UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ROBERTA NATÁLIA CESTARI

Efeito do lúpus eritematoso sistêmico na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da atorvastatina

Ribeirão Preto
2018

RESUMO

CESTARI, R. N. **Efeito do lúpus eritematoso sistêmico na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da atorvastatina**. 2018. 156f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Estudos *in vitro*, *in silico* e clínicos mostram que as doenças inflamatórias associadas com o aumento de citocinas resultam em infra-regulação de transportadores e enzimas envolvidas no metabolismo de medicamentos. A atorvastatina é um fármaco com metabolismo dependente do CYP3A4 (metabólitos hidroxilados ácidos e lactonas) e com distribuição para o fígado dependente do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, onde inibe a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão do HMG-CoA a ácido mevalônico durante a síntese de colesterol. O presente estudo avalia o efeito do lúpus eritematoso sistêmico (LES), uma doença inflamatória, na atividade do transportador OATP1B1, utilizando as concentrações plasmáticas da atorvastatina e metabólitos como parâmetros farmacocinéticos e as concentrações plasmáticas do ácido mevalônico como parâmetro farmacodinâmico. Foram investigadas 15 voluntárias sadias, 13 pacientes com LES controlado com escores SLEDAI de 0 a 4 e 12 pacientes com LES não controlado com escores SLEDAI de 6 a 15. A atorvastatina e seus cinco metabólitos como concentração total, a atorvastatina como concentração livre, a genfibrozila e o ácido mevalônico foram analisados em plasma empregando UPLC-MS/MS. Os métodos não apresentaram efeito matriz e os coeficientes de variação e os erros padrão relativos dos estudos de precisão e exatidão foram inferiores a 15%. As linearidades dos métodos validados em plasma foram de 0,025-200 ng/mL para a concentração total da atorvastatina e metabólitos, 0,00625-25 ng/mL para a concentração livre da atorvastatina, 0,01-100 μg/mL para a genfibrozila e 0,125-50 ng/mL para o ácido mevalônico. O clearance oral do midazolam, marcador da atividade do CYP3A4, não variou entre os grupos de voluntárias sadias, LES controlado e LES não controlado. As pacientes investigadas com LES controlado mostraram concentrações plasmáticas elevadas das citocinas MCP-1 e TNF-α, enquanto as pacientes com LES não controlado mostraram concentrações plasmáticas elevadas das citocinas MCP-1, TNF-α e IL-10. As pacientes do grupo LES não controlado mostraram maiores valores de AUC (67,27 *vs* 35,04 ng.h/mL) e C_{max} (21,68 *vs* 9,52 ng/mL) e menores valores de clearance aparente (377,4 *vs* 742,9 L/h) e volume aparente de distribuição (3398 *vs* 9005 L) da atorvastatina quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias. Em relação aos metabólitos da atorvastatina, o LES não controlado aumentou os valores de AUC (100,70 *vs* 59,12 ng.h/mL) e C_{max} (10,78 *vs* 5,21 ng/mL) somente do metabólito inativo atorvastatina lactona. A farmacocinética da atorvastatina e seus metabólitos não difere entre os grupos LES controlado e voluntárias sadias. A administração de genfibrozila (600 mg/12 h durante 6 dias) para as pacientes do grupo LES não controlado resultou em aumento dos valores de AUC (96,16 *vs* 44,78 ng.h/mL) e C_{max} (34,13 *vs* 14,89 ng/mL) e menores valores de clearance aparente (238,30 *vs* 638,80 L/h) e volume aparente de distribuição (1939 *vs* 4596 L) quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias. Em relação aos metabólitos, foi obervado aumento da exposição sistêmica para os metabólitos orto-hidroxi atorvastatina ($AUC^{0-\infty}$ 183,20 *vs* 46,29 ng.h/mL), para-hidroxi atorvastatina (AUC^{0-36h} 15,12 *vs* 2,33 ng.h/mL), atorvastatina lactona ($AUC^{0-\infty}$ 111,50 *vs* 59,12 ng.h/mL), orto-hidroxi atorvastatina lactona ($AUC^{0-\infty}$ 194,20 *vs* 75,65 ng.h/mL) e para-hidroxi atorvastatina lactona (AUC^{0-36h} 34,27 *vs* 10,18 ng.h/mL). A administração de dose única oral de atorvastatina como monoterapia reduziu os valores de AUC^{0-24h} do ácido mevalônico em aproximadamente 55,66% nas voluntárias sadias, 62,96% nas pacientes com LES controlado e 62,75% nas pacientes com LES não controlado, sem significância estatística entre os grupos. A administração de genfibrozila (600 mg/12 h durante 6 dias) praticamente não altera as áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de ácido mevalônico e as concentrações plasmáticas de atorvastatina somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (orto-hidroxi atorvastatina e para-hidroxi atorvastatina) no grupo de voluntárias sadias. No entanto, a administração de genfibrozila aumenta discretamente a área de histerese nas pacientes do grupo LES controlado e acentuadamente nas pacientes do grupo LES não controlado. Concluindo, o LES não controlado aumenta a exposição sistêmica e reduz a exposição hepática da atorvastatina e metabólitos, inferindo inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, uma vez que a atividade *in vivo* do CYP3A4, de acordo com o clearance oral do midazolam, não foi alterada. A inflamação, e não a doença, é responsável pelas alterações descritas no grupo LES não controlado como consequência da inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, uma vez que a exposição sistêmica da atorvastatina e seus metabólitos não foi alterada nas pacientes com LES controlado.

Palavras-chave: OATP1B1; lúpus; atorvastatina; farmacocinética; farmacodinâmica

INTRODUÇÃO GERAL

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica e inflamatória que afeta principalmente mulheres jovens em idade fértil (ASANUMA et al., 2003; TSOKOS, 2011). A prevalência do LES é de 20 a 150 casos a cada 100 mil indivíduos, com a maior prevalência reportada no Brasil. A taxa de sobrevida de pacientes com LES é de aproximadamente 70% em 10 anos (TSOKOS, 2011).

As doenças cardiovasculares são importantes causas de morbidade e mortalidade no LES (ABU-SHAKRA et al., 1995; RUBIN; UROWITZ; GLADMAN, 1985; WARD, 1999). Os pacientes com LES devido a aterosclerose apresentam infarto do miocárdio precocemente e com incidência cinco vezes maior do que na população em geral (UROWITZ et al., 1976).

Nesse contexto, nas últimas décadas, a terapia com estatinas tem se mostrado a estratégia mais efetiva no tratamento de pacientes com dislipidemias e na prevenção da aterosclerose (DAVIGNON, 2004; KWAK et al., 2000; SHOVMAN et al., 2002). As estatinas são distribuidas para os hepatócitos através do transportador OATP1B1 [*organic anion transporting polypeptides* – superfamília SLC (*Solute Carrier*)], onde inibem a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A (HMG-CoA) redutase, a enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA à ácido mevalônico (MVA) durante a síntese de colesterol (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; SHARMA et al., 2012).

O transportador OATP1B1, um transportador de influxo localizado na membrana sinusoidal hepática, está envolvido no transporte de compostos endógenos, tais como ácidos biliares, esteróides conjugados, hormônios da tireóide, peptídeos, entre outros, assim como no transporte de fármacos, incluindo as estatinas. O transportador OATP1B1 desempenha um papel importante na distribuição de fármacos para o fígado e consequentemente nos processos de metabolismo e excreção biliar. Assim, a inibição farmacológica do transportador OATP1B1 pode alterar a distribuição, o metabolismo e a eliminação de seus substratos, causando interações fármaco-fármaco clinicamente relevantes, como por exemplo, genfibrozila e rosuvastatina. O potencial de interação fármaco-fármaco com estatinas é de grande importância para a segurança clínica, uma vez que a inibição do transportador OATP1B1 resulta em aumento nas concentrações plasmáticas de estatinas associado com miopatia ou até mesmo rabdomiólise (KARLGREN et al., 2012; SHARMA et al., 2012).

A atorvastatina (ATV) é distribuída para o fígado pelo transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 e rapidamente metabolizada pelo citocromo P450 3A4 (CYP3A4) hepático, formando dois metabólitos ativos, orto-hidroxi atorvastatina ácida (o-OH-ATV) e para-hidroxi atorvastatina ácida (p-OH-ATV) (LENNERNÄS, 2003; MACWAN et al., 2011). O fármaco inalterado e os seus metabólitos hidroxi ácidos encontram-se em equilíbrio com as suas formas lactonas inativas correspondentes, atorvastatina lactona (ATV-LAC), orto-hidroxi atorvastatina lactona (o-OH-ATV-LAC) e para-hidroxi atorvastatina lactona (p-OH-ATV-LAC). Ressalta-se que o fármaco inalterado e os metabólitos ácidos exibem alta afinidade pelo transportador OATP1B1, enquanto as formas lactonas mais lipofílicas e, portanto, mais permeáveis, são menos afetadas pela inibição do transportador OATP1B1 (SHARMA et al., 2012). Apesar da ATV ser completamente e rapidamente metabolizada pelo CYP3A4, o seu clearance hepático depende essencialmente do clearance de influxo sinusoidal pelo OATP1B1, sendo os metabólitos ativos e inativos eliminados por secreção biliar e intestinal (PATILEA-VRANA; UNADKAT, 2016).

O LES é uma doença caracterizada por inflamação crônica evidenciada por altas concentrações plasmáticas de citocinas, tais como interferon gama (IFN-γ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina 10 (IL-10), entre outras (MCCARTHY et al., 2014; PERANDINI et al., 2014; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017). Ressalta-se que a aterosclerose também é um estado inflamatório com evidência de aumento das citocinas IL-6, interleucina 8 (IL-8) e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) e que os pacientes com LES exibem grande aumento das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias proaterogências IL-6 e MCP-1 (ASANUMA et al., 2006). Nos últimos 20 anos, estudos pré-clínicos têm demonstrado que as doenças inflamatórias, como o LES, artrite reumatoide e diabetes, estão associadas às alterações na farmacocinética de medicamentos, incluindo absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (CRESSMAN; PETROVIC; PIQUETTE-MILLER, 2012; DON; KAYSEN, 2004; GANDHI; MOORTHY; GHOSE, 2012; MOSHAGE et al., 1987; RUOT et al., 2002).

Estudos *in vitro*, *in silico* e clínicos mostram que as doenças inflamatórias associadas com o aumento de citocinas resultam em infra-regulação de enzimas CYP e outras enzimas envolvidas no metabolismo de medicamentos (DICKMANN et al., 2011; MACHAVARAM et al., 2013). Ademais, um estudo *in vitro* também associa aumento da liberação de citocinas com infra-regulação de transportadores de

fármacos associados às membranas celulares (LE VEE et al., 2009), dentre os quais, estão os transportadores pertencentes à superfamília SLC e ABC (*ATP-binding cassette*) (SHITARA et al., 2013; STIEGER; MEIER, 2011).

