



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas do citocromo P450 e transportadores de membranas em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática

Leandro Francisco Pippa

**Ribeirão Preto
2022**

LEANDRO FRANCISCO PIPPA

Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas do citocromo P450 e transportadores de membranas em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática

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.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 23/02/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

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.

Pippa, Leandro Francisco

Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas do citocromo P450 e transportadores de membranas em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática. Ribeirão Preto, 2022.

92 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia.

1. Hepatite C. crônica. 2. Inflamação. 3. Farmacocinética clínica. 4. Fármacos marcadores. 5. CYP. 6. Transportadores de membrana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leandro Francisco Pippa

Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas do citocromo P450 e transportadores de membranas em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática.

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: 23/02/2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos grandes professores e mestres — formados pelas instituições ou pela experiência de vida — que com sua paixão e conhecimento me inspiraram e incentivaram durante a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote**, pelas portas sempre abertas, pelas oportunidades oferecidas em seu grupo de pesquisa, pela generosidade e comprometimento ao ensinar ciência, pelos momentos de discussões e reflexões diversas, por sua paciência e pelo apoio profissional e pessoal, essenciais para o meu desenvolvimento humano e científico. Agradeço especialmente por sua confiança continuamente renovada em mim, que me motivou nos dias mais prósperos e nos dias mais difíceis.

A todos os envolvidos neste trabalho, especialmente a

Dra. Rosamar Eulira Fontes Rezende, pelo empenho e suporte na coordenação clínica do estudo e atenção na discussão e correção dos trabalhos,

Dra. Carolina Pinto Vieira e Dra. Juciene Aparecida Caris, pela inclusão dos participantes e desenvolvimento da etapa clínica do estudo,

Dra. Adriana Rocha e Dra. Maria Paula Marques Pereira, pela extensa contribuição na etapa analítica do estudo, pelo treinamento laboratorial ao longo dos anos e pela companhia em longas horas de bancada,

e **Dr. Glauco Henrique Balthazar Nardotto**, pelas contribuições e discussões na etapa de análise de dados e pela disponibilidade em compartilhar.

Aos **funcionários do Centro de Referência em Especialidades Central "Enfermeira Maria da Conceição da Silva"** da Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto e da **Unidade de Pesquisa Clínica** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela competência no cuidado dos pacientes e na coleta de amostras.

Aos demais colegas e amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacocinética Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Dra. Ana Carolina Conchon Costa, Dr. Daniel Valente Neves, Dr. Diego Alberto Ciscato Cusinato, Dra. Fernanda Lima Moreira, Ma. Grazielle de Fátima Pinto Rodrigues, Me. Jhohann Richard de Lima Benzi,**

Dr. João Paulo Bianchi Ximenez, Sra. Maria Martha Tarozzo, Dra. Milena Locci de Oliveira, Dra. Roberta Natália Cestari e Ma. Vitoria Carolina Rondon Pereira pela amizade, pelas discussões científicas, pela constante troca de conhecimentos durante manhãs, tardes e noites de dias úteis ou fins de semana.

À Presidente da Comissão de Pós-Graduação, **Prof. Dra. Mônica Tallarico Pupo** e às Coordenadoras passada e atual do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, **Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira e Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes** por toda dedicação, pelo apoio e orientação que recebi durante este período.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, **Sra. Rosana Florêncio e Sra. Rosemary Ioshimine Gerolineto** pelo suporte, orientação, direcionamento e, principalmente, acolhimento oferecidos.

Aos **participantes** que se dispuseram a participar desta pesquisa clínica e contribuíram para meu desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

A todos aqueles não citados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001, do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq)** – processos nº 165620/2018-8 e nº 303142/2019-7 e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – SP, Brasil (FAPESP)** – processo nº 2018/05616-3 (Projeto Temático).

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da CAPES, CNPq ou FAPESP”.

“Neste momento, o aspecto mais triste da vida é que a ciência é capaz de concentrar conhecimento mais rapidamente do que a sociedade reúne sabedoria.”

