo L (LAT) 1/2 na absorção intestinal e passagem pela barreira hematoencefálica, transportador de peptídeo (PEPT) 1 na absorção intestinal e glicoproteína P (P-gp) também na absorção intestinal (ABBASI *et al.*, 2016; BOLGER; LUKACOVA; WOLTOSZ, 2009; CASCORBI, 2011; CROWE; TEOH, 2006; DEL AMO; URTTI; YLIPERTTULA, 2008; DICKENS *et al.*, 2013; FRAGA; PINHO; SOARES-DA-SILVA, 2005; FUTATSUGI *et al.*, 2016; GRIGAT *et al.*, 2009; HE; LIU; ZENG, 2010; KANG; CHO; LEE, 2007; KOEPESELL *et al.*, 2004; LÖSCHER, 2007; MEIER *et al.*, 2007; NGUYEN; SMITH; FLEISHER, 2006; PINEDA *et al.*, 1999; PRASAD *et al.*, 1999; SAABY; BRODIN, 2017; SHEN; HE; ZENG, 2007; URBAN *et al.*, 2008; YANAGIDA *et al.*, 2001). A GBP é um dos poucos substratos conhecidos de LAT1 e LAT2, o primeiro expresso no cérebro, placenta e tumores e o segundo expresso nos rins, cólon e intestino (DEL AMO; URTTI; YLIPERTTULA, 2008; FRAGA; PINHO; SOARES-DA-SILVA, 2005; PINEDA *et al.*, 1999; PRASAD *et al.*, 1999; YANAGIDA *et al.*, 2001). LAT1 é importante transportador de captação da GBP nas células endoteliais cerebrais (DICKENS *et al.*, 2013). LAT2 parece ser outro transportador relacionado à absorção saturável da GBP no intestino (BOLGER; LUKACOVA; WOLTOSZ, 2009). Sendo assim, a potencial inibição de LAT2 por CTZ explicaria a redução nas concentrações plasmáticas de GBP. Entretanto, não há dados na literatura de efeito da CTZ na atividade de LAT2.

Algumas evidências mostram que a captação intestinal de GBP exhibe inibição cruzada com substratos do sistema $b^{0,+}$, provavelmente em conjunto com PEPT1. O transportador de peptídeos regula a captação de dipeptídeos que quando hidrolisados fornecem as forças dirigentes para a captação da GBP pelo sistema $b^{0,+}$ (NGUYEN; SMITH; FLEISHER, 2006). A inibição do sistema $b^{0,+}$ ou do transportador PEPT1 poderia explicar a baixa exposição sistêmica à GBP na Fase 2, porém, até o momento não há dados na literatura sobre o potencial impacto da CTZ na atividade de ambos.

A GBP foi classificada como substrato fraco da P-gp, junto com outras drogas antiepilépticas (carbamazepina, fenobarbital, lamotrigina e topiramato) (CROWE; TEOH, 2006; LÖSCHER, 2007). A regulação da P-gp pela CTZ é estereoseletiva, visto que R-cetirizina aumenta e S-cetirizina reduz a expressão de P-gp (ABBASI *et al.*, 2016; HE; LIU; ZENG, 2010; SHEN; HE; ZENG, 2007). A P-gp é codificada pelo gene

ABCB1, expresso na maioria dos tecidos, incluindo a membrana apical do intestino, barreira hematoencefálica (BHE), túbulos renais e fígado (CASCORBI, 2011; SAABY; BRODIN, 2017). O impacto do polimorfismo da P-gp G2677T/A, associado com baixa expressão do transportador, não altera a farmacocinética da GBP em voluntários saudáveis, o que corrobora outros estudos que sugerem que a GBP é um substrato fraco de P-gp (KANG; CHO; LEE, 2007).

O efeito do diabetes e do controle glicêmico foi investigado uma vez que o diabetes altera a expressão e função de transportadores de cátions orgânicos em ratos com diabetes tipo 2 induzido experimentalmente, provavelmente devido ao acúmulo de produtos finais da glicação avançada e do estado inflamatório decorrente desse processo (NOWICKI *et al.*, 2008). Os participantes com diabetes mostraram redução significativa de C_{max} e aumento significativo de Vd/F em comparação ao grupo Controle (C_{max} : 1,73 vs. 2,48 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,0212$; Vd/F : 169,3 vs. 106,2 L, $p=0,0122$). As alterações do grupo diabético são atribuídas, aparentemente, ao aumento da glicemia, uma vez que as principais alterações foram encontradas entre o grupo Controle e o grupo DNC (C_{max} : 2,48 vs 1,6 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,0878$; Vd/F : 178,8 vs. 106,2 L, $p=0,0506$), e não houve alterações significativas ao comparar os grupos DC e Controle. A fração de GBP excretada inalterada na urina foi menor nos participantes com diabetes não controlado em relação aos participantes sem diabetes ($p=0,0045$, Tabela 8). Estes resultados contrastam com os resultados anteriores do grupo de pesquisa. Em modelo experimental induzido pela estreptozotocina em ratos, o diabetes resultou em aumento do clearance renal da GBP em ratos (BENZI *et al.*, 2018), sugerindo que os efeitos do diabetes na disposição cinética da GBP ocorreram por indução de hiperfiltração glomerular (PIHL *et al.*, 2012).

O efeito do controle glicêmico na farmacocinética clínica da GBP também pode ser explicado pela saturação dos processos de absorção. Em células de miócitos C2C12, a elevada concentração de glicose reduziu a expressão de LAT1 em 80%, comparado com células sem glicose (YAMAMOTO *et al.*, 2017). Não há dados na literatura sobre a influência do controle glicêmico em LAT2. O diabetes induzido experimentalmente por estreptozotocina em ratos Sprague-Dawley, reduziu a expressão do RNAm do transportador *pept1* e sua função, visto que houve redução na captação de glicilsarcosina, um substrato de *pept1*, de 15,9 $\mu\text{M cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ para 6,6 $\mu\text{M cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ nos ratos do grupo diabético em comparação com os ratos do grupo controle (BIKHAZI *et al.*, 2004). Portanto, acredita-se que as alterações observadas

no C_{max} , Vd/F e F_{el} sejam resultantes da biodisponibilidade reduzida da GBP pelo efeito da glicemia nos processos de transporte intestinais.

A influência do diabetes ou da hiperglicemia na função e expressão de outros transportadores de fármacos envolvidos na absorção intestinal (PEPT1 e P-gp) e no transporte pela BHE (LAT1) da GBP foi avaliada em estudos experimentais e *in vitro* (BIKHAZI *et al.*, 2004; NAWA *et al.*, 2012; PANDLEY; CHAUBE; BHAT, 2011; YAMAMOTO *et al.*, 2017). Alguns estudos mostram redução na expressão e/ou função de P-gp intestinal sob condições de diabetes. A expressão de P-gp foi reduzida em aproximadamente 40% no nono dia após a indução de diabetes por estreptozotocina em ratos ddY, quando comparados com o grupo controle (NAWA *et al.*, 2012). A hiperglicemia reduziu os níveis de P-gp em células MCF-7, levando à um aumento de aproximadamente o dobro na citotoxicidade de carboplatina e 5-fluorouracil, ambos substratos do transportador, nas linhagens celulares cultivadas em meio rico em glicose (PANDLEY; CHAUBE; BHAT, 2011). A redução da atividade de P-gp, LAT1 e PEPT1 pela hiperglicemia poderia explicar as alterações na disposição cinética da GBP no presente estudo.