Considerando que as estatinas, utilizadas amplamente no tratamento da aterosclerose, são substratos do transportador OATP1B1 e são metabolizadas por enzimas CYP3A4 (ULVESTAD et al., 2013), as pacientes com LES poderiam diferir da população geral em termos da farmacocinética e farmacodinâmica da ATV devido à diminuição da atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, com consequente redução da distribuição da estatina para o hepatócito e assim, do seu efeito farmacodinâmico. O presente estudo avalia o efeito do LES na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da ATV, administrada como monoterapia ou em associação com a genfibrozila (GFZ).

O estudo foi dividido em dois capítulos, os quais incluem os métodos analíticos e o estudo clínico. O Capítulo I apresenta o desenvolvimento e a validação do método de análise da concentração total da ATV e seus cinco metabólitos (p-OH-ATV, o-OH-ATV, ATV-LAC, p-OH-ATV-LAC e o-OH-ATV-LAC), concentração livre da ATV, concentração da GFZ e concentração do MVA em plasma utilizando o sistema UPLC-MS/MS (cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrômetro de massas).

Os métodos foram aplicados no estudo clínico apresentado no Capítulo II. O Capítulo II apresenta o estudo clínico do efeito do LES na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica (concentrações plasmáticas do MVA) da ATV, administrada como monoterapia ou associada a GFZ (inibidor do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1), em voluntárias sadias e em pacientes com LES controlado [SLEDAI (*Systemic Lúpus Erythematosus Disease Activity Index*) de 0-4] e LES não controlado (SLEDAI de 6-15).

CAPÍTULO I

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos empregando UPLC-MS/MS: ATV e metabólitos como concentração total, ATV livre, GFZ e MVA em plasma

I.1 ANÁLISE SEQUENCIAL DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DA ATV E SEUS CINCO METABÓLITOS EM PLASMA E DA CONCENTRAÇÃO LIVRE DA ATV EM PLASMA

I.1.1 INTRODUÇÃO

A ATV, uma estatina sintética de segunda geração, é utilizada no tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares e ateroscleróticas, com redução dos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (CAI et al., 2017; LENNERNÄS, 2003).

A ATV, administrada oralmente como um sal de cálcio na sua forma ácida ativa, apresenta rápida absorção intestinal, atingindo a sua concentração plasmática máxima (C_{max}) entre 1 e 2 h. Sua biodisponibilidade é baixa, em torno de 14%, devido ao alto metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado dependente do CYP3A4, formando dois metabólitos ativos, o-OH-ATV ácida e p-OH-ATV ácida. As formas ácidas da ATV e metabólitos buscam o equilíbrio com as respectivas formas lactonas inativas correspondentes, ATV-LAC, o-OH-ATV-LAC e p-OH-ATV-LAC (Figura 1) (GOOSEN et al., 2007; HERMANN; CHRISTENSEN; REUBSAET, 2005; JEMAL; XIA, 2000; LENNERNÄS, 2003; MACWAN et al., 2011).

A lactonização das formas ácidas da ATV pode ocorrer não enzimaticamente em pH menor do que 4 ou via coenzima A ou pela uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases (UGTs). Já a hidrólise da lactona é mediada por esterases (paraoxonases). A interconversão entre as formas ácidas e lactonas da ATV ocorre não apenas *in vivo*, mas também *in vitro* no plasma (durante o armazenamento, preparação e análise da amostra). Para minimizar a interconversão entre as formas ácida e lactona, as amostras de plasma devem ser mantidas a 4°C e em pH entre 4 e 5. Em amostras de plasma com pH acima de 6, a forma lactona fica instável e o equilíbrio favorece a hidrólise, abrindo a lactona e produzindo a forma hidroxiácido. Já a forma ácida, é suscetível sob condições mais ácidas à formação de lactona (Figura 1) (GOOSEN et al., 2007; HERMANN; CHRISTENSEN; REUBSAET, 2005; HOFFMANN; NOWOSIELSKI, 2008; JEMAL; XIA, 2000; MACWAN et al., 2011; TURNER et al., 2018).

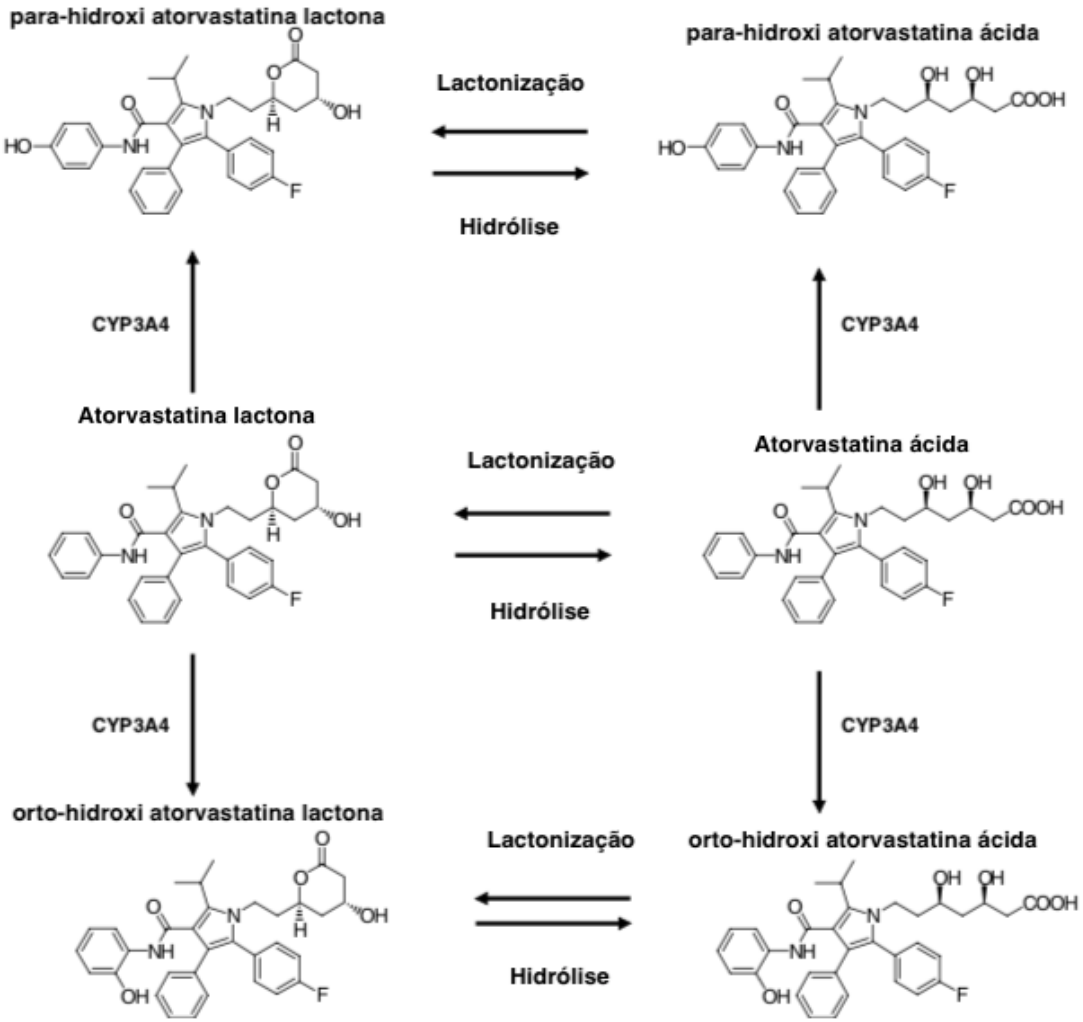

Figura 1: Estruturas químicas e metabolismo da atorvastatina (LENNERNÄS, 2003).

Cerca de 70% da atividade inibitória total da HMG-CoA redutase é explicada pelos metabólitos ativos da ATV (LENNERNÄS, 2003). Embora as formas lactona da ATV sejam inativas em relação aos efeitos hipolipemiantes, Hermann et al. (2006) observaram que os pacientes que manifestaram miopatia exibiram maiores concentrações plasmáticas dos metabólitos ATV-LAC, p-OH-ATV-LAC e o-OH-ATV-LAC. A miotoxicidade poderia, portanto, estar relacionada com as concentrações plasmáticas da ATV-LAC ou metabólitos hidroxilados-LAC, ou com ambos. Logo, as razões de concentrações plasmáticas metabólito lactona/fármaco inalterado são de relevância clínica como marcadoras do risco de miopatia associado a ATV. Além disso, um estudo *in vitro* realizado por Skottheim et al. (2008), utilizando células de músculo esquelético humano primário relata que a ATV-LAC tem uma potência 7 vezes maior para induzir miotoxicidade em comparação com a sua forma ácida,

corroborando ainda a utilidade da concentração plasmática de ATV-LAC como marcador da miopatia induzida por estatina.

A ligação da ATV às proteínas plasmáticas é maior que 90%. Não existem dados disponíveis para a ligação dos dois metabólitos ativos da ATV às proteínas plasmáticas. A ATV é completamente metabolizada *in vivo*, sendo os metabólitos ativos e inativos eliminados por secreção biliar e intestinal (GIBSON et al., 1997; LENNERNÄS, 2003; MALHOTRA; GOA, 2001; WILLIAMS; FEELY, 2002).

Apenas dois estudos descrevem a análise sequencial da ATV e seus cinco metabólitos em plasma como concentração total empregando LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas) ou UPLC-MS/MS (CAI et al., 2017; MACWAN et al., 2011). O método de Macwan et al. (2011) empregando volumes de plasma de 50 μL, preparo de amostra por precipitação de proteínas e tempo de corrida cromatográfica no sistema LC-MS/MS de 3 minutos, resultou em limite inferior de quantificação (LIQ) de 0,05 ng/mL para a ATV e metabólitos. Já Cai et al. (2017) utilizando UPLC-MS/MS, relataram maiores valores de LIQ (0,2 ng/mL) para a ATV e seus cinco metabólitos, mesmo empregando maiores volumes de plasma (100 μL).

O presente estudo reporta o desenvolvimento e a validação de um método rápido e mais sensível de análise sequencial da concentração total da ATV e seus metabólitos p e o-OH-ATV, ATV-LAC e p e o-OH-ATV-LAC em plasma e da concentração livre da ATV em plasma empregando UPLC-MS/MS. Os métodos foram validados e aplicados na investigação de uma paciente com LES tratada com dose única oral de 20 mg de ATV.

I.1.2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar os métodos UPLC-MS/MS de análise sequencial da ATV e seus metabólitos (p e o-OH-ATV, ATV-LAC e p e o-OH-ATV-LAC) como concentração plasmática total e da ATV como concentração plasmática livre.

I.1.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

I.1.3.1 Soluções padrão e reagentes

As soluções estoque de atorvastatina [ATV, atorvastatina cálcica 96%, Toronto Research Chemicals Inc. (TRC), North York, ON, Canadá], atorvastatina lactona

I.1.5 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta o desenvolvimento e a validação do método de análise sequencial da ATV e seus metabólitos ativos (p e o-OH-ATV) e inativos (ATV-LAC e p e o-OH-ATV-LAC) em plasma como concentração total e da ATV como concentração livre, empregando UPLC-MS/MS. Os métodos foram aplicados no estudo da disposição cinética, fração livre e metabolismo da ATV em uma paciente com LES que recebeu dose única oral de 20 mg de ATV.