Isaac Asimov

Isaac Asimov's Book of Science and Nature Quotations, 1988, p. 281.

RESUMO

PIPPA, L. F. **Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas do citocromo P450 e transportadores de membranas em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática.** 2022. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A hepatite C crônica é uma infecção do fígado, o principal órgão envolvido na distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos. Neste estudo, investigamos participantes com hepatite C crônica ($n = 28$), genótipos 1 e 3 do vírus da hepatite C, um dia antes do início do tratamento com agentes antivirais de ação direta (Fase 1) e até 30 dias após a avaliação da resposta virológica sustentada (Fase 2), alocados nos Grupos 1 ($n = 15$; F0/F1 e F2, fibrose hepática leve a moderada) e 2 ($n = 13$; F3 e F4, estágios avançados de fibrose/cirrose hepática) quanto à atividade das isoformas do citocromo P450 (CYP) e transportadores de membrana utilizando um coquetel de fármacos marcadores. Os participantes receberam, nas Fases 1 e 2, uma cápsula gelatinosa por via oral contendo cafeína (10 mg), losartana (2 mg), fexofenadina (10 mg), omeprazol (2 mg), metoprolol (10 mg), rosuvastatina (2 mg) e metformina (50 mg). Os fármacos inalterados e seus metabólitos em plasma foram analisados por LC-MS/MS em amostras de plasma coletadas 4 h (cálculo de razões metabólicas) ou no intervalo 0–48 h (cálculo de área sob a curva concentração plasmática vs. tempo; AUC) após a administração do coquetel. Os dados foram apresentados como médias geométricas ou medianas e intervalo de confiança de 90% das razões entre as Fases 1 e 2 ou entre os Grupos 1 e 2, empregando os testes t , Wilcoxon ou MannWhitney. A atividade da CYP2C19 (5-hidroxiomeprazol/omeprazol) foi reduzida em 37% [razão 1,63 (1,32–2,00), $p < 0,01$] na Fase 1 para os participantes do Grupo 1, enquanto a atividade da CYP3A (omeprazol-sulfona/ omeprazol) foi reduzida em 64% [razão 1,46 (1,08–1,98), $p < 0,05$] na Fase 1 somente para o Grupo 2. A atividade do OATP1B1 & BCRP (AUC da rosuvastatina) foi reduzida nos Grupos 1 e 2, respectivamente, em 25% [razão 0,75 (0,53–0,82), $p < 0,01$] e 31% [razão 0,69 (0,46–0,85), $p < 0,05$] na Fase 1 quando comparada à Fase 2. As atividades da CYP1A2 (paraxantina/cafeína), CYP2C9 (E-3174/losartana) e CYP2D6 (alfa-hidroxi metoprolol/metoprolol) foram reduzidas, respectivamente, em 57% [razão 0,43 (0,28–0,66), $p < 0,01$], 52% [razão 0,48 (0,31–0,72), $p < 0,01$] e 54% [razão 0,46 (0,26–0,82), $p < 0,05$] no Grupo 2 quando comparadas ao Grupo 1 na Fase 1. As atividades da CYP1A2 e CYP2C19 foram reduzidas, respectivamente, em 57% [razão 0,43 (0,28–0,65), ($p < 0,01$)] e 43% [razão 0,57 (0,36–0,91), $p < 0,05$] no Grupo 2 quando comparadas ao Grupo 1 na Fase 2. A atividade de OATP1B1 & BCRP foi reduzida nas Fases 1 e 2, respectivamente em 49% [razão 1,51 (1,17–2,20), $p < 0,05$] e 61% [razão 1,39 (1,16–2,02), $p < 0,01$] no Grupo 2 quando comparada ao Grupo 1. A atividade da P-gp (AUC da fexofenadina) não diferiu entre os Grupos 1 e 2 em ambas as fases ou entre as Fases 1 e 2 em ambos os grupos. Assim, o presente estudo reforça que a administração de medicamentos de baixo índice terapêutico, substratos de todas as isoformas CYP investigadas e de OATP1B1 & BCRP, deve levar em consideração a fase do tratamento e o estágio da hepatite C crônica.