Outros estudos mostraram a influência da hiperglicemia da cinética de fármacos. O diabetes não controlado reduziu em 50% a concentração plasmática máxima do metabólito (-)-M1 do tramadol, quando comparado com pacientes sem a doença (DE MORAES; LAURETTI; LANCHOTE, 2014). Valores aumentados de HbA1c estão associados com o risco de falha terapêutica da pirazinamida no tratamento da tuberculose (ALFARISI *et al.*, 2018). Neste estudo, não houve alteração nos parâmetros farmacocinéticos da GBP quando comparados os grupos Controle e DC, o que sugere que o controle dos níveis glicêmicos, seja pela aderência dos pacientes à farmacoterapia e/ou de mudanças de hábitos de vida (dieta e exercícios físicos), mantém a disposição cinética da GBP em níveis similares à de pacientes sem a doença. Além dos benefícios relacionados as comorbidades do diabetes e qualidade de vida dos pacientes, nossos resultados sugerem que o controle dos níveis glicêmicos também é relevante para reduzir a variabilidade na resposta a fármacos usados no tratamento de doenças crônicas.

Este estudo tem algumas limitações. Os participantes não foram genotipados para os principais polimorfismos de MATE1 e MATE2-K. As variantes G64D (rs77630697), L125F (rs77474263), V338I (rs35790011), V480M (rs76645859) e C497S (rs35395280) do gene *SLC47A1*, que codifica do MATE1, estão associados a

redução da atividade do transportador (CHEN *et al.*, 2009). Entretanto, esses polimorfismos são raros, com frequência alélica menor que 1% em europeus (*1000 Genomes*). No gene que codifica do MATE2-K, *SLC47A2K*, as variantes P162L (rs146901447), G393R (rs34399035) e G211V (rs562968062) levaram à redução no transporte de ¹⁴C-TEA em células HEK (CHOI *et al.*, 2011; KAJIWARA *et al.*, 2009). A variante de região promotora *SLC47A2K* -130G>A (rs12943590), por outro lado, está relacionada com aumento na eliminação de metformina (CHOI *et al.*, 2011). Com exceção da variante *SLC47A2K* -130G>A, que tem uma frequência alélica de 27,3% em europeus, os outros polimorfismos são raros, com frequência alélica menor que 1% em europeus (*1000 Genomes*). Até o momento, não há dados de frequência alélica para os polimorfismos de *SLC47A1* e *SLC47A2K* na população brasileira. Outra limitação é que o tamanho amostral definido para este estudo de disposição cinética não resulta em poder estatístico suficiente para avaliar a influência de polimorfismos genéticos. Além disso, a escala de dor utilizada para obter os dados da atenuação de dor é uma variável subjetiva e de grande variabilidade. O tamanho amostral definido para este estudo foi baseado em estudo prévio que investigou a disposição cinética da GBP, sem levar em conta a variabilidade na farmacodinâmica. Apesar da caracterização detalhada do transporte em células renais, não foi realizado estudo com transportadores envolvidos na disposição cinética e na farmacodinâmica da GBP, principalmente aqueles que parecem limitar a absorção intestinal do fármaco.

Esse estudo acrescenta informações importantes para a farmacologia clínica da GBP, uma vez que foram descritos os mecanismos de transporte em células renais para transportadores ainda não caracterizados previamente. Além disso, o estudo caracterizou a influência da CTZ na farmacocinética e na farmacodinâmica da GBP, sugerindo que esta interação é mediada por saturação dos processos de absorção. O controle glicêmico também implicou em redução da exposição da GBP, entretanto sem alteração na atenuação da dor neuropática. No contexto da medicina de precisão, estratégias poderão ser elaboradas para minimizar o efeito das interações fármaco-fármaco ou fármaco-doença aqui descritas.

6. CONCLUSÕES

- A GBP é um substrato para hOCT2, predominantemente na configuração de efluxo, para hMATE1 e para hOCTN1; entretanto a interação com hOCT2 não é relevante para a farmacologia clínica. A afinidade aparente da GBP é baixa para hOCT2 e as concentrações plasmáticas máximas foram aproximadamente 80 vezes menores que os IC_{50} . A CTZ é um inibidor dos transportadores hOCT1, hOCT2, hOCT3, hMATE1 e hMATE2-K, e substrato para hOCT2, hOCT3 e hOCTN1. GBP e CTZ mostraram afinidade aparente alta para hOCTN1 em concentrações terapêuticas.

- Após 5 dias de tratamento com CTZ, os participantes mostraram redução em AUC, C_{max} e F_{el} , e aumento de CL/F e Vd/F quando comparados com participantes tratados apenas com GBP. Não foram observadas diferenças em termos de T_{max} , $T_{1/2}$ e CL_R . A atenuação de dor nos participantes também se encontra reduzida, principalmente na fase da absorção do fármaco. A interação CTZ x GBP em pacientes com dor neuropática não pode ser explicada por mecanismos de excreção renal mediado por transportadores. As alterações sugerem que a CTZ reduz a biodisponibilidade da GBP via interação com transportadores associados com o processo de absorção intestinal.

- O diabetes tipo 2 resultou em redução de C_{max} e F_{el} da GBP e aumento do Vd/F em participantes com dor neuropática. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros farmacocinéticos AUC, CL/F, CL_R e também não houve alteração significativa na atenuação de dor. Os resultados sugerem que a hiperglicemia reduz biodisponibilidade do fármaco por alterar a atividade de transportadores ativos relacionados ao processo de absorção intestinal da GBP. O controle dos níveis glicêmicos no diabetes mantém a variabilidade cinética da GBP ao ser comparada a indivíduos não diabéticos, de modo que os parâmetros farmacocinéticos da GBP nos pacientes com diabetes e níveis glicêmicos controlados são similares aos parâmetros farmacocinéticos observados para os pacientes sem diabetes.

7. REFERÊNCIAS

1000 Genomes Project Phase 3. Variants: rs316019; rs1050152. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

ABBASI, M. M. *et al.* The Effects of Cetirizine on P-glycoprotein Expression and Function In Vitro and In situ. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 111-118, 2016.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde: Resolução RDC n° 27 de 17 de maio de 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde: Resolução RDC n° 6, de 18 de fevereiro de 2014. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS n° 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. Diário Oficial da União, seção 1, p.68-73, fev 2014.

AIRAGHI, L.; LORINI, M.; TEDESCHI, A. The insulin analogue aspart: a safe alternative in insulin allergy. **Diabetes Care**, v. 24, n. 11, p. 2000, 2001.

ALFARISI, O. *et al.* Effect of Diabetes Mellitus on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tuberculosis Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e01383-18, 2018.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2019. **Diabetes Care**, v. 42, p. S13-28, 2019a.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes – 2019. **Diabetes Care**, v. 42, p. S61-70, 2019b.

BACH, M. *et al.* Fast set-up of doxycycline-inducible protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein–Barr virus replication and the simple tetracycline repressor. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 783-790, 2007.

BACKONJA, M. *et al.* Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 280, n. 21, p. 1831-1836, 1998.

BACKONJA, M. M.; CANAFAX, D. M.; CUNDY, K. C. Efficacy of Gabapentin Enacarbil vs Placebo in Patients with Postherpetic Neuralgia and a Pharmacokinetic Comparison with Oral Gabapentin. **Pain Medicine**, v. 12, p. 1098-1108, 2011.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BENEDETTI, M. S. *et al.* Absorption, distribution, metabolism and excretion of [14C] levocetirizine, the R enantiomer of cetirizine, in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 571-582, 2001.

BENZI, J. R. L. *et al.* The role of organic cation transporter 2 inhibitor cimetidine, experimental diabetes mellitus and metformin on gabapentin pharmacokinetics in rats. **Life Sciences**, v. 200, p. 63-68, 2018.

BIKHAZI, A. B. *et al.*, Effect of Diabetes Mellitus and Insulin on the Regulation of the PepT 1 Symporter in Rat Jejunum. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 4, p. 300-308, 2004.