Os métodos foram desenvolvidos empregando padrões internos análogos deuterados da ATV e metabólitos (ATV-D5, p e o-OH-ATV-D5, ATV-LAC-D5 e p e o-OH-ATV-LAC-D5) em razão da interconversão da ATV e seus metabólitos hidroxi ácidos para as suas respectivas formas lactonas, não apenas *in vivo*, mas também durante o armazenamento, preparo e análise cromatográfica das amostras de plasma (HERMANN; CHRISTENSEN; REUBSAET, 2005; JEMAL; XIA, 2000).

A ATV e seus cinco metabólitos foram separados na coluna ACQUITY UPLC®BEH C18, empregando como fase móvel isocrática solução aquosa de ácido fórmico 0,2% e acetonitrila, na proporção 55:45, v/v. O tempo total de corrida cromatográfica para o fármaco inalterado e seus cinco metabólitos foi de 4,5 minutos (Figura 5), um tempo comparável ao tempo de corrida cromatográfica reportado por Cai et al. (2017). O uso de fase móvel isocrática pode ser considerado uma vantagem em relação ao método que usa gradiente (MACWAN et al., 2011), uma vez que é possível analisar maior número de amostras, pois não é necessário esperar o equilíbrio da coluna cromatográfica com a fase móvel inicial a cada amostra como ocorre em análises com gradiente.

O procedimento de precipitação de proteínas com acetonitrila utilizado no preparo da amostra resultou em ausência de efeito matriz (coeficientes de variação dos valores de FMN < 15%; Tabela 5). O método de Macwan et al. (2011) também usa o mesmo procedimento. O preparo da amostra por precipitação de proteínas com acetonitrila representa um procedimento simples e rápido, sendo uma vantagem para a análise de fármacos que podem sofrer interconversão para suas respectivas formas lactona e também é muito vantajoso para analisar o grande número de amostras requerido em estudos de farmacocinética.

A análise de diferentes amostras de plasma branco não evidenciou a interferência de componentes endógenos com a ATV e seus metabólitos, indicando

adequada seletividade (Figura 5). As amostras de plasma branco analisadas imediatamente após a amostra de LSQ não apresentaram interferentes, indicando que não há efeito residual de injeções anteriores.

O método desenvolvido e validado no presente estudo, empregando alíquotas de 50 µL de plasma, apresentou valores de LIQ de 0,025 ng/mL plasma para a ATV e metabólitos (Tabela 3). Logo, o presente método é mais sensível do que aqueles reportados por Macwan et al. (2011) e Cai et al. (2017), os quais analisam a ATV e seus cinco metabólitos e empregam alíquotas de 50 e 100 µL de plasma e LIQ de 0,05 e 0,2 ng/mL, respectivamente.

Os estudos de precisão e exatidão em plasma (Tabela 4) apresentaram coeficientes de variação e erro padrão relativo menores que 15% indicando o método como preciso e exato. Os estudos de estabilidade apresentados na Tabela 4 mostram coeficientes de variação menores que 15% garantindo a estabilidade após 3 ciclos de congelamento -80°C e descongelamento a 4°C, 4 h na bancada a 4°C e 15 h após o processamento (todas as amostras mantidas a 10 °C). As amostras de plasma foram mantidas a 4°C em pH entre 4 e 5 durante todo o procedimento de preparo da amostra para minimizar a interconversão das formas ácidas e lactonas.

O método de análise da concentração total da ATV e seus cinco metabólitos em plasma foi aplicado na investigação da farmacocinética da ATV em uma paciente com LES que recebeu dose única oral de 20 mg de ATV (Figura 7 e Tabela 5). Os valores de C_{max} (7,51 ng/mL), t_{max} (1 h), clearance total aparente (562,50 L/h) e volume aparente de distribuição (5894,70 L) para a ATV estão de acordo com estudos de dose única oral em voluntários sadios (MOHAMMAD et al., 2015). Os parâmetros farmacocinéticos apresentados na Tabela 5 mostram razões metabólicas de AUC metabólito/ATV de 0,08 para o p-OH-ATV; 1,19 para o o-OH-ATV; 2,35 para o ATV-LAC; 0,31 para o p-OH-ATV-LAC e 2,57 para o o-OH-ATV-LAC.

O método de análise da concentração total da ATV e seus cinco metabólitos em plasma, permitiu quantificar a ATV e os metabólitos até 36 h após a administração de dose única oral de 20 mg de ATV. Logo, o método é compatível com a aplicação em estudos de farmacocinética clínica por apresentar as vantagens do baixo volume de plasma requerido nas análises (50 µL), procedimento de preparo de amostra rápido e simples, alta sensibilidade (25 pg/mL) e extensa linearidade (25 pg-200 ng/mL).

A ligação de fármacos às proteínas plasmáticas é uma covariável importante em farmacocinética, visto que apenas a concentração livre de fármacos no plasma

encontra-se disponível para a distribuição e a eliminação. Assim, preferencialmente a concentração livre e não a concentração total, deve ser usada nos modelos farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) para os fármacos altamente ligados às proteínas plasmáticas, tais como a ATV com ligação superior a 90% e razão de extração hepática intermediária (E=0,42) (LENNERNÄS, 2003; SMITH; DI; KERNS, 2010). No entanto, não há métodos analíticos desenvolvidos e validados para análise da concentração livre de ATV em plasma.

O método de análise da concentração livre da ATV desenvolvido e validado no presente estudo é semelhante ao método utilizado para a determinação da concentração total em plasma, exceto pela exigência de um procedimento capaz de separar o fármaco livre do fármaco ligado às proteínas plasmáticas. No presente estudo, foi empregado o método de ultrafiltração utilizando o dispositivo Centrifree®, um sistema que resulta na formação de um ultrafiltrado, no qual o fármaco livre encontra-se na mesma concentração da amostra. O tempo de ultrafiltração representa um fator limitante para a viabilidade da análise em função da interconversão das formas ácida para as respectivas formas lactona da ATV e metabólitos. A manutenção do pH da amostra na faixa de 4 a 5 e temperatura de 4°C, minimiza a interconversão da ATV entre as formas ácida e lactona (GOOSEN et al., 2007; HERMANN; CHRISTENSEN; REUBSAET, 2005; HOFFMANN; NOWOSIELSKI, 2008; JEMAL; XIA, 2000; MACWAN et al., 2011; TURNER et al., 2018). Considerando que o pH do ultrafiltrado de plasma varia entre 8 e 9, a adição de solução tampão fosfato de potássio dibásico pH 7,4 permite a redução do pH, embora ainda com valores acima do pH necessário para a estabilidade das formas ácida e lactona. Ressalta-se que não é possível utilizar tampão com pH menor que 7,4, pois poderia alterar a ligação da ATV às proteínas plasmáticas. Dessa forma, a etapa de ultrafiltração foi executada no menor tempo possível (15 min) e o ultrafiltrado recuperado imediatamente acidificado com ácido fórmico para a manutenção do pH entre 4 e 5.

O procedimento de ultrafiltração resultou em ausência de efeito matriz (coeficientes de variação dos valores de FMN < 15%; Tabela 6). A análise de diferentes amostras de ultrafiltrado de plasma branco não evidenciou a interferência de componentes endógenos com a ATV, indicando adequada seletividade (Figura 6). As amostras de ultrafiltrado de plasma branco analisadas imediatamente após a amostra de LSQ não apresentaram interferentes, indicando que não há efeito residual de injeções anteriores.

Também foi realizado o teste de ligação inespecífica (NSB) da ATV no filtro do dispositivo de ultrafiltração. Os resultados das soluções ultrafiltradas foram comparados com as soluções não submetidas ao procedimento de ultrafiltração e os valores de EPR encontrados para o CQB e CQA foram -12,90% e -14,90%, respectivamente (Tabela 6). Os valores inferiores a 15% indicaram que a porcentagem de ATV retida no filtro não altera a precisão e a exatidão da análise da concentração livre no plasma.

O método desenvolvido e validado no presente estudo, empregando alíquotas de 100 µL de ultrafiltrado de plasma, apresentou LIQ de 6,25 pg de ATV/mL de ultrafiltrado (Tabela 6).

Os estudos de precisão e exatidão em ultrafiltrado (Tabela 6) apresentaram coeficientes de variação e erro padrão relativo menores que 15% indicando o método como preciso e exato. Os estudos de estabilidade apresentados na Tabela 6 mostram coeficientes de variação menores que 15% garantindo a estabilidade após 3 ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 4°C, 4 h na bancada a 4°C e 24 h após o processamento (todas as amostras mantidas a 10 °C). As amostras de ultrafiltrado foram mantidas a 4°C e em pH entre 4 e 5 durante todo o procedimento de preparo da amostra para minimizar a interconversão das formas ácidas e lactonas.

O método de análise da concentração livre de ATV em plasma foi aplicado na investigação de uma paciente com LES que recebeu dose única oral de 20 mg de ATV. A concentração livre da ATV no plasma foi avaliada no tempo de observação da concentração plasmática maxima (t_{max}=1 h). No presente estudo foi observada fração livre de 9,66% para a paciente investigada (Tabela 5). A fração livre da ATV está de acordo com os valores da literatura, onde a ligação às proteínas plasmáticas da ATV é reportada como maior que 90% (LENNERNÄS, 2003).

O método de análise da concentração livre da ATV em ultrafiltrado de plasma requereu baixo volume de plasma (100 µL), procedimento de ultrafiltração rápido (15 min) e simples e com excelente sensibilidade (LIQ=6,25 pg/mL de ultrafiltrado).

Concluindo, os métodos de análise sequencial da ATV e seus cinco metabólitos em plasma como concentração total, assim como o método de análise da ATV como concentração livre no plasma, mostraram sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética de dose única oral de ATV tão baixa quanto 20 mg.

I.2 ANÁLISE DA GFZ EM PLASMA

I.2.1 INTRODUÇÃO

A GFZ, um derivado do ácido fíbrico, está associada a reduções nas concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol e LDL e aumento nas concentrações plasmáticas de HDL (*high density lipoprotein*). A GFZ age como agonista dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), atuando principalmente na isoforma PPARα (BORGES et al., 2005; ROADCAP et al., 2003; SIERRA VILLAR et al., 2013).

Após administração oral, mais de 90% da GFZ é absorvida e atinge a sua C_{max} em torno de 1 a 2 h, com meia-vida plasmática de 1,5 h após doses múltiplas. A GFZ é metabolizada pelas UGTs 1A1 e 1A3 e excretada na urina como metabólitos glucuronídeos (BORGES et al., 2005; GONZÁLEZ-PEÑAS et al., 2001). A GFZ pode afetar o metabolismo de vários fármacos, dentre os quais das estatinas, por inibir o transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 e também o CYP2C9 e CYP2C8. A administração de GFZ resulta no aumento da exposição sistêmica de todas as estatinas, na redução dos níveis de colesterol total e no aumento de HDL. No entanto, o uso crônico da associação de GFZ e estatinas está associado a maior frequência de miopatia e hepatotoxicidade (SCHULZ, 2006).