Palavras-chave: Hepatite C crônica, inflamação, farmacocinética clínica, fármacos marcadores, CYP, transportadores de membrana.

ABSTRACT

PIPPA, L. F. **Effect of chronic hepatitis C on the activity of the main cytochrome P450 isoforms and membrane transporters on patients with different stages of hepatic fibrosis.** 2022. 92f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Chronic hepatitis C is a hepatic infection, the main organ involved in drug distribution, metabolism, and elimination of drugs. In this study, we investigated participants with chronic hepatitis C ($n = 28$), hepatitis C virus genotypes 1 and 3, one day before the beginning of the treatment with direct-acting antiviral agents (Phase 1) and up to 30 days after the assessment of the sustained virologic response (Phase 2), allocated in Groups 1 ($n = 15$; F0/F1 and F2, mild to moderate hepatic fibrosis) and 2 ($n = 13$; F3 and F4, advanced stages of hepatic fibrosis/cirrhosis) for the activity of cytochrome P450 (CYP) isoforms and membrane transporters applying a cocktail of probe drugs. In both Phases 1 and 2, participants received an oral gelatine capsule containing caffeine (10 mg), losartan (2 mg), fexofenadine (10 mg), omeprazole (2 mg), metoprolol (10 mg), rosuvastatin (2 mg), and metformin (50 mg). The unchanged drugs and their metabolites were analysed by LC-MS/MS in plasma samples collected at 4 h (determination of metabolic ratios) or in the range of 0–48 h (area under the plasma concentration vs time curve; AUC) after the cocktail administration. Data were presented as geometric means or medians and 90% confidence intervals of the ratios between Phases 1 and 2, or between Groups 1 and 2, applying t , Wilcoxon, or Mann-Whitney tests. CYP2C19 (5-hydroxyomeprazole/omeprazole) activity was reduced by 37% [ratio 1.63 (1.32–2.00), $p < 0.01$] in Phase 1 for Group 1, while CYP3A (omeprazole-sulfone/omeprazole) activity was reduced by 64% [ratio 1.46 (1.08–1.98), $p < 0.05$] in Phase 1 only for Group 2. OATP1B1 & BCRP activity (rosuvastatin AUC) was reduced in Groups 1 and 2, respectively, by 25% [ratio 0.75 (0.53–0.82), $p < 0.01$] and 31% [ratio 0.69 (0.46–0.85), $p < 0.05$] in Phase 1 when compared to Phase 2. The activities of CYP1A2 (paraxanthine/caffeine), CYP2C9 (E-3174/losartan), and CYP2D6 (alpha-hydroxymetoprolol/metoprolol) were reduced, respectively, by 57% [ratio 0.43 (0.28–0.66), $p < 0.01$], 52% [ratio 0.48 (0.31–0.72), $p < 0.01$], and 54% [ratio 0.46 (0.26–0.82), $p < 0.05$] in Group 2 when compared to Group 1 in Phase 1. CYP1A2 and CYP2C19 activities were reduced, respectively, by 57% [ratio 0.43 (0.28–0.65), ($p < 0,01$)] and 43% [ratio 0.57 (0.36–0.91), $p < 0.05$] in Group 2 when compared to Group 1 in Phase 2. OATP1B1 & BCRP activity was reduced in Phases 1 and 2, respectively, by 49% [ratio 1.51 (1.17–2.20), $p < 0.05$] and 61% [ratio 1.39 (1.16– 2.02), $p < 0.01$] in Group 2 when compared to Group 1. The activity of P-gp (fexofenadine AUC) did not differ between Groups 1 and 2 in either phase or between Phases 1 and 2 in either group. Thus, the present study reinforces that the administration of drugs with low therapeutic indexes, substrates of any of the assessed CYP isoforms or OATP1B1 & BCRP, should consider the evolution of the treatment and the stage of chronic hepatitis C.