BLUM, R. A. *et al.* Pharmacokinetics of gabapentin in subjects with various degrees of renal function. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 56, n. 2, p. 154-159, 1994.

BOCKBRADER, H. N. *et al.* A Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pregabalin and Gabapentin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 10, p. 661-669, 2010.

BOLGER, M.; LUKACOVA, V.; WOLTOSZ, W. S. Simulations of the Nonlinear Dose Dependence for Substrate of Influx and Efflux Transporters in the Human Intestine. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 2, p. 353-353, 2009.

BOYD, R. A. *et al.* Effects of age and gender on single-dose pharmacokinetics of gabapentin. **Epilepsia**, v. 40, n. 4, p. 474-479, 1999.

BUSCH, A. E. *et al.* Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 32599-32604, 1996.

BUSCH, A. E. *et al.* Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine and memantine. **Molecular Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 342-352, 1998.

CALLAGHAN, B. C. *et al.* Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 6, p. 521-534, 2012.

CASCORBI, I. P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates and Functional Consequences of Genetic Variations. *In*: FROOM, M. F.; KIM, R. B. (eds). Drug Transporters, Handbook of Experimental Pharmacology. **Springer Verlag Heidelberg**; 2011. p. 261-83.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Diabetes Statistics Report, 2017. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services; 2017.

CHAVES, F.R.; ROMALDINI, J.H. Diabetes mellitus tipo 2. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, n. 12, p. 83-90, 2002.

CHEN, Y., *et al.* Genetic variants in multidrug and toxin compound extrusion-1, hMATE1, alter transport function. **Pharmacogenomics Journal**, v. 9, n. 2, p. 127-136, 2009.

CHEN, C.; COWLES, V. E.; SWEENEY, M. The intestinal absorption mechanism of gabapentin makes it appropriate for gastroretentive delivery. **Current Clinical Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 67-72, 2013.

CHENG, P.Y.; MORGAN, E.T. Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. **Current Drug Metabolism**, v.2, p.165-183, 2001.

CHOI, M-K.; SONG, I-S. Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 4, p. 243-253, 2008.

CHOI, J. H., *et al.* A common 5'-UTR variant in MATE2-K is associated with poor response to metformin. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, n. 5, p. 674-684, 2011.

CHU, X., *et al.* Clinical Probes and Endogenous Biomarkers as Substrates for Transporter Drug-Drug Interaction Evaluation: Perspectives from the International Transporter Consortium. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 104, n. 5, p. 836-864, 2018.

CIARIMBOLI, G. Organic cation transporters. **Xenobiotica**, v. 38, n. 7-8, p. 936-971, 2008.

CIARIMBOLI, G. Introduction to the cellular transport of organic cations. *In*: CIARIMBOLI, G.; GAUTRON, S.; SCHLATTER, E. (eds). Organic Cation Transporters: Integration of Physiology, Pathology and Pharmacology. **Springer Cham**; 2016. p. 1-47.

CIARIMBOLI, G.; SCHLATTER, E. Regulation of organic cation transport. **Pflügers Archive**, v. 449, n. 5, p. 423-441, 2005.

CIARIMBOLI, G.; SCHLATTER, E. Organic cation transport measurements using fluorescence techniques. *In*: BÖNISCH, H.; SITTE, H. H. (eds). Neurotransmitter Transporters: Investigative Methods. **Humana Press**; 2016. p.173-188.

CLIVATTI, J.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M. Revisão sobre o Uso de Gabapentina para Controle da Dor Pós-Operatória. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 59, n. 1, p. 87-98, 2009.

COLLOCA, L. *et al.* Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17002, 2017. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA (CFF). Diabetes não tem cara. Faça o teste. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/Apresentacao%20Campanha%20DM%20FINAL.pdf>>. Acesso em: 12 de jun. 2019.

CROWE, A.; TEOH, Y-K. Limited P-glycoprotein mediated efflux for anti-epileptic drugs. **Journal of Drug Targeting**, v. 14, p. 291-300, 2006.

CURRAN, M.P.; SCOTT, L.J.; PERRY, C.M. Cetirizine. **Drugs**, v. 64, n. 5, p. 523-561, 2004.

DANGPRAPAI, Y.; WRIGHT, S. H. Interaction of H⁺ with the extracellular and intracellular aspects of hMATE1. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 301, n. 3, p. F5208, 2011.

DEFRONZO, R.A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, n. 4, p. 281-303, 1999.

DE MORAES, N. V.; LAURETTI, G. R.; LANCHOTE, V. L. Effects of type 1 and type 2 diabetes on the pharmacokinetics of tramadol enantiomers in patients with neuropathic pain phenotyped as cytochrome P450 2D6 extensive metabolizers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1222-1230, 2014.

DEL AMO, E. M.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 161-174, 2008.

DICKENS, D. *et al.* Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 1672-1683, 2013.

DONG, Z.G. *et al.* Mechanism of induction of cytochrome P-450ac (P-450j) in chemically induced and spontaneously diabetic rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, p. 29-35, 1988.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA, M. Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, p. 481-499, 2012.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. PS power and sample size program available for free on the Internet. **Controlled Clinical Trials**, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.

DURAND-GONZALEZ, K-N. *et al.* Glargine insulin is not an alternative in insulin allergy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2216, 2003.

ELWES, R. D. C; BINNIE, C. Clinical pharmacokinetics of newer antiepileptics drugs: lamotrigine, vigabatrin, gabapentin and oxcarbamazepine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 30, p. 403-415, 1996.

FAVREAU, L.V.; SCHENKMAN, J.B. Cytochrome P-450 alterations in the BB/Wor spontaneously diabetic rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 3505-3509, 1988.

FENG, B. *et al.* Quantitative prediction of renal transporter-mediated clinical drug interaction. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 11, p. 4207-4215, 2013.

FERNÁNDEZ, L. *et al.* Allergy to human insulin. **Allergy**, v. 58, p. 1317, 2003.

FINNERUP, N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162-173, 2015.

FRAGA, S.; PINHO, M. J.; SOARES-DA-SILVA, P. Expression of LAT1 and LAT2 amino acid transporters in human and rat intestinal epithelial cells. **Amino Acids**, v. 29, p. 229-233, 2005.

FUTATSUGI, A. *et al.* L503F variant of carnitine/organic cation transporter 1 efficiently transports metformin and other biguanides. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1160-1169, 2016.

GEBER, C. *et al.* Revised definition of neuropathic pain and its grading system: an open case series illustrating its use in clinical practice. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 10, p. S3-12, 2009.

GHAZAVI, M. K.; JOHNSTON, G. A. Insulin allergy. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 300-305, 2011.

GIACOMINI, K. M. *et al.* Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215-236, 2010.

GIACOMINI, K. M.; HUANG, S-M. Transporters in Drug Development and Clinical Pharmacology. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 94, n. 1, p. 3-9, 2013.

GOA, K. L.; SORKIN, E. M. Gabapentin: A review of its pharmacological properties and clinical potential in epilepsy. **Drugs**, v. 46, p. 409-427, 1993.

GOLDBERG, D. M.; MARTIN, J. V. Role of gamma-glutamyl transpeptidase activity in diagnosis of hepatobiliary disease. **Digestion**, v. 12, n. 4-6, p. 232-246, 1975.

GORDI, T. *et al.* Pharmacokinetics of Gabapentin After a Single Day and at Steady State Following the Administration of Gastric-Retentive–Extended-Release and Immediate-Release Tablets: A Randomized, Open-Label, Multiple-Dose, Three-Way Crossover, Exploratory Study in Healthy Subjects. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 910-916, 2008.

GRIGAT, S. *et al.* The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, p. 330-337, 2009.

GRÜNDEMANN, D. *et al.* Drug excretion mediated by a new prototype os polyspecific transporter. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 549-552, 1994.