A análise de GFZ em plasma pode ser realizada utilizando técnicas de cromatografia gasosa com etapas tediosas de derivatização, com sensibilidade de 0,5 µg/mL (RANDINITIS et al., 1984) ou técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por ultravioleta (UV) ou fluorescência. Os métodos por HPLC-UV mostram sensibilidades entre 0,05 µg/mL e 1 µg/mL, enquanto os de fluorescência variam de 0,01 µg/mL a 0,5 µg/mL. Esses métodos apresentam tempos de execução muito longos (até 20 minutos) e exigem técnicas demoradas de preparo de amostras (DENG; WANG; LI, 2005; FORLAND; CHAPLIN; CUTLER, 1987; GONZÁLEZ-PEÑAS et al., 2001; HENGY; KÖLLE, 1985; HERMENING et al., 2000; KANG et al., 2009; NAKAGAWA et al., 1991; NIEMI et al., 2003a, 2003b; RANDINITIS; PARKER; KINKEL, 1986; SCHNECK et al., 2004; VITTAL et al., 2006).

Poucos métodos bioanalíticos empregam LC-MS/MS na análise da GFZ plasmática, entre eles pode-se citar o de Roadcap et al. (2003), com ótima sensibilidade de 0,001 µg/mL e tempo de corrida menor que 2 minutos. No entanto,

neste estudo foi utilizado somente plasma de cães. Outros autores descrevem métodos bioanalíticos com sensibilidade variando de 0,02 µg/mL a 0,5 µg de GFZ/mL de plasma humano e tempos de corrida menores que 5 minutos (BORGES et al., 2005; BUSSE et al., 2009; ROWER et al., 2010; TORNIO et al., 2008).

O presente estudo reporta o desenvolvimento e a validação de um método rápido e com sensibilidade de 0,01 µg/mL para a análise da GFZ em plasma humano utilizando UPLC-MS/MS, com preparação de amostras simples e tempos de execução curtos. O método foi validado e aplicado na investigação de uma voluntária sadia tratada com GFZ 600 mg de 12/12 h por 6 dias.

I.2.2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar o método de análise da GFZ em plasma humano empregando UPLC-MS/MS.

I.2.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

I.2.3.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de genfibrozila [GFZ, ≥98,5%, Sigma-Adrich, St. Louis, MO, EUA], foi preparada na concentração de 2000 µg/mL de acetonitrila e posteriormente diluída nas concentrações de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,025 e 0,01 µg/mL de acetonitrila. A solução de fluvastatina [98%, Toronto Research Chemicals Inc. (TRC), North York, ON, Canadá], foi utilizada como PI na concentração de 10 µg/mL de metanol. Dado que a fluvastatina é fotossensível, todos os experimentos foram realizados sob luz amarela (lâmpadas de vapor de sódio) como única fonte de iluminação.

A acetonitrila (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) utilizada foi grau cromatografia e a água utilizada foi obtida do sistema de purificação Milli Q Plus® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

I.2.3.2 Análise Cromatográfica

A análise da GFZ foi realizada por UPLC-MS/MS constituído por bomba quaternária ACQUITY UPLC® H-Class, injetor automático ACQUITY UPLC® Sample Manager – FTN equipado com organizador de amostras ACQUITY Sample Organizer,

I.2.5 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta o desenvolvimento e a validação do método de análise da GFZ em plasma empregando UPLC-MS/MS, o qual foi aplicado no estudo da disposição cinética da GFZ em uma voluntária sadia que recebeu doses múliplas orais de GFZ (600 mg a cada 12 h) por 6 dias. As análises foram realizadas com as amostras seriadas de sangue de 0 a 12 h que foram coletadas no sexto dia da administração.

Na literatura, pode-se encontrar apenas quatro trabalhos de desenvolvimento e validação do método de análise da GFZ em plasma humano e um em plasma de cães empregando LC-MS/MS (BORGES et al., 2005; BUSSE et al., 2009; ROADCAP et al., 2003; ROWER et al., 2010; TORNIO et al., 2008).

Considerando que a análise da GFZ por espectrometria de massas requer ionização no modo negativo, poucos compostos foram selecionados como padrão interno, dentre os quais, a fluvastatina, por eluir antes da GFZ, não apresentar efeito matriz no procedimento de preparo das amostras de plasma e por não ser de uso frequente na clínica. No presente estudo, a GFZ e a fluvastatina (PI) foram separadas na coluna ACQUITY UPLC®BEH C18, empregando como fase móvel isocrática uma mistura constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,01% e acetonitrila (40:60, v/v). Os tempos de retenção da GFZ e PI (fluvastatina) foram de 1,20 e 0,87 minutos (Figura 9), respectivamente.

O procedimento de preparo das amostras de plasma por precipitação de proteínas com acetonitrila e reconstituição dos resíduos em água, resultou em ausência de efeito matriz (coeficientes de variação dos valores de FMN < 15%; Tabela 9), um parâmetro que foi bastante significativo, visto que esse procedimento é muito simples e rápido.

O rápido procedimento de preparo das amostras de plasma associado com a corrida cromatográfica de apenas 2 min (Figura 9) representa uma grande vantagem deste método para os estudos de farmacocinética. Dentre os trabalhos encontrados na literatura, dois não relatam como foi realizado o procedimento de preparo de amostras (BUSSE et al., 2009; TORNIO et al., 2008), Roadcap et al. (2003) utilizaram extração em fase sólida (SPE), o que encarece o custo da análise, Borges et al. (2005) utilizaram extração líquido-líquido, o que requer maior tempo no preparo de amostras e apenas Rower et al. (2010) utilizaram precipitação de proteínas empregando 125 µL

plasma.

A análise de diferentes amostras de plasma branco não evidenciou a interferência dos componentes endógenos com a GFZ e PI, indicando adequada seletividade (Figura 9). As amostras de plasma branco analisadas imediatamente após a amostra de LSQ não apresentaram interferentes, indicando que não há efeito residual de injeções anteriores.

O método desenvolvido e validado no presente estudo, empregando alíquotas de apenas 25 µL de plasma, apresentou valor de LIQ de 0,01 µg/mL plasma para a GFZ (Tabela 9). Logo, o presente método é o mais sensível para a análise de GFZ em plasma humano empregando UPLC-MS/MS e requer o menor volume de plasma da literatura (25 µL). Ressalta-se, que o trabalho de Roadcap et al. (2003) apesar de relatar um LIQ de 0,001 µg/mL, emprega plasma de cães para o desenvolvimento e validação do método de análise da GFZ, alto custo no preparo de amostras por SPE e requer um grande volume de plasma (500 µL) para a análise.

Os estudos de precisão e exatidão (Tabela 9) apresentaram coeficientes de variação e erro padrão relativo menores que 15% indicando o método como preciso e exato. Os estudos de estabilidade apresentados na Tabela 9 mostram coeficientes de variação menores que 15% garantindo a estabilidade após 3 ciclos de congelamento -80°C e descongelamento a 25°C, 4 h na bancada em temperatura ambiente e 24 h após o processamento (todas as amostras mantidas a 10 °C).

O método foi aplicado na investigação da farmacocinética da GFZ em uma voluntária sadia tratada com doses múltiplas de GFZ de 600 mg a cada 12 h (Figura 10, Tabela 10). Os valores de AUC^{0-12h} (102,41 µg.h/mL), C_{max} (30,42 µg/mL), t_{max} (2,0 h) e C_{min} (1,26 µg/mL) estão de acordo com estudos de doses múltiplas orais (ROWER et al., 2010).

Concluindo, o método desenvolvido e validado no presente estudo, permitiu quantificar a GFZ em todas as amostras de plasma coletadas no intervalo de dose de 12 h, após a administração a uma voluntária sadia de doses múltiplas de 600 mg de GFZ a cada 12 h. Logo, o método é compatível com a aplicação em estudos de farmacocinética clínica por apresentar as vantagens do baixo volume de plasma requerido nas análises (25 µL), procedimento de extração rápido e simples, melhor sensibilidade da literatura para plasma humano empregando UPLC-MS/MS (0,01 µg/mL) e extensa linearidade (0,01-100 µg/mL).

I.3 ANÁLISE DO MVA EM PLASMA

I.3.1 INTRODUÇÃO

O MVA é um intermediário importante na biossíntese do colesterol, sendo formado através da redução da HMG-CoA pela enzima microsomal HMG-CoA redutase. É nessa etapa que os inibidores da HMG-CoA redutase, como por exemplo as estatinas, agem para reduzir a biossíntese de MVA e, consequentemente, as concentrações circulantes de colesterol (ABRAR; MARTIN, 2002; JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003; KINDT; SZEKELY-KLEPSER; FOUNTAIN, 2011; RODRIGUES et al., 2014; SAINI et al., 2006; WALDRON; WEBSTER, 2011).

O MVA é uma molécula endógena (encontrada em níveis de nanogramas no sangue), polar e encontrada no plasma em equilíbrio com a mevalonolactona (MVL), formada por condensação interna dos seus grupos funcionais terminais álcool e ácido carboxílico. O MVA é convertido a MVL em condições ácidas e a MVL pode ser convertida de volta a MVA em condições básicas. Logo, a extração do MVA ou MVL é altamente dependente do pH. A maioria dos métodos publicados utilizam meio ácido para formar a lactona e facilitar a extração de todo o MVA na forma de MVL. O tempo médio de equilíbrio para a conversão de MVA a MVL é de aproximadamente 30 a 60 min (ABRAR; MARTIN, 2002; JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003; KINDT; SZEKELY-KLEPSER; FOUNTAIN, 2011; RODRIGUES et al., 2014; SAINI et al., 2006; WALDRON; WEBSTER, 2011).

Os primeiros métodos de análise do MVA em plasma datam do início da década de 90 e reportam o emprego da cromatografia líquida por partição (HOFFMANN; SWEETMAN, 1990), HPLC de fase reversa com par iônico acoplado à radiodetecção (MCCASKILL; CROTEAU, 1993) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (ISHIHAMA et al., 1994). Esses métodos apresentam uma menor sensibilidade e requerem procedimentos morosos de preparo de amostras.

As concentrações de MVA em plasma humano variam de 0,5 a 10 ng/mL, o que requer o desenvolvimento de um método analítico sensível, robusto e rápido para investigações clínicas (JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003; KINDT; SZEKELY-KLEPSER; FOUNTAIN, 2011).

Poucos estudos da literatura empregam LC-MS/MS para a análise do MVA em amostras de soro, plasma ou urina (ABRAR; MARTIN, 2002; DAS; PAL, 2014; JEMAL;

SCHUSTER; WHIGAN, 2003; KINDT; SZEKELY-KLEPSER; FOUNTAIN, 2011; RODRIGUES et al., 2014; SAINI et al., 2006; WALDRON; WEBSTER, 2011). Embora esses métodos tenham sensibilidade e seletividade adequadas para determinar as concentrações de MVA no plasma humano, eles também apresentam algumas desvantagens. A maioria dos estudos realizados em plasma utilizam extração em fase sólida (ABRAR; MARTIN, 2002; DAS; PAL, 2014; JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003; SAINI et al., 2006), o que encarece a análise para o número elevado de amostras requerido em estudos de farmacocinética-farmacodinâmica. Também foi relatado um grande volume de plasma (250 a 500 µL) para atingir um LIQ de 0,2 a 2,33 ng/mL. Apenas o estudo realizado por Kindt, Szekely-Klepser e Fountain (2011) empregou a técnica de extração líquido-líquido a partir de alíquotas de 50 µL de plasma com obtenção de LIQ de 0,25 ng/mL.