Keywords: chronic hepatitis C, inflammation, clinical pharmacokinetics, probe drugs, CYP, membrane transporters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fases do protocolo clínico.....	22
Figura 2:	Cromatogramas referentes à análise de plasma branco (A) e plasma branco enriquecido com a solução padrão na concentração do limite inferior de quantificação (B) monitorados nas transições do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroximetoprolol) e padrão interno tramadol.	35
Figura 3:	Cromatogramas referentes à análise de plasma branco enriquecido com solução padrão na concentração $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A) e amostra de participante com hepatite C crônica (B) monitorados nas transições do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroximetoprolol) e padrão interno tramadol.	36
Figura 4:	Cromatogramas referentes à análise de plasma branco (A) e plasma branco enriquecido com a solução padrão na concentração do limite inferior de quantificação (B) monitorados nas transições da rosuvastatina e padrão interno rosuvastatina-D3.....	39
Figura 5:	Cromatogramas referentes a amostra de plasma branco enriquecido com solução padrão na concentração $4.000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma (A) e amostra de participante com hepatite C crônica (B) monitorados nas transições do da rosuvastatina e padrão interno rosuvastatina-D3.....	40
Figura 6:	Curvas de concentração plasmática da rosuvastatina <i>versus</i> tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (2 mg de rosuvastatina) em 15 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 1.	42
Figura 7:	Curvas de concentração plasmática da rosuvastatina <i>versus</i> tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (2 mg de rosuvastatina) em 13 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 2.	43
Figura 8:	Curvas de concentração plasmática da fexofenadina <i>versus</i> tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (10 mg de fexofenadina) em 15 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 1.	44
Figura 9:	Curvas de concentração plasmática da fexofenadina <i>versus</i> tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (10 mg de fexofenadina) em 13 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 2.	45

- Figura 10:** Correlação linear entre $AUC^{0-\infty}$ observado (calculado com base no método dos trapezoides empregando o programa Phoenix WinNonlin™) e $AUC^{0-\infty}$ estimado (calculado com base na equação. $AUC^{0-\infty} = C_{max} \times 4,4198 + 54,112$ (RUSSELL; STOLTZ; WEIR, 1998; SRINIVAS, 2016))...... 46
- Figura 11:** Gráficos *boxplots* das atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A e transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP e P-gp avaliados em 28 participantes portadores de hepatite C crônica alocados nos Grupos 1 e 2..... 47
- Figura 12:** Gráfico *boxplot* da atividade da enzima metabolizadora CYP2C19 avaliados em 28 participantes portadores de hepatite C crônica alocados nos Grupos 1 e 2, incluindo os valores atípicos do participante 13G1..... 48
- Figura 13:** Dados plotados como histogramas de densidade de probabilidade e gráficos quantil-quantil (Q-Q) para os valores originais e valores log-transformados..... 49
- Figura 14:** Gráficos de bioequivalência das atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP e P-gp..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Concentrações das soluções de controles de qualidade utilizadas no método de análise do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e seu metabólito alfa-hidroximetoprolol) e do método de análise da rosuvastatina em plasma.....	28
Tabela 2:	Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos participantes com hepatite C crônica. Dados apresentados como média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação.....	34
Tabela 3:	Limites de confiança do método de análise da omeprazol, 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona em plasma humano.	37
Tabela 4:	Limites de confiança do método de análise do metoprolol e alfa-hidroximetoprolol em plasma humano.....	38
Tabela 5:	Limites de confiança do método de análise da rosuvastatina em plasma humano.	41
Tabela 6:	Teste de Shapiro-Wilk para dados brutos e dados log-transformados...	50
Tabela 7:	Atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, e CYP3A e do transportador de membrana P-gp comparando as Fases 1 e 2 de cada grupo analisadas pelo teste <i>t</i> para amostras pareadas. Dados apresentados como média geométrica (intervalo de confiança geométrico 90%).	51
Tabela 8:	Atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A e do transportador de membrana P-gp comparando os Grupos 1 e 2 em cada fase analisados pelo teste <i>t</i> para amostras não-pareadas. Dados apresentados como média geométrica (intervalo de confiança geométrico 90%).	52
Tabela 9:	Atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP comparando as Fases 1 e 2 de cada grupo analisadas pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Dados apresentados como mediana (amplitude interquartil P5–P95) e mediana (intervalo de confiança 90%).	53
Tabela 10:	Atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP comparando os Grupos 1 e 2 em cada fase analisados pelo teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas. Dados apresentados como mediana (amplitude interquartil P5–P95) e mediana (intervalo de confiança 90%).	53
Tabela 11:	Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos participantes portadores de hepatite C crônica dos 15 participantes portadores de hepatite C crônica alocados no Grupo 1.....	77