HARRACH, S.; CIARIMBOLI, G. Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 85, 2015.

HAWKINS, B. T. *et al.* Decreased blood-brain barrier permeability to fluorescein in streptozotocin-treated rats. **Neuroscience Letters**, v. 411, n. 1, p. 1-5, 2007.

HE, Y.; LIU, Y.; ZENG, S. Stereoselective and Multiple Carrier-Mediated Transport of Cetirizine Across Caco-2 Cell Monolayers with Potential Drug Interaction. **Chirality**, v. 22, p. 684-692, 2010.

HEINZERLING, L. *et al.* Insulin allergy: clinical manifestations and management strategies. **Allergy**, v. 63, p. 148-155, 2008.

HUCKE, A. *et al.* Interaction of the new monofunctional anticancer agent Phenanthriplatin with transporters for organic cations. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 180, 2018. doi: 10.3389/fchem.2018.00180.

IBER, R. *et al.* Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting and inflammation. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 174-180, 2001.

IIDA, M. *et al.* Evaluation of gut motility in type II diabetes by the radiopaque marker method. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 4, p. 381-385, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 8th Edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

JIXIONG, X. *et al.* The human insulin analogue aspart can induce insulin allergy. **Diabetes Care**, v. 27, n. 8, p. 2084-2085, 2004.

KAJIWARA, M., *et al.* Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. **Journal of Human Genetics**, v. 54, n. 1, p. 40-46, 2009.

KAMERMAN, P. R. *et al.* Gabapentin for neuropathic pain: An application to the 21st meeting of the WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines for the inclusion of gabapentin on the WHO Model List of Essential Medicines. DOI 10.6084/m9.figshare.3814206.v2, 2016.

KANG, H-A.; CHO, H-Y.; LEE, Y-B. The Effect of MDR1 G2677T/A Polymorphism on Pharmacokinetics of Gabapentin in Healthy Korean Subjects. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 96-101, 2007.

KEKUDA, R. *et al.* Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 15971-15979, 1998.

KOEPSSELL H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 375-381, 2004.

KOEPSSELL, H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2, p. 413-435, 2013.

LAHIRI, D. K; NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 9, p. 5444, 1991.

LAL, R. *et al.* Clinical pharmacokinetic drug interaction studies of gabapentin enacarbil, a novel transported prodrug of gabapentin, with naproxen and cimetidine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 5, p. 498-507, 2010.

LEABMAN, M. K. *et al.* Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 12, n. 5, p. 395-405, 2002.

LEE, W. K. *et al.* Organic cation transporters OCT1, 2 and 3 mediate high-affinity transport of the mutagenic vital dye ethidium in the kidney proximal tubule. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 296, p. F1504-1513, 2009.

LEVEY, A. S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, p. 604-612, 2009.

LIPP, R. W. *et al.* Evidence of accelerated gastric emptying in longstanding diabetic patients after ingestion of a semisolid meal. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 38, p. 814-818, 1997.

LÖSCHER W. Drug Transporters in the Epileptic Brain. **Epilepsia**, v. 48, p. 8-13, 2007.

MAK, W. Y. *et al.* Pharmacokinetic Comparison of Two Gabapentin Formulations in Healthy Volunteers. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**, v. 8, n. 2, p. 55-58, 2016.

MARCOLIN, M. A.; TATSCH, M. F. Gabapentina: farmacologia, uso clínico e interações farmacológicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 27, n. 4, p. 237-43, 2000.

MASON, B. J.; QUELLO, S.; SHADAN, F. Gabapentin for the treatment of alcohol use disorder. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 27, n. 1, p. 113-24, 2018.

MATLOCK, B. Assessment of nucleic acid purity. Nota técnica 52646. Wilmington, EUA: Thermo Fisher Scientific, 2015.

MCLEAN, M. J. Clinical pharmacokinetics of gabapentin. **Neurology**, v. 44, n. 6, p. S17-22; discussion S31-2, 1994.

MCLEAN, M. J. Gabapentin in the management of convulsive disorders. **Epilepsia**, v. 40, p. S39-S50, 1999.

MEHRENS, T. *et al.* The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 7, p. 1216-1224, 2000.

MEHTA, A. R. Why does the plasma urea concentration increase in acute dehydration? **Advances in Physiology Education**, v. 32, n. 4, p. 336, 2008.

MEIER, Y. *et al.* Regional Distribution of Solute Carrier mRNA Expressing Along the Human Intestinal Tract. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, p. 590-594, 2007.

MELTZER, E. O.; WEILER, J. M.; WIDLITZ, M. D. Comparative outdoor study of the efficacy, onset and duration of action, and safety of cetirizine, loratadine, and placebo for seasonal allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 2, p. 617-626, 1996.

MORRISSEY, K. M. *et al.* Renal transporters in drug development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 503-529, 2013.

MUSCAS, G. C. *et al.* Conversions from thrice daily to twice daily administration of gabapentin (GBP) in partial epilepsy: analysis of clinical efficacy and plasma levels. **Seizure**, v. 9, p. 47-50, 2000.

NÄF, S. *et al.* Continuous subcutaneous insulin infusion to resolve an allergy to human insulin. **Diabetes Care**, v. 25, n. 3, p. 634-635, 2002.

NAWA, A. *et al.* Altered intestinal P-glycoprotein expression levels affect pharmacodynamics under diabetic condition. **Yakugaku Zasshi**, v. 132, n. 2, p. 161-166, 2012.

NIES, A. T. *et al.* Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *In*: FROMM, M. F.; KIM, R. B. (eds). **Drug Transporters**. Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 105-67.

NOWICKI, M. T. *et al.* Renal and hepatic transporter expression in type 2 diabetic rats. **Drug Metabolism Letters**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2008.

NGUYEN, T. V.; SMITH, D. E.; FLEISHER, D. PEPT1 Enhances the Uptake of Gabapentin via Trans-Stimulation of b₀,+ Exchange. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 353-360, 2006.

OHASHI, R. *et al.* Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 358-366, 2001.

OTSUKA, M. *et al.* A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 17923-17928, 2005.

PANDLEY, V.; CHAUBE, B.; BHAT, M. J. Hyperglycemia Regulates MDR-1, Drug Accumulation and ROS Levels Causing Increased Toxicity of Carboplatin and 5-Fluorouracil in MCF-7 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, p. 2942-2952, 2011.

PANDYA, N. J.; MULLAPUDI, S. Geometric statistics in PK-analysis – Programmer's perspective. NESUG 2011, Pharma & Healthcare. Disponível em: <<https://www.lexjansen.com/nesug/nesug11/ph/ph10.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2019.

PARK, J. *et al.* Validated LC-MS/MS method for quantification of gabapentin in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 8, p. 829-835, 2007.

PELTEKOVA, V. D. *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. **Nature Genetics**, v. 36, n. 5, p. 471-475, 2004.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE (PNS). Percepção do Estado de Saúde, Estilos de Vida e Doenças Crônicas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação, 2014. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2014.

PIHL, L. *et al.* Insulin induces the correlation between renal blood flow and glomerular filtration rate in diabetes: implications for mechanisms causing hyperfiltration. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, n. 1, p. R39-47, 2012.

PINEDA, M. *et al.* Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-express with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transporter activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 19738-19744, 1999.

POWELL, J. R.; GOBBURU, J. V. Pharmacometrics at FDA: evolution and impact on decisions. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n.1, p. 97-102, 2007.

PRASAD, P. D. *et al.* Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, p. 283-288, 1999.

PRATT, D. D.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1266-1271, 2000.

PRESTON, R.A.; EPSTEIN, M. Effects of diabetes on cardiovascular drug metabolism. **Diabetes Care**, v. 22, p. 982-988, 1999.

PRESTON, R.A. *et al.* Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine in hypertensive patients with and without type II diabetes mellitus. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 1215-1224, 2001.