O presente estudo reporta o desenvolvimento e a validação de um método rápido, mais sensível (LIQ=0,125 ng/mL), com preparação de amostras relativamente simples e tempos de execução curtos para a análise de MVA em plasma humano utilizando UPLC-MS/MS. O método foi validado e aplicado na investigação das concentrações plasmáticas de MVA durante 24 h em uma voluntária sadia e em uma paciente com LES em duas fases: fase basal e após o tratamento com dose única oral de 40 mg de ATV.

I.3.2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar o método de análise das concentrações plasmáticas do MVA empregando UPLC-MS/MS.

I.3.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

I.3.3.1 Soluções padrão e reagentes

As soluções estoque de mevalonolactona (MVL, 97%, Sigma-Adrich, St. Louis, MO, EUA), ácido mevalônico sal de lítio (MVA, ≥ 96%, Sigma-Adrich, St. Louis, MO, EUA) e padrão interno - PI (D,L-MVL-d3, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canadá) foram preparadas individualmente em metanol nas concentrações de 2, 2 e 0,2 mg/mL, respectivamente.

A solução estoque da MVL foi diluída na concentração de 2000 ng/mL de água. A partir desta solução, foram preparadas diluições em água nas concentrações de

Concluindo, o método desenvolvido e validado para a análise de MVL em plasma, com LIQ de 0,0125 ng/mL, permitiu a quantificação de todas as amostras coletadas no intervalo de 24 h, com observação de ritmo circadiano e valores de C_{min} em torno das 14:00 h, variando entre 0,51-2,13 ng/mL para as duas participantes investigadas. A administração de dose única oral de 40 mg de ATV reduziu a exposição sistêmica do MVL (AUC^{0-24h}) em 50-60%.

I.4 CONCLUSÃO

1- O métodos desenvolvidos e validados de análise sequencial da concentração total da ATV e seus metabólitos (p e o-OH-ATV, ATV-LAC e p e o-OH-ATV-LAC) em plasma e da concentração livre da ATV em plasma empregando coluna de fase reversa com fase móvel isocrática e UPLC-MS/MS apresenta excelente sensibilidade, com baixos valores de LIQ (0,025 ng/mL para a concentração total e 0,00625 ng/mL para a concentração livre), baixo volume de plasma (50 µL para a concentração total e 100 µL para a concentração livre), preparo de amostras simples e rápido, linearidade, seletividade, precisão e exatidão.

2-O método de análise sequencial da ATV e seus cinco metabólitos como concentração total permitiu analisar todas as amostras de plasma coletadas até 36 h após a administração de dose única oral de 20 mg de ATV a uma paciente com LES.

3-O método de análise da concentração livre da ATV foi aplicado na amostra de plasma correspondente ao C_{max} da concentração total de ATV, após a administração de dose única oral de 20 mg de ATV a uma paciente com LES, evidenciando ligação às proteínas plasmáticas de 90%.

4-O método desenvolvido e validado de análise da GFZ em plasma empregando coluna de fase reversa com fase móvel isocrática apresenta excelente sensibilidade, com baixo volume de plasma e menores valores de LIQ da literatura considerando a utilização de plasma humano e sistema UPLC-MS/MS (LIQ 0,01 µg/mL e alíquotas de 25 µL de plasma), preparo de amostras simples e rápido, linearidade, seletividade, precisão e exatidão.

5-O método da GFZ em plasma foi compatível com a aplicação em estudo de farmacocinética clínica da GFZ em voluntária sadia após doses múltiplas orais de 600 mg/12h de GFZ.

6-O método desenvolvido e validado da MVL em plasma empregando coluna de fase reversa com fase móvel isocrática e UPLC-MS/MS apresenta excelente sensibilidade (LIQ 0,125 ng/mL), baixo volume de plasma (100 µL), linearidade, seletividade, precisão e exatidão.

7-O método da MVL foi compatível com a aplicação em estudo de exposição sistêmica durante 24 h para uma voluntária sadia e uma paciente com LES, nas fases basal ou após a administração de dose única oral de 40 mg de ATV.

8-A administração de dose única oral de 40 mg de ATV reduziu a exposição sistêmica da MVL (AUC^{0-24h}) em aproximadamente 50 a 60%.

CAPÍTULO II

Efeito do lúpus eritematoso sistêmico na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da atorvastatina

II.1 INTRODUÇÃO

A relevância clínica da inflamação na farmacocinética permanece como desconhecida e estudos clínicos são necessários para saber qual a contribuição da inflamação na variabilidade da farmacocinética e na relação dose-resposta de medicamentos, especialmente para os medicamentos de baixo índice terapêutico (KIM; ÖSTÖR; NISAR, 2012; SLAVIERO; CLARKE; RIVORY, 2003).

Estudos *in vitro*, pré-clínicos e clínicos mostram que a resposta inflamatória altera a expressão e a atividade de diferentes transportadores de membranas (CRESSMAN; PETROVIC; PIQUETTE-MILLER, 2012). A modulação da expressão de transportadores de membranas durante a inflamação pode ser atribuída a atividade de múltiplas citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ, entre outras (FEGHALI; WRIGHT, 1997; SEIFERT et al., 2017). Considerando que alterações na expressão de transportadores pode resultar em alterações nos parâmetros farmacocinéticos, incluindo alterações da concentração no sítio alvo, a resposta inflamatória pode ser considerada um importante fator na variabilidade interindividual da eficácia e toxicidade de medicamentos, especialmente aqueles de baixo índice terapêutico. Os dados disponíveis indicam que estados de doenças associados com inflamação e produção desregulada de citocinas resultam em infra-regulação de enzimas metabolizadoras e em infra-regulação ou supra-regulação de transportadores de membranas, além de alterações nas concentrações de proteínas plasmáticas (diminuição de albumina e aumento de alfa-1 glicoproteína ácida) e no volume de fluidos corporais (edema) (SEIFERT et al., 2017).

Logo, a inflamação pode reduzir o clearance e aumentar a concentração plasmática de medicamentos via metabolismo e/ou transportadores (LIPTROTT; OWEN, 2011). As altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias observadas durante a inflamação também podem estar associadas com fenoconversão, ou seja, conversão transitória de genótipos de metabolizadores normais para fenótipos de metabolizadores pobres do CYP2D6, CYP2C19 e NAT2, dentre outras enzimas metabolizadoras (SHAH; SMITH, 2015a, 2015b). Logo, estudos *in vitro* e em animais de experimentação sinalizam potenciais interações medicamento-doença em doenças agudas e crônicas associadas com concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias.

Considerando que a inflamação pode ser um fator importante na variabilidade da resposta aos medicamentos em uso na clínica, seja modificando a eficácia, seja

modificando a toxicidade, os estudos clínicos são imperativos na tomada de decisões relativas a medicina de precisão.

O LES é uma doença inflamatória, autoimune e crônica, com patogênese ainda pouco compreendida. A doença se caracteriza por acúmulo de autoanticorpos antinucleares, hiperativação de células imunes e danos a múltiplos órgãos, que são desencadeados por deposição de complexos imunes. Apresenta períodos clínicos de atividade (exacerbação) e de remissão (sem manifestações), com gravidade variável desde formas leves e intermitentes até quadros graves e fatais (ASANUMA et al., 2003; LANNA; FERREIRA; TELLES, 2014; SAHEBKAR et al., 2016a; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017; TSOKOS, 2011). A complexidade do quadro clínico do LES pode ser aumentada pela presença simultânea de manifestações atribuíveis à atividade da doença, dano crônico, efeitos colaterais dos medicamentos e co-morbidades, especialmente infecções (GRIFFITHS; MOSCA; GORDON, 2005).

Embora a causa do LES não seja conhecida, a interação de fatores genéticos, hormonais e ambientais parece participar do seu desencadeamento (ASANUMA et al., 2003; LANNA; FERREIRA; TELLES, 2014; SAHEBKAR et al., 2016a; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017; TSOKOS, 2011). Os avanços terapêuticos ocorridos nas últimas décadas melhoraram significativamente o controle da evolução do LES, embora casos de remissão completa da doença sejam raros.

A atividade do LES pode ser avaliada por diferentes índices de atividade da doença, dentre os quais pela escala SLEDAI, a qual representa um parâmetro quantitativo e objetivo incluindo vinte e quatro variáveis clínicas e laboratoriais presentes no dia ou nos últimos 10 dias precedentes da avaliação do paciente. A atividade do LES na escala SLEDAI pode variar de zero a 105, sendo zero sem atividade, 1 a 5 atividade leve, 6 a 10 atividade moderada, 11 a 19 atividade alta e acima de 20 atividade muito alta (CAVICCHIA et al., 2013; GRIFFITHS; MOSCA; GORDON, 2005).

Os pacientes com LES são caracterizados por inflamação evidenciada por aumento na produção de TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-10 e proteínas de fase aguda. O perfil lipídico dos pacientes com LES parece ser modulado por altas concentrações de duas citocinas proaterogênicas, MCP-1 e IL-6. As concentrações de MCP-1 estão relacionadas com a infiltração de monócitos em lesões ateroscleróticas e, portanto, desempenham um papel na resposta celular inflamatória inicial. Os níveis elevados dessa citocina em pacientes com LES estão associados à atividade da doença e ao

aumento dos níveis de triglicérides, enquanto a produção aumentada de IL-6 está relacionada com a redução das concentrações de HDL (ASANUMA et al., 2006; DE CARVALHO et al., 2004; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017). Assim o LES está associado com o aumento do risco de doenças cardiovasculares. As doenças cardiovasculares são causadas por fatores de risco tradicionais, tais como dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica, sexo feminino, idade, tabagismo, *diabetes mellitus* e obesidade, como também por fatores não tradicionais (relacionados com a doença) como inflamação vascular, lesão da parede arterial, terapia com corticosteróides, doença renal crônica e anticorpos antifosfolipídicos. A prevalência de dislipidemia com elevação do colesterol total, LDL, VLDL (*very low density lipoprotein*), triglicérides e apolipoproteína B (ApoB) e redução dos níveis de HDL, ocorre em cerca de 30% dos pacientes com LES, aumentando para 60% após 3 anos do diagnóstico da doença (DEMIR et al., 2016; HERMANSEN et al., 2017; KIM et al., 2017; PETRI et al., 1992, 1996; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017).

A via biossintética do colesterol começa no citosol com a formação de HMG-CoA a partir de acetil-CoA (coenzima A), aminoácidos e ácidos graxos, pela enzima HMG-CoA sintase. Em uma segunda etapa, a HMG-CoA é reduzida pela enzima microssomal HMG-CoA redutase, formando o MVA. É nessa etapa que as estatinas agem como inibidores da HMG-CoA redutase para reduzir a biossíntese de MVA e, finalmente, as concentrações circulantes de colesterol. Há também evidências que sugerem que o colesterol exógeno inibe sua própria síntese através de *feedback* negativo no ponto de produção do MVA (WALDRON; WEBSTER, 2011).