Tabela 12: Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos participantes portadores de hepatite C crônica dos 13 participantes portadores de hepatite C crônica alocados no Grupo 2.....	78
Tabela 13: Dados individuais do estadiamento da fibrose hepática e regime antiviral de ação direta dos participantes do estudo com hepatite C crônica ($n = 28$).....	79
Tabela 14: Atividade da enzima metabolizadora CYP1A2 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 10 mg de cafeína) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.	80
Tabela 15: Atividade da enzima metabolizadora CYP1C9 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de losartana) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.	81
Tabela 16: Atividade da enzima metabolizadora CYP2C19 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de omeprazol) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.	82
Tabela 17: Atividade da enzima metabolizadora CYP2D6 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 10 mg de metoprolol) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.	83
Tabela 18: Atividade da enzima metabolizadora CYP3A (4 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de omeprazol) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.....	84
Tabela 19: Atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP analisado como área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo (após a administração do coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de rosuvastatina) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.....	85
Tabela 20: Atividade do transportador de membrana P-gp analisado como área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo (após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 10 mg de fexofenadina) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-OH-OME	5-hidroxiomeprazol
AADs	antivirais de ação direta
ABC	família de transportadores de cassetes de ligação de ATP
ABCC2	cassete de ligação de ATP subfamília C membro 2
ALT	alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartato aminotransferase
AUC	área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo
BCRP	proteína de resistência do câncer de mama
BSEP	bomba excretora de sais biliares
CAF	cafeína
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
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
CQM ₁	controle de qualidade de média concentração 1
CQM ₂	controle de qualidade de média concentração 2
CV	coeficiente de variação
CXCL	quimiocina
CXCL-9	quimiocina 9
CXCL-10	quimiocina 10
CXCL-11	quimiocina 11
CYP	superfamília de proteínas citocromo P450
CYP1A1	citocromo P450 família 1 subfamília A gene identificador 1
CYP1A2	citocromo P450 família 1 subfamília A gene identificador 2

CYP2B6	citocromo P450 família 2 subfamília B gene identificador 6
CYP2C9	citocromo P450 família 2 subfamília C gene identificador 9
CYP2C19	citocromo P450 família 2 subfamília C gene identificador 19
CYP2D6	citocromo P450 família 2 subfamília D gene identificador 6
CYP2E1	citocromo P450 família 2 subfamília E gene identificador 1
CYP3A	citocromo P450 família 3 subfamília A
CYP3A4	citocromo P450 família 3 subfamília A gene identificador 3
DP	desvio padrão
E-3174	losartana ácido carboxílico E-3174
EPR	erro padrão relativo
ESI	ionização por eletronebulização
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
F0/F1	fibrose hepática inicial
F2	fibrose hepática moderada
F3	fibrose hepática grave
F4	cirrose hepática – Child-Pugh A
FMN	fator de matriz normalizado por padrão interno
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IC 90%	intervalo de confiança 90%
IFN- γ	interferon-gama
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
IL-7	interleucina 7
IL-8	interleucina 8
IL-12	interleucina 12
IL-17A	interleucina 17A
INR	razão internacional normalizada

LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LIQ	limite inferior de quantificação
LOS	losartana
LSQ	limite superior de quantificação
[M + H] ⁺	íon protonado
MATE1	proteína de extrusão de fármacos e toxinas 1
<i>MDR1</i>	gene de resistência múltipla 1
<i>MDR3</i>	gene de resistência múltipla 1
MET	metoprolol
mRNA	RNA mensageiro
MRP1	proteína de resistência a múltiplas drogas 1
MRP2	proteína de resistência a múltiplas drogas 2
MRP3	proteína de resistência a múltiplas drogas 3
MRP4	proteína de resistência a múltiplas drogas 4
NS5A	proteína não-estrutural A
NTCP	proteína cotransportadora de Na ⁺ e taurocolato
OAT2	transportador de ânions orgânicos 3
OAT3	transportador de ânions orgânicos 3
OATP	polipeptídios transportadores de ânions orgânicos
OATP1B1	transportador de ânions orgânicos família 1 subfamília B identificador 1
OATP1B3	transportador de ânions orgânicos família 1 subfamília B identificador 3
OATP2B1	transportador de ânions orgânicos família 2 subfamília B identificador 1
OCT1	transportador de cátions orgânicos 1
OME-S	omeprazol-sulfona
OME	omeprazol
P5–P95	amplitude interquartil 5%–95%
P-gp	glicoproteína P

PI	padrão interno
PRX	paraxantina
RM	razão metabólica
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SLC	família dos transportadores de soluto
SRM	monitoramento de reações selecionadas
Th2	células T-Helper 2
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
UGT	uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase
UGT1A1	uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase família 1 subfamília A gene 1
UGT1A3	uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase família 1 subfamília A gene 3
UGT2B7	uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase família 2 subfamília B gene 7
UGT2B15	uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase família 2 subfamília B gene 15
UHPLC-MS/MS	cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial
USP	Universidade de São Paulo
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
v/v	volme/volume
VHC	vírus da hepatite C
α -OH-MET	alfa-hidroximetoprolol

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
™	trademark
$AUC^{0-\infty}$	área sob a curva concentração plasmática <i>versus</i> tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito
C_{max}	de concentração plasmática máxima

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	V
Lista de abreviaturas e siglas	VII
Lista de símbolos	XI
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	19
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1. Estudo clínico	20
3.1.1. Aspectos éticos	20
3.1.2. Protocolo clínico.....	20
3.2. Métodos	22
3.2.1. Análise dos fármacos marcadores em plasma	22
3.2.1.1. Análise da cafeína e metabólito paraxantina em plasma	23
3.2.1.2. Análise da losartana e metabólito ácido carboxílico E-3174 em plasma	24
3.2.1.3. Análise da fexofenadina em plasma.....	24
3.2.1.4. Análise do omeprazol e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona e análise do metoprolol e seu metabólito alfa-hidroximetoprolol em plasma.....	25
3.2.1.5. Análise da rosuvastatina em plasma	26
3.2.1.6. Análise da metformina em plasma	27
3.2.3. Análise farmacocinética	31
3.2.4. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICES	75
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	75
APÊNDICE B: Dados individuais antropométricos, bioquímicos e de estadiamento da fibrose hepática dos 28 participantes investigados.....	77
APÊNDICE C: Dados individuais das quantificações do coquetel de fármacos marcadores dos 28 participantes investigados.....	80
ANEXOS	87
ANEXO A: Parecer de aprovação do CEP/FCFRP – USP	87
ANEXO B: Parecer de aprovação do CEP/HCFMRP – USP	90