QIAN, C. *et al.* High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136390, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136390.

RADERMECKER, R.P.; SCHEEN, A.J. Allergy reactions to insulin: effects of continuous subcutaneous insulin infusion and insulin analogues. **Diabetes/metabolism research and review**, v. 23, n. 5, p. 348-355, 2007.

RAOUF, M. *et al.* Rational dosing of gabapentin and pregabalin in chronic kidney disease. **Journal of Pain Research**, v. 10, p. 275-278, 2017.

REED, M. J. *et al.* A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000.

REFARGEN – Rede Nacional de Farmacogenética: Projeto REFARGEN-PGENI. Disponível em: <www.refargen.org.br/IMG/pdf/doc-3.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2016 e 10 mai. 2018.

SAABY, L.; BRODIN, B. A Critical View on In Vitro Analysis of P-glycoprotein (P-gp) Transport Kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 2257-2264, 2017.

SÁNCHEZ-VALIENTE, S. Tratamiento del dolor neuropático con gabapentina. **Revista de Neurología**, v. 26, p. 618-620, 1998.

SCHENKMAN, J.B. Induction of diabetes and evolution of diabetic state on P450 expression. **Methods in Enzymology**, v. 206, p. 325-333, 1991.

SCHMIDT-LAUBER, C. *et al.* Transport mechanisms and their pathology-induced regulation govern tyrosine kinase inhibitor delivery in rheumatoid arthritis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52247, 2012.

SERPELL, M. G. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 557-566, 2002.

SHEN, S.; HE, Y.; ZENG, S. Stereoselective Regulation of MDR1 Expression in Caco-2 Cells by Cetirizine Enantiomers. **Chirality**, v. 19, p. 485-490, 2007.

SINGH, R.; KISHORE, L.; KAUR, N. Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions. **Pharmacological Research**, v. 80, p. 21-35, 2014.

SOLA-GAZAGNES, A. *et al.* Successful treatment of insulin allergy in a type 1 diabetic patient by means of constant subcutaneous pump infusion of insulin. **Diabetes Care**, v. 26, n. 10, 2003.

SONG, I. S. *et al.* Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, n. 5, p. 559-562, 2008.

SPILLER, H. A. *et al.* Retrospective evaluation of cetirizine (zyrtec) ingestion. Journal of toxicology. **Clinical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 525-526, 2001.

STEWART, B. H. *et al.* A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 276-281, 1993.

STROLIN BENEDETTI, M. *et al.* Stereoselective renal tubular secretion of levocetirizine and dextrocetirizine, the two enantiomers of the H1-antihistamine cetirizine. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 19-23, 2008.

SWEARINGEN, D. *et al.* Pharmacokinetics of immediate release, extended release, and gastric retentive gabapentin formulations in healthy adults. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 56, n. 5, p. 231-238, 2018.

TAHARA, H. *et al.* Functional genetic variation in the basal promoter of the organic cation/carnitine transporters OCTN1 (*SLC22A4*) and OCTN2 (*SLC22A5*). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, n. 1, p. 262-271, 2009.

TAMAI, I. *et al.* Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. **FEBS Letters**, v. 419, n. 1, p. 107-111, 1997.

TJANDRAWINATA, R. R. *et al.* Single dose pharmacokinetic equivalent study of two gabapentin preparation in healthy subjects. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1249-1255, 2014.

TOH, D. S. L. *et al.* Effect of mushroom diet on pharmacokinetics of gabapentin in healthy Chinese subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, p. 129-134, 2013.

TRAYNOR, J. *et al.* How to measure renal function in clinical practice. **The BMJ**, v. 333, p. 733-737, 2006.

TREEDE, R. D. *et al.* Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, n. 18, p. 1630-1635, 2008.

TSUDA, M. *et al.* Involvement of Human Multidrug and Toxin Extrusion 1 in the Drug Interaction between Cimetidine and Metformin in Renal Epithelial Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, n. 1, p. 185-191, 2009.

TSURUOKA, S. *et al.* Severe arrhythmia as a result of the interaction of cetirizine and pilsicainide in a patient with renal insufficiency: first case presentation showing competition for excretion via renal multidrug resistance protein 1 and organic cation transporter 2. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 4, p. 389-396, 2006.

TZVETKOV, M. A.; DALILA, N.; FALTRACO, F. Genetic variability in organic cation transporters: pathophysiological manifestations and consequences for drug pharmacokinetics and efficacy. *In*: CIARIMBOLI, G.; GAUTRON, S.; SCHLATTER, E. (eds). Organic Cation Transporters: Integration of Physiology, Pathology and Pharmacology. **Springer Cham**; 2016. p. 93-137.

URBAN, T. J. *et al.* Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (*SLC22A4*). **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 17, n. 9, p. 773-782, 2007.

URBAN, T. J. *et al.* Effects of Genetic Variation in the Novel Organic Cation Transporter, OCTN1, on the Renal Clearance of Gabapentin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p. 416-421, 2008.

VINIK, A. I. *et al.* Diabetic neuropathy. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, v. 43, p. 747-787, 2013.

WANG, Z-J. *et al.* OCT2 polymorphisms and in vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 7, p. 637-645, 2008.

WILDE, S. *et al.* Calmodulin-associated post-translational regulation of rat organic cation transporter 2 in the kidney is gender dependent. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 10, p. 1729-40, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Report on Diabetes, 2016. Geneva: World Health Organization, 2016.

WU, X. *et al.* cDNA sequence, Transport Function, and Genomic Organization of Human OCTN2, a New Member of the Organic Cation Transporter Family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, n. 3, p. 589-595, 1998.

XU, Y. *et al.* Combinatorial Pharmacophore Modeling of Organic Cation Transporter 2 (OCT2) Inhibitors: Insights into Multiple Inhibitory Mechanisms. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 12, p. 4611-4619, 2013.

YAGI, T. *et al.* Impact of concomitant antacid administration on gabapentin plasma exposure and oral bioavailability in healthy adult subjects. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, p. 248-254, 2012.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Glucose-mediated inactivation of AMP-activated protein kinase reduces the levels of L-type amino acid transporter 1 mRNA in C2C12 cells. **Nutrition Research**, v. 47, p. 13-40, 2017.

YAMAMOTO, P. A. Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor crônica. 2018, 134 f., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio e Mesquita Filho”, 2018.

YAMAMOTO, P. A. *et al.* Pharmacogenetics-based population pharmacokinetic analysis of gabapentin in patients with chronic pain: Effect of OCT2 and OCTN1 gene polymorphisms. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 124, p. 266-272, 2019.

YANAGIDA, O. *et al.* Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1514, p. 291-302, 2001.

YAMAZOE, Y. *et al.* Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 268, p. 567-575, 1989.

YOON, H. *et al.* Influences of organic cation transporter polymorphisms on the population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects. **The AAPS Journal**, v. 15, n. 2, p.571-580, 2013.

YOUNG, M. J. *et al.* A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. **Diabetologia**, v. 36, n. 2, p. 150-154, 1993.

ZAÏR, Z. M. *et al.* Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 5, p. 597-624, 2008.

ZHANG, Y. *et al.* PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 99, p. 306-314, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os participantes do grupo Controle

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

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cetirizina e do diabetes tipo 2 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor neuropática

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Ana Carolina Conchon Costa (FCFRP-USP), Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes (FCFAR-UNESP).

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Profª. Drª. Gabriela Rocha Lauretti (FMRP-USP).