As concentrações plasmáticas de MVA estão relacionadas à taxa de biossíntese do colesterol e se correlacionam com a atividade da HMG-CoA redutase hepática. Isso sugere que as concentrações plasmáticas de MVA podem ser usadas como biomarcador da inibição da HMG-CoA redutase pelas estatinas (ABRAR; MARTIN, 2002; WALDRON; WEBSTER, 2011).

As estatinas são a classe de medicamentos mais usada no mundo para reduzir o colesterol, sendo um tratamento efetivo para a hipercolesterolemia pela inibição da HMG-CoA redutase no fígado. As estatinas são distribuídas para o fígado através do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, onde desempenham sua ação farmacológica (DU SOUICH; ROEDERER; DUFOUR, 2017; KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; SHARMA et al., 2012). As estatinas também possuem efeitos pleiotrópicos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias, antitrombóticas e de

melhoria da função endotelial (AHMADI; GHORBANIHAGHJO; ARGANI, 2017; SAHEBKAR et al., 2016a).

A inibição da HMG-CoA redutase causa redução dos níveis intracelulares de LDL e aumento da expressão de receptores APO B/E na membrana dos hepatócitos. Esses receptores fazem a depuração de ApoB e reduzem o LDL circulante armazenando-o dentro das células para compensar a redução intracelular (SANGUINO et al., 2005; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017). Como a meia-vida do LDL é de 3-4 dias, um novo estado de equilíbrio após o tratamento com estatina deve ser alcançado em cerca de 2 semanas após o início da terapia. Assim, o efeito máximo das estatinas é atingido em 4 a 6 semanas, como demonstrado no trabalho de Kim et al. (2011) através da simulação de curvas dose-resposta. Embora o efeito máximo das estatinas sobre o LDL ocorra após 4-6 semanas de tratamento, a inibição da HMG-CoA redutase pela estatina ocorre instantaneamente. Logo, as concentrações plasmáticas de MVA são alteradas em função do tempo após a administração de dose única de estatina.

Além de reduzir as concentrações plasmáticas de LDL, as estatinas, em particular a ATV, diminui as concentrações plasmáticas de triglicérides (PRAMFALK et al., 2011; ROGLANS et al., 2002; SANGUINO et al., 2005). Porém, os mecanismos envolvidos na diminuição de triglicérides pelas estatinas ainda não são bem compreendidos. Estudos indicam que a ATV induz a expressão de receptores PPAR-α em células endoteliais, que quando ativados aumentam a endocitose e a β-oxidação hepática/muscular de ácidos graxos não esterificados (*non-esterified fatty acid* – NEFA) e assim, diminuem a disponibilidade de NEFAs para a síntese de triglicérides (INOUE et al., 2000; KELLER et al., 2000; SAHEBKAR et al., 2016b).

A ATV cálcica é administrada na sua forma ácida ativa, altamente solúvel e permeável (log $P_{octanol:água}$ 4,07) e sujeita a eliminação pré-sistêmica no intestino e no fígado (DUAN; ZHAO; ZHANG, 2017; ZHOU et al., 2013). Em um estudo realizado por Gibson et al. (1997), após administração oral de 10 mg, a biodisponibilidade da ATV é de 14%. A ATV, via UGT1A3 e com alguma contribuição da UGT1A1, via coenzima A ou não enzimaticamente em pH menor que 4, sofre interconversão ao metabólito lipofílico inativo ATV-LAC. As formas ácida e lactona da ATV são metabolizadas aos correspondentes p- e o- metabólitos hidroxilados via CYP3A4. Os metabólitos ativos p e o-OH-ATV ácida são responsáveis por 70% da atividade inibitória total da HMG-CoA redutase plasmática (LENNERNÄS, 2003; MACWAN et

al., 2011). Embora as formas lactona da ATV sejam inativas em relação aos efeitos hipolipemiantes, suas elevadas concentrações plasmáticas estão associadas com a manifestação de miopatia (HERMANN et al., 2006). Assim, as razões das concentrações plasmáticas metabólito lactona/fármaco inalterado são consideradas potenciais marcadores do risco de miopatia associado a ATV.

O transporte dos metabólitos ácidos da ATV via transportador de influxo sinusoidal OATPB1 é similar ao da ATV, enquanto o da lactona e de seus metabólitos hidroxilados ocorre em menor velocidade provavelmente porque a difusão passiva é um processo mais importante para as lactonas lipofílicas quando comparadas com as formas ácidas mais hidrofílicas. A ATV e seus metabólitos ácidos e lactonas são ativamente excretados para a bile via transportador MDR1 (*multi-drug resistance gene*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*) (BUCHER et al., 2011; DUAN; ZHAO; ZHANG, 2017; LENNERNÄS, 2003; NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006).

O clearance total da ATV é de 625 mL/min, a taxa de extração hepática (E_H) de 0,42 e o volume de distribuição de 381 L na administração de dose única intravenosa de 5 mg de ATV a voluntários sadios. A ligação da ATV às proteínas plasmáticas é maior que 90%. A meia-vida de eliminação da ATV é de 7 h, enquanto maiores valores (13-16 h) são reportados para os seus metabólitos ácidos ativos. A excreção renal é de pouca importância (<1%) na eliminação da ATV e seus metabólitos (GIBSON et al., 1997; LENNERNÄS, 2003).

O equilíbrio instantâneo entre a concentração livre de um fármaco no sangue e no fígado ocorre somente para fármacos lipofílicos que não dependem dos transportadores da membrana sinusoidal. A ATV representa um exemplo de fármaco em que o metabolismo e/ou excreção biliar constituem processos muito mais rápidos do que o transporte de influxo sinusoidal, ou seja, o seu clearance hepático depende do transporte de influxo sinusoidal e não do metabolismo, pois o clearance metabólico (CLm) somado ao clearance de efluxo canalicular ($CL^{c}ef$) é muito maior do que o clearance de efluxo sinusoidal ($CL^{s}ef$). Logo, o clearance hepático da ATV é dependente da atividade de OATPs presentes na membrana sinusoidal e não do CLm. Estudos anteriores mostram que a inibição de OATPs resulta em aumento de 12 vezes nos valores de AUC da ATV, enquanto a inibição do CYP3A4 não afeta as concentrações plasmáticas da ATV. No entanto, a inibição do CYP3A4 aumenta a exposição hepática da ATV e consequentemente altera a resposta farmacológica,

enquanto a inibição de OATPs altera a exposição sistêmica, mas não altera a exposição hepática (PATILEA-VRANA; UNADKAT, 2016).

As estatinas são frequentemente coadministradas com clássicos agonistas PPAR-α, como a GFZ, no tratamento de dislipidemias, principalmente aos pacientes que exibem altas concentrações plasmáticas de triglicérides. Ademais, a GFZ é um inibidor do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 e também inibi a glucuronidação das estatinas no intestino (BROWN, 2018; KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006; SANDO; KNIGHT, 2015). Embora a inibição da lactonização das estatinas pela GFZ seja teoricamente interessante, devido à pequena contribuição da glucuronidação no clearance das estatinas, ela parece não ter uma importância quantitativa nas interações GFZ com estatinas (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006).

A administração de doses múltiplas de GFZ (600 mg/12 h) por 7 dias a voluntários sadios aumenta a exposição sistêmica (AUC) da ATV em 1,24 a 1,35 vezes (dose única de 20 ou 40 mg de ATV) devido a inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1. A administração de GFZ aumenta a exposição sistêmica não somente da ATV inalterada, mas também de todos os seus metabólitos hidroxilados ácidos e lactonas, exceto do metabólito ATV-LAC, uma vez que a lipossolubilidade do referido metabólito é compatível com difusão passiva e não transporte dependente do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1. A razão de AUC ATV-LAC / ATV diminui (20-35%) durante a coadministração com GFZ, enquanto a razão da AUC para metabólitos hidroxilados ácidos e lactonas pela ATV aumenta (25-50%) (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006; WHITFIELD et al., 2011). O aumento da exposição sistêmica da ATV na associação com GFZ está associado com miopatia ou até mesmo com rabdomiólise somente em pacientes que fazem uso crônico da coadministração por mais de 2 meses (HANSEN et al., 2005; MIZRANITA; PRATISTO, 2015).

A redução na atividade dos transportadores de influxo, como o OATP1B1, dos transportadores de efluxo canalicular, como MDR1 e BCRP, e de enzimas implicadas no processo de metabolismo de fármacos, como CYP3A4, pode alterar a concentração de ATV no sangue e/ou no fígado, com consequente alteração da resposta farmacológica ou tóxica (DU SOUICH; ROEDERER; DUFOUR, 2017). Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar o efeito da doença inflamatória LES na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, avaliada com base

na farmacocinética e farmacodinâmica da ATV associada ou não a GFZ, um fármaco inibidor da atividade do transportador OATP1B1. As concentrações plasmáticas de ATV e seus cinco metabólitos serão usadas como parâmetros farmacocinéticos, enquanto as concentrações plasmáticas de MVA serão usadas como parâmetro farmacodinâmico da ATV.

II.2 OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo é avaliar o efeito do LES na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, empregando como parâmetros farmacocinéticos as concentrações plasmáticas da ATV e seus metabólitos e como parâmetro farmacodinâmico as concentrações plasmáticas de MVA.

Os objetivos específicos são:

- avaliar a atividade *in vivo* do CYP3A4 empregando como fármaco marcador o midazolam nas voluntárias sadias e nas pacientes com LES;
- avaliar as concentrações plasmáticas das citocinas IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-10, IL-1β, IL-8 e MCP-1 nas voluntárias sadias e nas pacientes com LES;
- descrever a farmacocinética da ATV e seus metabólitos nas voluntárias sadias e nas pacientes com LES;
- avaliar a influência da atividade do LES na farmacocinética da ATV;
- descrever a influência da GFZ na farmacocinética da ATV e seus metabólitos nas voluntárias sadias e nas pacientes com LES;
- validar as concentrações plasmáticas do MVA como marcador farmacodinâmico da resposta a ATV nas voluntárias sadias e nas pacientes com LES;
- avaliar a influência da administração de GFZ nas áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de MVA e as concentrações plasmáticas de ATV somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (o-OH-ATV e p-OH-ATV).

II.6 CONCLUSÃO

1-O clearance oral do midazolam, marcador da atividade do CYP3A4, não variou entre os grupos de voluntárias sadias, LES controlado (SLEDAI 0-4) e LES não controlado (SLEDAI 6-15), inferindo que o LES não altera o metabolismo da ATV dependente do CYP3A4.

2-As pacientes investigadas com LES controlado (SLEDAI 0-4) mostraram concentrações plasmáticas elevadas das citocinas MCP-1 e TNF-α, enquanto as pacientes com LES não controlado (SLEDAI 6-15) mostraram concentrações plasmáticas elevadas das citocinas MCP-1, TNF-α e IL-10.