1. INTRODUÇÃO

Estados inflamatórios com elevadas concentrações plasmáticas de citocinas modulam a expressão de isoformas da superfamília de proteínas citocromo P450 (CYP), podendo alterar o metabolismo de primeira passagem de fármacos pelo fígado, bem como o *clearance* dessas moléculas (AITKEN; RICHARDSON; MORGAN, 2006; BERTILSSON; OLSSON; MAGNUSSON, 2001; MORGAN, 2009). Pacientes com quadros inflamatórios, decorrentes ou não de doenças infecciosas, podem ter a reversão do estado inibitório quando tratados com inibidores de citocinas (*cytokine-modulating therapeutic proteins*), evidenciando um tipo de interação chamada doença-medicamento (KIM; ÖSTÖR; NISAR, 2012; MORGAN, 2009; SCHMITT et al., 2011). A interleucina 6 (IL-6) é um dos principais mediadores pró-inflamatórios com inibição de várias isoformas CYP (FRYE et al., 2002; KIM; ÖSTÖR; NISAR, 2012; MAYO et al., 2000; RIVORY; SLAVIERO; CLARKE, 2002), tanto em estudos *in vitro* quanto em estudos *in vivo* (CHEN et al., 1994; FRYE et al., 2002; MACHAVARAM et al., 2013; MORGAN, 2009; SCHMITT et al., 2011).

Um estudo realizado com pacientes submetidos à cirurgia de quadril, um modelo de inflamação aguda, investigou os pacientes quanto à atividade das isoformas CYP1A2 (cafeína), CYP2B6 (bupropiona), CYP2C9 (flurbiprofeno), CYP2C19 (omeprazol), CYP2D6 (dextrometorfano) e CYP3A (midazolam) utilizando o coquetel de Genebra. O estudo concluiu que a inflamação aguda modula a atividade das enzimas CYP de maneira específica para cada isoforma e com magnitudes distintas. As isoformas CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A foram suprimidas (respectivamente em 53, 57 e 61%), enquanto as isoformas CYP2B6 e CYP2C9 foram induzidas (respectivamente 120 e 79%) e a CYP2D6 mostrou-se inalterada na fase aguda da inflamação (LENOIR et al., 2021a). O estudo também mostrou que as concentrações plasmáticas aumentadas de IL-6 mostraram correlação com a supressão da CYP3A. Outro estudo do mesmo grupo corroborou o entendimento da especificidade na modulação das diferentes isoformas CYP ao investigar pacientes com quadros de síndrome respiratória aguda grave causada pela infecção por SARS-CoV-2, utilizando o mesmo coquetel de fármacos marcadores mencionado (LENOIR et al., 2021b). Os dados também mostraram supressão das isoformas CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A (respectivamente em 53, 75 e 23%), indução das isoformas CYP2B6 e CYP2C9 (respectivamente 56 e 101%) e ausência de alteração

da isoforma CYP2D6. Em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, pacientes com leishmaniose visceral foram investigados com um coquetel de fármacos marcadores midazolam (CYP3A), omeprazol (CYP2C19) e losartana (CYP2C9) antes do tratamento e após o tratamento para leishmaniose. A análise das razões metabólicas dos fármacos revelou que as atividades das isoformas CYP3A e CYP2C19 estavam significativamente reduzidas na fase aguda da inflamação, devido às altas concentrações de IL-6 ($26 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ antes do tratamento e de $1 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ após o tratamento) (LANCHOTE et al., 2015).

A inflamação crônica resulta na ativação constante de células imunes por antígenos. O acúmulo e ativação de macrófagos que liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) podem alterar a expressão de enzimas metabolizadoras e transportadores de membranas com relevantes consequências farmacocinéticas (AITKEN; RICHARDSON; MORGAN, 2006; CRESSMAN; PETROVIC; PIQUETTE-MILLER, 2012; LIPTROTT; OWEN, 2011; MORGAN et al., 2008; PETROVIC; TENG; PIQUETTE-MILLER, 2007; RENTON, 2005; SLAVIERO; CLARKE; RIVORY, 2003). A concentração de proteínas plasmáticas também é alterada durante a inflamação (HOICHEPIED et al., 2003; MOSHAGE et al., 1987), bem como mudanças no volume corpóreo e diminuição da acidez intestinal (BEALES; CALAM, 1998; SEIFERT et al., 2017).