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP-USP) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara-UNESP (FCFAR-UNESP).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em ___/___/___ fui convidado e concordei voluntariamente em participar, como paciente do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes pelo responsável da pesquisa que:

O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir. Para participar do estudo serei internado durante 36 horas em cada fase do estudo, num total de 2 fases, o que não ocorreria se eu não aceitasse participar como voluntário. Durante o período da internação receberei as refeições padrão do hospital e poderei receber visita das 14:00 às 20:00 horas. Fui informado de que, antes de iniciar o estudo, se necessário, devo ficar por 10 tempos de meia-vida sem o uso de analgésicos. Fui informado também de que se a dor se tornar insuportável, ou se eu ficar com dificuldades para fazer as atividades do dia-a-dia antes de 10 tempos de meia-vida sem usar os analgésicos, devo voltar a usar as medicações para não prejudicar minha saúde, e então serei excluído da pesquisa.

A gabapentina é um dos remédios mais indicados para tratamento da dor crônica, que geralmente surge como dor "em queimação" ou dor "em agulhadas". A cetirizina é um remédio utilizado para rinite e outras alergias. O presente estudo visa entender como a cetirizina influencia a eliminação da gabapentina do organismo. A sua colaboração será importante para entendermos se a combinação de cetirizina e gabapentina pode afetar o tratamento com a gabapentina. O estudo será realizado em duas fases.

Na fase I, o(a) senhor(a) será tratado(a) com uma dose de gabapentina. Na fase II, o(a) senhor(a) será tratado com cetirizina durante cinco dias e com gabapentina apenas no último dia de tratamento com a cetirizina. Nas duas fases, será necessário jejum de 12 horas antes do tratamento com a gabapentina. Em cada fase do estudo, serão coletadas amostras seriadas de sangue para medir a quantidade da gabapentina. Para isso, o(a) senhor(a) será picado(a) por um profissional altamente qualificado, sob responsabilidade da médica especialista em dor Dra. Gabriela Rocha Lauretti, ou a quem ela indicar. Será mantido um tubinho de plástico na sua veia para retiradas sucessivas de 4 mL de sangue, num volume total de 68 mL (sendo 17 coletas de um volume de sangue de 4 mL). Este volume de 68 mL não é grande, pois representa menos de 2% do volume total de sangue do adulto. Portanto, a retirada de 68 mL de sangue é totalmente segura. O(a) senhor(a) receberá soro fisiológico por veia em volume igual ao volume de sangue retirado, ou seja, 68 mL de soro fisiológico, para repor o volume de sangue coletado. Poderá haver um leve desconforto da picada e do tubinho de plástico que será mantido na veia, com risco de ficar com manchas rochas no local da picada. Em cada fase do estudo, serão fornecidos frascos para que o(a) senhor(a) colete a urina nos intervalos de 0-8h, 8-16h, 16-24h, 24-36h após a administração da gabapentina. Nos materiais coletados, realizaremos exames para verificar como o(a) senhor(a) elimina a gabapentina; e verificar se a cetirizina afetou a eliminação de gabapentina. O senhor será internado no dia em que receber o tratamento com gabapentina, e a intensidade de sua dor será avaliada através de uma escala visual para avaliação do efeito da gabapentina. Todas as amostras serão descartadas após a realização desta pesquisa.

Se você já teve alergia à gabapentina ou à cetirizina não poderá participar da pesquisa. Não haverá prejuízos para quem não puder ou não quiser participar. Você é livre para decidir. Se você puder e quiser participar, é preciso saber que a gabapentina pode dar alguns efeitos como mal-estar, cansaço, dor de cabeça, nas costas e na barriga e sintomas de gripe. Pode ocorrer também dor no peito e aumento da pressão arterial, boca seca, náusea e vômito, falta ou aumento de apetite, má digestão e diarreia. Raras manifestações foram relatadas, como diminuição de leucócitos (células do sangue de defesa), e/ou plaquetas (células que participam do processo de interromper o sangramento) e variação nos níveis de açúcar no sangue (glicemia) e a cetirizina pode dar sonolência, dor de cabeça, tontura, boca seca, dor na garganta, náusea e diarreia. Podem ocorrer também coceira, fraqueza muscular, mal-estar e reação alérgica na pele. Raras manifestações foram relatadas, como convulsão, ganho de peso, agressividade, insônia, depressão, confusão mental e aumento dos batimentos do coração, diminuição de plaquetas (células que participam do processo de interromper o sangramento), desmaios, tremores e distúrbios de visão. Se ao tomar esse medicamento e sentir qualquer sintoma, você deverá avisar a equipe médica e os pesquisadores. Mesmo depois de aceitar participar da pesquisa você pode desistir a qualquer momento. Basta avisar os pesquisadores pelos telefones (16) 98225-6947 e (16) 3315-4195 ou e-mail carolconchon@usp.br. Sua desistência não lhe causará nenhum prejuízo.

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

1. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar minha vontade de continuar participando;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento e se for do meu interesse posso pedir para que as amostras que eu já doei sejam descartadas pelos pesquisadores;
3. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos benefícios, procedimentos e riscos ocasionados pela internação, assim como outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido(a);
4. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa.

Ribeirão Preto, de de 20.....

Ana Carolina Conchon Costa
 Pesquisador Responsável
 CPF: 074.021.939-18

Profª. Drª. Gabriela Rocha Lauretti
 Coordenadora Clínica
 CRM 74.245, CPF: 062.641.768-69

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

Voluntário ou responsável legal
 Identificação: _____

Contato: Ana Carolina Conchon Costa: (16) 3315.4195, (16) 98225.6947, e-mail: carolconchon@usp.br
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n 14040903, Ribeirão Preto, SP
 – Brasil

Dra. Natália Valadares de Moraes de Moraes: (16) 3301.4689, (16) 98211.8363, e-mail: nataliavaladaresdemoraes@gmail.com
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia,
Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902, Araraquara, SP - Brasil

Dra. Gabriela R Lauretti: (16) 99176.6266, e-mail: grlauret@fmrp.usp.br
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biomecânica Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor,
Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP - Brasil

Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP: (16) 3315.4213

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os participantes dos demais grupos

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

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cetirizina e do diabetes tipo 2 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor neuropática

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Ana Carolina Conchon Costa (FCFRP-USP), Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes (FCFAR-UNESP).

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Profª. Drª. Gabriela Rocha Lauretti (FMRP-USP).

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (FCFRP-USP) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara-UNESP (FCFAR-UNESP).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em ___/___/___ fui convidado e concordei voluntariamente em participar, como paciente do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes pelo responsável da pesquisa que:

O estudo implica em que eu me submeto a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir. Para participar do estudo serei internado durante 36 horas, o que não ocorreria se eu não aceitasse participar como voluntário. Durante o período de internação receberei as refeições padrão do hospital e poderei receber visita das 14:00 às 20:00 horas. Fui informado de que, antes de iniciar o estudo, se necessário, devo ficar por 10 tempos de meia-vida sem o uso de analgésicos. Fui informado também de que se a dor se tornar insuportável, ou se eu ficar com dificuldades para fazer as atividades do dia-a-dia antes de 10 tempos de meia-vida sem usar os analgésicos, devo voltar a usar as medicações para não prejudicar minha saúde, e então serei excluído da pesquisa.

A gabapentina é um dos remédios mais indicados para tratamento da dor crônica, que ocorre frequentemente nas pernas dos pacientes diabéticos. O presente estudo visa entender como o diabetes influencia a eliminação da gabapentina do organismo. A sua colaboração será importante para entendermos se o diabetes tipo II pode afetar o tratamento com a gabapentina, e possibilitando, no futuro, avaliar o efeito desse medicamento, assim como o ajuste melhor das doses para os pacientes.