3-As pacientes do grupo LES não controlado (SLEDAI 6-15) mostraram maiores valores de AUC (67,27 *vs* 35,04 ng.h/mL) e C_{max} (21,68 *vs* 9,52 ng/mL) e menores valores de clearance aparente (377,4 *vs* 742,9 L/h) e volume aparente de distribuição (3398 *vs* 9005 L) quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias. Em relação aos metabólitos da ATV, o LES não controlado aumentou os valores de AUC (100,70 *vs* 59,12 ng.h/mL) e C_{max} (10,78 *vs* 5,21 ng/mL) somente do metabólito inativo ATV-LAC.

4-A farmacocinética da ATV e seus metabólitos não difere entre os grupos LES controlado (SLEDAI 0-4) e voluntárias sadias, inferindo que a inflamação, e não a doença, é responsável pelas alterações descritas no grupo LES não controlado.

5-A administração de GFZ (600 mg/12 h durante 6 dias) para as pacientes do grupo LES não controlado (SLEDAI 6-15) resultou em aumento dos valores de AUC (96,16 *vs* 44,78 ng.h/mL) e C_{max} (34,13 *vs* 14,89 ng/mL) e menores valores de clearance aparente (238,30 *vs* 638,80 L/h) e volume aparente de distribuição (1939 *vs* 4596 L) quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias. Em relação aos metabólitos, foi obervado aumento da exposição sistêmica para os metabólitos o-OH-ATV ($AUC^{0-\infty}$ 183,20 *vs* 46,29 ng.h/mL), p-OH-ATV (AUC^{0-36h} 15,12 *vs* 2,33 ng.h/mL), ATV-LAC ($AUC^{0-\infty}$ 111,50 *vs* 59,12 ng.h/mL), o-OH-ATV-LAC ($AUC^{0-\infty}$ 194,20 *vs* 75,65 ng.h/mL) e p-OH-ATV-LAC (AUC^{0-36h} 34,27 *vs* 10,18 ng.h/mL).

6-A administração de dose única oral de ATV como monoterapia reduziu os valores de AUC^{0-24h} do MVA em aproximadamente 55,66% nas voluntárias sadias, 62,96% nas pacientes com LES controlado e 62,75% nas pacientes com LES não controlado, sem significância estatística entre os grupos.

7-A administração de GFZ (600 mg/12 h durante 6 dias) praticamente não altera as áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de MVA e as concentrações plasmáticas de ATV somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (o-OH-ATV e p-OH-ATV) no grupo de voluntárias sadias. No entanto, a administração de GFZ aumenta discretamente a área de histerese nas pacientes do grupo LES controlado e acentuadamente nas pacientes do grupo LES não controlado. Assim, as concentrações no plasma da ATV e metabólitos ativos não representam suas concentrações no fígado, particularmente no grupo de pacientes com LES não controlado.

REFERÊNCIAS

ABRAR, M.; MARTIN, P. D. Validation and application of an assay for the determination of mevalonic acid in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 773, n. 2, p. 103–111, 25 jun. 2002.

ABU-SHAKRA, M. et al. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. **The Journal of Rheumatology**, v. 22, n. 7, p. 1259–1264, jul. 1995.

AHMADI, Y.; GHORBANIHAGHJO, A.; ARGANI, H. The balance between induction and inhibition of mevalonate pathway regulates cancer suppression by statins: A review of molecular mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 273–285, 1 ago. 2017.

ANVISA, A. N. DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**, 17 maio 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2015

ASANUMA, Y. et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 25, p. 2407–2415, 18 dez. 2003.

ASANUMA, Y. et al. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. **The Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 3, p. 539–545, mar. 2006.

BACKMAN, J. T. et al. Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 78, n. 2, p. 154–167, ago. 2005.

BORGES, N. C. DO C. et al. Comparative bioavailability study with two gemfibrozil tablet formulations in healthy volunteers. **Arzneimittel-Forschung**, v. 55, n. 7, p. 382–386, 2005.

BROWN, W. V. Clinical Lipidology and the Prevention of Vascular Disease: Time for Personalized Therapy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 104, n. 2, p. 269–281, ago. 2018.

BUCHER, J. et al. A systems biology approach to dynamic modeling and inter-subject variability of statin pharmacokinetics in human hepatocytes. **BMC systems biology**, v. 5, p. 66, 6 maio 2011.

BUSSE, K. H. et al. Gemfibrozil concentrations are significantly decreased in the presence of lopinavir-ritonavir. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 52, n. 2, p. 235–239, 1 out. 2009.

CAI, L. et al. Simultaneous determination of atorvastatin and its metabolites in human

plasma by UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1038–1045, 9 fev. 2017.

CAVICCHIA, R. et al. Quality of life in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 31, n. 3, p. 88–92, 2013.

CRESSMAN, A. M.; PETROVIC, V.; PIQUETTE-MILLER, M. Inflammation-mediated changes in drug transporter expression/activity: implications for therapeutic drug response. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 69–89, jan. 2012.

DAS, R.; PAL, T. K. Validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for mevalonate in human plasma: Incompetent effects between treated atorvastatin & its combination with olmesartan in cardiovascular patients. **Journal of Young Pharmacists**, v. 6, n. 2, p. 50–57, 2014.

DAVIGNON, J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III39-43, 15 jun. 2004.

DE CARVALHO, J. F. et al. Anti-lipoprotein lipase antibodies: a new player in the complex atherosclerotic process in systemic lupus erythematosus? **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3610–3615, nov. 2004.

DE CARVALHO, J. F.; BONFÁ, E.; BORBA, E. F. Systemic lupus erythematosus and “lupus dyslipoproteinemia”. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 3, p. 246–250, jan. 2008.

DEMIR, S. et al. Metabolic syndrome is not only a risk factor for cardiovascular diseases in systemic lupus erythematosus but is also associated with cumulative organ damage: a cross-sectional analysis of 311 patients. **Lupus**, v. 25, n. 2, p. 177–184, fev. 2016.

DENG, L.-J.; WANG, F.; LI, H.-D. Effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of pioglitazone. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 831–836, dez. 2005.

DICKMANN, L. J. et al. Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 39, n. 8, p. 1415–1422, ago. 2011.

DON, B. R.; KAYSEN, G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. **Seminars in Dialysis**, v. 17, n. 6, p. 432–437, dez. 2004.

DU SOUICH, P.; ROEDERER, G.; DUFOUR, R. Myotoxicity of statins: Mechanism of action. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 1–16, jul. 2017.

DUAN, P.; ZHAO, P.; ZHANG, L. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pitavastatin and Atorvastatin to Predict Drug-Drug Interactions (DDIs). **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 689–705, ago. 2017.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. Power and sample size calculations. A review and computer program. **Controlled Clinical Trials**, v. 11, n. 2, p. 116–128, abr. 1990.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. **Controlled Clinical Trials**, v. 19, n. 6, p. 589–601, dez. 1998.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 2, p. d12-26, 1 jan. 1997.

FORLAND, S. C.; CHAPLIN, L.; CUTLER, R. E. Assay of gemfibrozil in plasma by “high-performance” liquid chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1938, out. 1987.

GABRIELSSON, J. **Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications**. 5th edition, revised and expanded ed. Stockholm: Apotekarsocieteten, 2016.

GANDHI, A.; MOORTHY, B.; GHOSE, R. Drug disposition in pathophysiological conditions. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 9, p. 1327–1344, nov. 2012.
GIBSON, D. M. et al. Absolute bioavailability of atorvastatin in man. **Pharmaceutical Research,** v. 14, n. 11, 30 nov. 1997.

GONZÁLEZ-PEÑAS, E. et al. A sensitive method for the determination of gemfibrozil in human plasma samples by RP-LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 1, p. 7–14, ago. 2001.

GOOSEN, T. C. et al. Atorvastatin glucuronidation is minimally and nonselectively inhibited by the fibrates gemfibrozil, fenofibrate, and fenofibric acid. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 35, n. 8, p. 1315–1324, ago. 2007.

GRIFFITHS, B.; MOSCA, M.; GORDON, C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 19, n. 5, p. 685–708, out. 2005.

HANSEN, K. E. et al. Outcomes in 45 patients with statin-associated myopathy. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n. 22, p. 2671–2676, 12 dez. 2005.

HENGY, H.; KÖLLE, E. U. Determination of gemfibrozil in plasma by high performance liquid chromatography. **Arzneimittel-Forschung**, v. 35, n. 11, p. 1637–1639, 1985.

HERMANN, M. et al. Exposure of atorvastatin is unchanged but lactone and acid metabolites are increased several-fold in patients with atorvastatin-induced myopathy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 79, n. 6, p. 532–539, jun. 2006.

HERMANN, M.; CHRISTENSEN, H.; REUBSAET, J. L. E. Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC-tandem MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 1242–1249, jul. 2005.

HERMANSEN, M.-L. et al. The risk of cardiovascular morbidity and cardiovascular mortality in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a Danish nationwide population-based cohort study. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 56, n. 5, p. 709–715, 01 2017.

HERMENING, A. et al. Gemfibrozil and its oxidative metabolites: quantification of aglycones, acyl glucuronides, and covalent adducts in samples from preclinical and clinical kinetic studies. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v. 741, n. 2, p. 129–144, 12 maio 2000.

HOFFMANN, G. F.; SWEETMAN, L. An improved chemical ionization assay for mevalonic acid. **Biomedical & Environmental Mass Spectrometry**, v. 19, n. 8, p. 517–519, ago. 1990.

HOFFMANN, M.; NOWOSIELSKI, M. DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 19, p. 3527–3531, 7 out. 2008.

HUANG, F. et al. Effect of Steady-State Faldaprevir on Pharmacokinetics of Atorvastatin or Rosuvastatin in Healthy Volunteers: A Prospective Open-Label, Fixed-Sequence Crossover Study. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 10, p. 1305–1314, 2017.

INOUE, I. et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of MRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. **Life Sciences**, v. 67, n. 8, p. 863–876, 14 jul. 2000.

ISHIHAMA, Y. et al. Simple and sensitive quantitation method for mevalonic acid in plasma using gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, v. 8, n. 5, p. 377–380, maio 1994.

JABOR, V. A. P. et al. A highly sensitive LC-MS-MS assay for analysis of midazolam and its major metabolite in human plasma: applications to drug metabolism. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 822, n. 1–2, p. 27–32, 5 ago. 2005.

JEMAL, M.; SCHUSTER, A.; WHIGAN, D. B. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, v. 17, n. 15, p. 1723–1734, 2003.

JEMAL, M.; XIA, Y. Q. Bioanalytical method validation design for the simultaneous quantitation of analytes that may undergo interconversion during analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 5, p. 813–827, jun. 2000.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 693–705, out. 2009.

KANG, X. et al. A high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of rosiglitazone and gemfibrozil in human plasma. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 7, p. 645–648, 1 mar. 2009.

KARLGREN, M. et al. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 4740–4763, 24 maio 2012.

KELLER, J. M. et al. Implications of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in development, cell life status and disease. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 44, n. 5, p. 429–442, ago. 2000.

KIM, C. H. et al. Incidence and risk of heart failure in systemic lupus erythematosus. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 103, n. 3, p. 227–233, 2017.

KIM, J. et al. A population pharmacokinetic-pharmacodynamic model for simvastatin that predicts low-density lipoprotein-cholesterol reduction in patients with primary hyperlipidaemia. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 3, p. 156–163, set. 2011.