Inicialmente, o(a) senhor(a) será tratado com uma dose de gabapentina. Será necessário um jejum de 12 horas antes do tratamento com a gabapentina. Serão coletadas amostras seriadas de sangue para medir a quantidade da gabapentina. Para isso, o(a) senhor(a) será picado(a) por um profissional altamente qualificado, sob responsabilidade da médica especialista em dor Dra. Gabriela Rocha Lauretti, ou a quem ela indicar. Será mantido um tubinho de plástico na sua veia para retiradas sucessivas de 4 mL de sangue, num volume total de 68 mL (sendo 17 coletas de um volume de sangue de 4 mL). O volume de 68 mL de sangue não é grande, pois representa menos de 2% do volume total de sangue do adulto. Portanto, a retirada de 68 mL de sangue é totalmente segura. O(a) senhor(a) receberá soro fisiológico por veia em volume igual ao volume de sangue retirado, ou seja, 68 mL de soro fisiológico, para repor o volume de sangue coletado. Serão fornecidos frascos para que o(a) senhor(a) colete a urina do(a) senhor(a) nos intervalos de 0-8h, 8-16h, 16-24h, 24-36h após a administração da gabapentina. Nos materiais coletados, realizaremos exames para verificar como o(a) senhor(a) elimina a gabapentina. O(a) senhor(a) será internado(a) no dia em que receber o tratamento com gabapentina, e a intensidade de sua dor será avaliada através de uma escala visual para avaliação do efeito da gabapentina. Todas as amostras serão descartadas após a realização desta pesquisa.

Se você já teve alergia à gabapentina não poderá participar da pesquisa. Não haverá prejuízos para quem não puder ou não quiser participar. Você é livre para decidir. Se você puder e quiser participar, é preciso saber que a gabapentina pode dar alguns efeitos como mal-estar, cansaço, dor de cabeça, nas costas e na barriga e sintomas de gripe. Pode ocorrer também dor no peito e aumento da pressão arterial, boca seca, náusea e vômito, falta ou aumento de apetite, má digestão e diarreia. Raras manifestações

foram relatadas, como diminuição de leucócitos (células do sangue de defesa), e/ou plaquetas (células que participam do processo de interromper o sangramento) e variação nos níveis de açúcar no sangue (glicemia). Se ao tomar esse medicamento e sentir qualquer sintoma, você deverá avisar a equipe médica e os pesquisadores. Mesmo depois de aceitar participar da pesquisa, você pode desistir a qualquer momento. Basta avisar os pesquisadores pelos telefones (16) 98225-6947 e (16) 3315-4195 ou e-mail carolconchon@usp.br. Sua desistência não lhe causará nenhum prejuízo.

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

1. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar minha vontade de continuar participando;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento e se for do meu interesse posso pedir para que as amostras que já doe sejam descartadas pelos pesquisadores;
3. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos benefícios, procedimentos e riscos ocasionados pela internação, assim como outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido(a);
4. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa.

Ribeirão Preto, de de 20.....

Ana Carolina Conchon Costa

Pesquisador Responsável
 CPF: 074.021.939-18

Prof. Dr. Gabriela Rocha Lauretti

Coordenadora Clínica
 CRM 74.245, CPF: 062.641.768-69

Dr. Natália Valadares de Moraes

Pesquisador Responsável
 CRF-SP: 67349, CPF: 318.183.798-99

Voluntário ou responsável legal

Identificação: _____

Contato: Ana Carolina Conchon Costa: (16) 3315.4195, (16) 98225.6947, e-mail: carolconchon@usp.br
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n 14040903, Ribeirão Preto, SP – Brasil

Dra. Natália Valadares de Moraes de Moraes: (16) 3301.4689, (16) 98211.8363, e-mail: nataliavaladaresdemoraes@gmail.com
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902, Araraquara, SP - Brasil

Dra. Gabriela R Lauretti: (16) 99176.6266, e-mail: grlauret@fmrp.usp.br
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biomecânica Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP - Brasil

Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP: (16) 3315.4213

TCLE Demais Grupos 16/03/2017

APÊNDICE C - Parâmetros Farmacocinéticos individuais dos participantes do grupo Controle (n=10)

Participante	$t_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$AUC^{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	Vd/F (L)	CL/F (L/h)	CL _R (L/h)	F _{el}
Grupo Controle Fase 1 (n=10)								
2	4,94	2	3,53	33,76	63,29	8,89	5,43	61
3	4,99	6	2,68	28,57	75,67	10,50	4,26	40
4	5,08	4	1,85	17,70	124,21	16,95	9,11	53
5	12,82	4	3,37	67,79	81,82	4,42	1,98	44
8	8,19	4	2,04	25,49	138,97	11,76	4,68	39
11	8,42	2,5	1,58	18,94	192,29	15,83	5,69	35
12	7,41	3	1,95	21,58	148,65	13,90	5,68	40
17	5,69	4	3,00	26,03	94,66	11,53	6,19	53
28	8,09	2,5	3,13	35,16	99,65	8,53	5,46	63
29	6,65	3	2,59	28,71	100,21	10,45	5,87	56
Grupo Controle Fase 2 (n=10)								
2	7,24	4	1,41	18,86	166,22	15,90	4,64	29
3	4,63	4	1,90	19,09	104,99	15,72	6,09	38
4	5,98	2,5	2,07	17,41	148,79	17,23	7,11	41
5	16,75	2	2,50	57,57	125,92	5,21	0,92	17
8	7,69	4	1,78	23,51	141,73	12,76	4,41	34
11	8,23	1	0,89	12,44	286,32	24,11	6,17	25
12	4,94	3	2,36	16,95	126,23	17,70	6,1	34
17	7,59	3	1,66	15,79	207,92	18,99	5,72	30
28	7,85	4	2,15	26,76	126,93	11,21	8,34	74
29	6,12	4	1,69	17,92	147,92	16,74	8,78	52

$T_{1/2}$: meia-vida de eliminação; T_{max} : tempo para alcançar C_{max} ; C_{max} : concentração plasmática máxima; $AUC^{0-\infty}$: concentração plasmática versus tempo extrapolado até infinito; Vd/F: volume de distribuição aparente; CL/F: clearance total aparente; CL_R: clearance renal; F_{el}: fração excretada inalterada na urina

APÊNDICE D - Parâmetros Farmacocinéticos individuais dos participantes dos grupos DC (n=9) e DNC (n=10)

Participante	$t_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$AUC^{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	Vd/F (L)	Cl/F (L/h)	Cl _R (L/h)	F _{el}
Grupo DC (n=9)								
9	7,40	3	1,14	12,10	264,67	24,79	5,99	24
13	6,90	2,5	1,96	20,70	144,32	14,49	6,45	44
15	6,10	4	2,15	22,77	115,99	13,18	6,35	48
16	6,97	3	1,33	11,74	256,98	25,56	9,77	38
18	8,09	2	1,60	17,83	196,43	16,82	4,28	25
24	30,80	2,5	1,69	48,98	272,22	6,12	1,93	31
30	5,12	4	2,47	29,13	76,06	10,29	16,48	160
31	9,25	1,5	3,29	33,45	119,64	8,97	2,95	32
32	5,51	3	1,95	19,978	119,37	15,02	3,73	24
Grupo DNC (n=10)								
1	5,26	1,5	1,49	11,00	206,95	27,26	10,55	38
10	5,63	3	2,13	20,22	120,57	14,83	6,27	42
14	8,64	4	1,38	14,48	258,06	20,71	2,01	9
20	8,71	2,5	0,78	9,80	384,81	30,61	2,35	7
21	5,23	3	0,78	8,71	259,94	34,43	5,35	15
22	8,98	4	1,97	28,33	137,20	10,59	4,27	40
23	15,81	4	2,05	44,17	154,86	6,79	1,51	22
25	16,69	1	1,81	27,56	262,07	10,89	1,04	9
26	7,30	2	3,09	29,18	108,22	10,28	4,60	44
27	3,08	2,5	2,014	15,46	86,18	19,40	3,80	19