KIM, S.; ÖSTÖR, A. J. K.; NISAR, M. K. Interleukin-6 and cytochrome-P450, reason for concern? **Rheumatology International**, v. 32, n. 9, p. 2601–2604, set. 2012.

KINDT, E.; SZEKELY-KLEPSER, G.; FOUNTAIN, S. T. The validation of a simple LC/MS/MS method for determining the level of mevalonic acid in human plasma. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 25, n. 3, p. 323–329, mar. 2011.

KWAK, B. et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nature Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1399–1402, dez. 2000.

LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 10, p. 1271–1294, 18 nov. 2002.

LANNA, C. C. D.; FERREIRA, G. A.; TELLES, R. W. Lúpus eritematoso sistêmico. In: CARVALHO, M. A. P.; LANNA, C. C. D.; BERTOLO, M. B.; FERREIRA, G. A. (Org.). **Reumatologia: Diagnóstico e Tratamento**. 4ª edição ed. São Paulo: AC FARMACÊUTICA, 2014. cap.24, p. 378-410.

LE VEE, M. et al. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 37, n. 3, p. 685–693, mar. 2009.

LENNERNÄS, H. Clinical Pharmacokinetics of Atorvastatin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 13, p. 1141–1160, 1 nov. 2003.

LIPTROTT, N. J.; OWEN, A. The role of cytokines in the regulation of drug disposition: extended functional pleiotropism? **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 7, n. 3, p. 341–352, mar. 2011.

LIU, Y.-M. et al. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two different atorvastatin calcium 10-mg tablets: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy fasted Chinese adult males. **Clinical Therapeutics**, v. 32, n. 7, p. 1396–1407, jul. 2010.

MACHAVARAM, K. K. et al. A physiologically based pharmacokinetic modeling approach to predict disease-drug interactions: suppression of CYP3A by IL-6. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 94, n. 2, p. 260–268, ago. 2013.

MACWAN, J. S. et al. Development and validation of a sensitive, simple, and rapid method for simultaneous quantitation of atorvastatin and its acid and lactone metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 2, p. 423–433, abr. 2011.

MALHOTRA, H. S.; GOA, K. L. Atorvastatin: an updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. **Drugs**, v. 61, n. 12, p. 1835–1881, 2001.

MCCARTHY, E. M. et al. The association of cytokines with disease activity and damage scores in systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 53, n. 9, p. 1586–1594, set. 2014.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Procedures for the isolation and quantification of the intermediates of the mevalonic acid pathway. **Analytical Biochemistry**, v. 215, n. 1, p. 142–149, 15 nov. 1993.

MIZRANITA, V.; PRATISTO, E. H. Statin-associated ocular disorders: the FDA and ADRAC data. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 844–850, out. 2015.

MOHAMMAD, S. et al. Bioequivalence Study of Atorvastatin Tablets in Healthy Pakistani Volunteers. **Therapie**, v. 70, n. 4, p. 329–335, ago. 2015.

MOSCA, M.; BOMBARDIERI, S. Assessing remission in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 24, n. 6 Suppl 43, p. S-99-104, dez. 2006.

MOSHAGE, H. J. et al. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 6, p. 1635–1641, jun. 1987.

NAKAGAWA, A. et al. Simultaneous determination of gemfibrozil and its metabolites in plasma and urine by a fully automated high performance liquid chromatographic system. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 5, n. 2, p. 68–73, mar. 1991.

NEUVONEN, P. J.; NIEMI, M.; BACKMAN, J. T. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 80, n. 6, p. 565–581, dez. 2006.

NIEMI, M. et al. Effects of gemfibrozil, itraconazole, and their combination on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide: potentially hazardous interaction between gemfibrozil and repaglinide. **Diabetologia**, v. 46, n. 3, p. 347–351, mar. 2003a.

NIEMI, M. et al. Gemfibrozil considerably increases the plasma concentrations of rosiglitazone. **Diabetologia**, v. 46, n. 10, p. 1319–1323, out. 2003b.

PAPPU, A. S.; ILLINGWORTH, D. R. Diurnal variations in the plasma concentrations of mevalonic acid in patients with abetalipoproteinaemia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24, n. 10, p. 698–702, out. 1994.

PARKER, T. S. et al. Plasma mevalonate as a measure of cholesterol synthesis in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 3, p. 795–804, set. 1984.

PARTANI, P. et al. Simultaneous quantitation of atorvastatin and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography/(-) electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 26–36, fev. 2014.

PATILEA-VRANA, G.; UNADKAT, J. D. Transport vs. Metabolism: What Determines the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drugs? Insights From the Extended Clearance Model. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 100, n. 5, p. 413–418, nov. 2016.

PERANDINI, L. A. et al. Exercise training can attenuate the inflammatory milieu in women with systemic lupus erythematosus. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 117, n. 6, p. 639–647, 15 set. 2014.

PETRI, M. et al. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus. A prospective cohort study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 34, n. 8, p. 937–944, ago. 1991.

PETRI, M. et al. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. **The American Journal of Medicine**, v. 93, n. 5, p. 513–519, nov. 1992.

PETRI, M. et al. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. **Lancet (London, England)**, v. 348, n. 9035, p. 1120–1124, 26 out. 1996.

PRAMFALK, C. et al. Effects of high-dose statin on the human hepatic expression of genes involved in carbohydrate and triglyceride metabolism. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 3, p. 333–339, mar. 2011.

RANDINITIS, E. J. et al. Gas chromatographic determination of gemfibrozil and its metabolites in plasma and urine. **Journal of Chromatography**, v. 307, n. 1, p. 210–215, 13 abr. 1984.

RANDINITIS, E. J.; PARKER, T. D.; KINKEL, A. W. Liquid chromatographic determination of gemfibrozil and its metabolite in plasma. **Journal of Chromatography**, v. 383, n. 2, p. 444–448, 19 dez. 1986.

ROADCAP, B. A. et al. Sensitive method for the quantitative determination of gemfibrozil in dog plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 791, n. 1–2, p. 161–170, 5 jul. 2003.

RODRIGUES, A. V. M. et al. Quantification of urinary mevalonic acid as a biomarker of HMG-CoA reductase activity by a novel translational LC-MS/MS method. **Bioanalysis**, v. 6, n. 7, p. 919–933, abr. 2014.

ROGLANS, N. et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 1, p. 232–239, jul. 2002.

ROWER, J. E. et al. Validation of an LC/MS method for the determination of gemfibrozil in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 24, n. 12, p. 1300–1308, dez. 2010.

RUBIN, L. A.; UROWITZ, M. B.; GLADMAN, D. D. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 55, n. 216, p. 87–98, abr. 1985.

RUOT, B. et al. The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 102, n. 1, p. 107–114, jan. 2002.

SAHEBKAR, A. et al. Statin impact on disease activity and C-reactive protein concentrations in systemic lupus erythematosus patients: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 4, p. 344–353, abr. 2016a.

SAHEBKAR, A. et al. Statin therapy and plasma free fatty acids: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 5, p. 807–818, maio 2016b.

SAINI, G. S. et al. Validation of the LC-MS/MS method for the quantification of mevalonic acid in human plasma and determination of the matrix effect. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 10, p. 2340–2345, out. 2006.

SANDO, K. R.; KNIGHT, M. Nonstatin therapies for management of dyslipidemia: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 10, p. 2153–2179, 1 out. 2015.

SANGUINO, E. et al. Atorvastatin reverses age-related reduction in rat hepatic PPARalpha and HNF-4. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 7, p. 853–861, ago. 2005.

SCHNECK, D. W. et al. The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 75, n. 5, p. 455–463, maio 2004.

SCHULZ, I. [Treatment of dyslipidemia: how and when to combine lipid lowering drugs]. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 344–359, abr. 2006.

SEIFERT, S. M. et al. Inflammation and pharmacokinetics: potential implications for HIV-infection. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 641–650, jun. 2017.

SHAH, R. R.; SMITH, R. L. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 222–240, fev. 2015a.

SHAH, R. R.; SMITH, R. L. Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 43, n. 3, p. 400–410, mar. 2015b.

SHARMA, P. et al. Prediction of the in vivo OATP1B1-mediated drug-drug interaction potential of an investigational drug against a range of statins. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 244–255, 30 ago. 2012.

SHITARA, Y. et al. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 34, n. 1, p. 45–78, jan. 2013.

SHOVMAN, O. et al. Antiinflammatory and immunomodulatory properties of statins. **Immunologic Research**, v. 25, n. 3, p. 271–285, 2002.

SIERRA VILLAR, A. M. et al. Validated spectrofluorometric method for determination of gemfibrozil in self nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 113, p. 22–27, set. 2013.

SKOTTHEIM, I. B. et al. Statin induced myotoxicity: the lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 4–5, p. 317–325, 23 abr. 2008.

SLAVIERO, K. A.; CLARKE, S. J.; RIVORY, L. P. Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. **The Lancet. Oncology**, v. 4, n. 4, p. 224–232, abr. 2003.

SMITH, D. A.; DI, L.; KERNS, E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 9, n. 12, p. 929–939, 2010.

STIEGER, B.; MEIER, P. J. Pharmacogenetics of drug transporters in the enterohepatic circulation. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 5, p. 611–631, maio 2011.

SZABÓ, M. Z.; SZODORAY, P.; KISS, E. Dyslipidemia in systemic lupus erythematosus. **Immunologic Research**, v. 65, n. 2, p. 543–550, 2017.

TAN, E. M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n. 11, p. 1271–1277, nov. 1982.

TORNIO, A. et al. The effect of gemfibrozil on repaglinide pharmacokinetics persists for at least 12 h after the dose: evidence for mechanism-based inhibition of CYP2C8 in vivo. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 403–411, set. 2008.

TSOKOS, G. C. Systemic lupus erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 22, p. 2110–2121, 1 dez. 2011.

TURNER, R. M. et al. Development, validation and application of a novel HPLC-MS/MS method for the quantification of atorvastatin, bisoprolol and clopidogrel in a large cardiovascular patient cohort. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 159, p. 272–281, 10 set. 2018.

ULVESTAD, M. et al. Impact of OATP1B1, MDR1, and CYP3A4 expression in liver and intestine on interpatient pharmacokinetic variability of atorvastatin in obese subjects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 93, n. 3, p. 275–282, mar. 2013.

UROWITZ, M. B. et al. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. **The American Journal of Medicine**, v. 60, n. 2, p. 221–225, fev. 1976.

VITTAL, S. et al. Simultaneous quantitation of rosuvastatin and gemfibrozil in human plasma by high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 20, n. 11, p. 1252–1259, nov. 2006.

WALDRON, J.; WEBSTER, C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the measurement of serum mevalonic acid: a novel marker of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition by statins. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, n. Pt 3, p. 223–232, maio 2011.

WARD, M. M. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 2, p. 338–346, fev. 1999.

WHITFIELD, L. R. et al. Effect of gemfibrozil and fenofibrate on the pharmacokinetics of atorvastatin. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 378–388, mar. 2011.

WILLIAMS, D.; FEELY, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, n. 5, p. 343–370, 2002.

ZHOU, Y. et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of amlodipine, atorvastatin and its metabolites ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma and its application in a bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 101–107, set. 2013.