$T_{1/2}$: meia-vida de eliminação; T_{max} : tempo para alcançar C_{max} ; C_{max} : concentração plasmática máxima; $AUC^{0-\infty}$: concentração plasmática versus tempo extrapolado até infinito; Vd/F: volume de distribuição aparente; Cl/F: clearance total aparente; Cl_R: clearance renal; F_{el}: fração excretada inalterada na urina

APÊNDICE E - Dados individuais da genotipagem para os polimorfismos *SLC22A2* 808G>T e *SLC22A4* 1507C>T (n=29)

Participante	Grupo experimental	<i>SLC22A2</i> 808G>T	<i>SLC22A4</i> 1507C>T
1	DNC	GG	CC
2	C	GG	CT
3	C	GG	CC
4	C	GG	CT
5	C	GG	CT
8	C	GG	CC
9	DC	GG	TT
10	DNC	GT	CC
11	C	GT	TT
12	C	GG	CT
13	DC	GG	TT
14	DNC	GG	TT
15	DC	GT	CC
16	DC	GG	CC
17	C	GG	CC
18	DC	GG	CT
20	DNC	GG	CT
21	DNC	GG	CT
22	DNC	GG	CC
23	DNC	GT	CC
24	DC	GT	CC
25	DNC	GG	CT
26	DNC	GG	CT
27	DNC	GT	CT
28	C	GG	CT
29	C	GG	CT
30	DC	GT	CC
31	DC	GG	TT
32	DC	GG	CT

DNC: grupo diabetes não controlado; C: grupo controle; DC: grupo diabetes controlado.

ANEXOS

ANEXO A - Carta de benefício da bolsa sanduíche (SWE), processo CNPq 290076/2017-0



Ana Carolina Conchon Costa
Rua Aldo Focosi, 431, apto 112, Presidente Médici
14091310 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Diretoria de Cooperação Institucional
DAAD

Ofício SN/COEBC/CGEAO/CNPq

Brasília, 08 de dezembro de 2017

Processo número: 290076/2017-0 Modalidade: Doutorado Sanduíche no Exterior - SWE
Chamada: DAAD/Doutorado Sanduíche (SWE)
Instituição de destino: University of Münster/Alemanha

Em aditamento a mensagem eletrônica na qual lhe foi comunicada a concessão de uma bolsa de estudos no exterior, vimos informar-lhe os benefícios, prazos e condições da referida bolsa, em conformidade com as normas em vigor no CNPq.

Modalidade: Doutorado Sanduíche no Exterior - SWE
Vigência: 01/03/2018 até 31/12/2018
^TXT_DOC_PRORROGACAO

BENEFÍCIOS:

Mensalidade: EUR 1.300,00 (valor-base: EUR 1.300,00)
& & & & **Auxílio Instalação:** EUR 1.300,00
& & & & **Seguro-Saúde:** EUR 900,00
& & & & **Taxa de Bancada:** conforme aprovado na proposta

CONDIÇÕES:

No prazo de até 30 (trinta) dias, contados a partir do início das atividades, o bolsista deverá enviar cópia(s) digitalizada(s) do(s): comprovante(s) de embarque; do comprovante de matrícula e/ou carta da instituição de destino no exterior, atestando o início das atividades; e da apólice/comprovante de contratação do seguro saúde. O envio deverá ser por meio de acesso à Plataforma Integrada Carlos Chagas, em Gerenciamento de sua Bolsa, Enviar documentação complementar.

Caso os documentos não sejam enviados no prazo previsto, a bolsa será suspensa pelo CNPq.

^TXT_DOC_PRORROGACAO

Ministério de Ciência, Tecnologia,
Inovações e Comunicações - MCTIC

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico - CNPq
Coordenação de Apoio à Execução de Bolsas no
Exterior - COEBC
SHS Quadra 01 Conjunto B - Bloco B, Térreo
Edifício Santos Dumont
Lago Sul, Brasília - DF
CEP: 71605-170

Telefone: +55 61 3211-0581

e-mail: sibex@cnpq.br

ANEXO B - Carta de Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 026/2015
kms

Ribeirão Preto, 19 de maio de 2015.

À pós-graduanda
Ana Carolina Conchon Costa
Orientadora: Profª. Drª. Natália Valadares de Moraes
FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR DE CÂTIONS ORGÂNICOS 2 (OCT2) CETIRIZINA E DO DIABETES TIPO 2 NA DISPOSIÇÃO CINÉTICA DA GABAPENTINA EM PACIENTES COM DOR NEUROPÁTICA", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 352 foi aprovado ad referendum do Comitê de Ética em Pesquisa em 16/04/2015 e referendado na 141ª reunião ordinária, realizada em 17/04/2015.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de **EMENDA** na Plataforma Brasil.

Segue anexa declaração de aprovação pela instituição coparticipante.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO C - Carta de Anuência do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 11 de maio de 2015

Projeto de pesquisa: “INFLUÊNCIA DO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR DE CÁTIONS ORGÂNICOS 2 (OCT2) CETIRIZINA E DO DIABETES TIPO 2 NA DISPOSIÇÃO CINÉTICA DA GABAPENTINA EM PACIENTES COM DOR NEUROPÁTICA”

Pesquisador responsável: Ana Carolina Conchon Costa

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

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

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa - HCFMRP-
USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador Técnico Científico da
Unidade de Pesquisa Clínica -
HCFMRP-USP

ANEXO D - Carta de Anuência do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP



**CENTRO DE SAÚDE ESCOLA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

OF. 009/2017-CEP/CSE-FMRP-USP

Ribeirão Preto, 03 de Maio de 2017.

Prezado Senhor

Comunicamos que o projeto de pesquisa abaixo especificado foi analisado e **APROVADO** pelo Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na data de 02 de Maio de 2017.

CAAE: 34175314.3.3003.5414

Projeto de pesquisa: "Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cetirizina e do diabetes tipo 2 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor neuropática

Pesquisador: Ana Carolina Conchon Costa

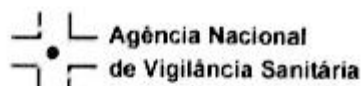
Em atendimento à Resolução 466/12, deverá ser encaminhado a este CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Laércio Joel Franco
Coordenador do CEP/CSE-FMRP-USP

Ilma. Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes
Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP

ANEXO E - Autorização Especial concedida pela ANVISA à Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP para a compra do padrão analítico certificado da GBP



AUTORIZAÇÃO ESPECIAL PARA ESTABELECIMENTO DE ENSINO E PESQUISA N. 004/2015

Autorizo a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (CNPJ: 48.031.918/0025-00) adquirir e utilizar os produtos descritos no quadro abaixo no projeto de pesquisa "Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cetirizina e do diabetes tipo 2 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor neuropática" e nas aulas de Monitorização Terapêutica de Anticonvulsivantes.

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Gabapentina	5 ampolas de 1ml x 1 mg/ml
Fenobarbital	5 ampolas de 1ml x 1 mg/ml
Fenitoína Sódica	1 g
Carbamazepina	5 ampolas de 1ml x 1 mg/ml

O controle e a guarda dos produtos acima ficarão sob a responsabilidade do Professora Dra. Natália Valadares de Moraes, CPF nº 318.183.798.99 e RG 43454263-5 SSP/SP.

O responsável deverá encaminhar a esta Agência, trimestral e anualmente, o Balanço de Substâncias Psicoativas e Outras sujeitas a Controle Especial – BSPO (anexo XX da Portaria SVS/MS n.º 344/98) relativo à movimentação dos referidos produtos.

Esta Autorização é válida por 1 (um) ano.

Brasília – DF, 16 de março de 2015

2ª Via ESTABELECIMENTO ADQUIRENTE


 Glória Maria de Oliveira Catuf
 SIAPE 1568025
 Coordenadora Substituta
 CPC/INGG/FIS/UCOM/ANVISA