Estudos *in vitro* (AITKEN; MORGAN, 2007; DICKMANN et al., 2011), *in silico* (MACHAVARAM et al., 2013) e clínicos (ALMEIDA et al., 2021; CARIS et al., 2020; CESTARI et al., 2020; LANCHOTE et al., 2015; LENOIR et al., 2021a, 2021b) demonstram que concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 suprimem a expressão e consequentemente a atividade de múltiplas isoformas CYP. As concentrações plasmáticas de IL-6 em voluntários saudáveis variam entre 1 a $10 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, mas podem aumentar para concentrações plasmáticas de $10\text{--}1500 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pacientes com doenças inflamatórias, tais como a artrite reumatoide (MACHAVARAM et al., 2013; SCHMITT et al., 2011). Em culturas de hepatócitos humanos, altas concentrações de IL-6 ($10\text{--}12 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) resultam na diminuição de mais de 90% na expressão da CYP3A4 (AITKEN; MORGAN, 2007; DICKMANN et al., 2011; SCHMITT et al., 2011). Estudos *in silico* utilizando modelos de farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK) empregaram dados de estudos *in vitro* da atividade da CYP3A4 para simular na clínica as interações doença-medicamento reportadas com os fármacos sinvastatina e ciclosporina. Os voluntários saudáveis virtuais com concentrações plasmáticas de IL-6

entre 1–10 pg·mL⁻¹ não apresentaram mudanças na exposição plasmática (área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, AUC) a sinvastatina ou ciclosporina (substratos de CYP3A4), mas os pacientes virtuais com concentrações de IL-6 entre 50–1000 pg·mL⁻¹ apresentaram aumento de até 59% na AUC da sinvastatina e de até 50% na AUC da ciclosporina (MACHAVARAM et al., 2013).

Uma extensa revisão sistemática da literatura analisou 218 trabalhos publicados e concluiu que a inflamação associada ou não a infecção afeta várias isoformas CYP de maneira específica, dependente não só da doença como também do seu estágio de evolução (LENOIR et al., 2021c). Assim, diferentes doenças inflamatórias com a mesma magnitude de aumento de uma citocina específica não resultam necessariamente na mesma magnitude de alteração da atividade da isoforma CYP (COUTANT; HALL, 2018; LENOIR et al., 2021c)

Estudos *in vitro* com hepatócitos primários humanos também mostram que a exposição a TNF- α e IL-6 alteram a expressão de transportadores de membrana de relevância farmacocinética de maneira independente. De forma geral, a exposição de hepatócitos primários humanos tanto a TNF- α quanto a IL-6 diminuiu a expressão e a atividade dos transportadores de membrana NTCP e OATP, bem como a atividade do transportador OCT1. A exposição de hepatócitos primários humanos a IL-6 também diminuiu a expressão de ABCC2 e BCRP, enquanto a exposição a TNF- α aumentou a expressão de BCRP. As citocinas IL-6 e TNF- α geram um efeito inibitório entre os transportadores de influxo sinusoidais (família SLC), enquanto provocam efeitos distintos nos transportadores de efluxo canalicular (família ABC) (FARDEL; LE VÉE, 2009; LE VEE et al., 2009).

Em estudo recente de nosso grupo, pacientes com artrite reumatoide apresentaram redução do volume de distribuição aparente e do *clearance* total aparente da fluvastatina de aproximadamente 50% quando comparada a voluntários saudáveis, evidenciando a inibição do transportador de membrana OATP1B1, responsável pela distribuição do fármaco para o fígado (CARIS et al., 2020). Em outro estudo de nosso grupo, os parâmetros farmacocinéticos da atorvastatina também foram alterados pela inibição do transportador OATP1B1 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico não controlado, apresentando redução de aproximadamente 60% no volume aparente de distribuição e no *clearance* total aparente quando comparado a voluntárias saudáveis (CESTARI et al., 2020).

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a principal causa de doença crônica de fígado no mundo (WHO, 2019), que está associada a intensa resposta inflamatória, com o aumento de concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- γ) com consequente modulação da atividade de diversas isoformas CYP e expressão hepática de transportadores de membrana, fatores que alteram a farmacocinética da maioria dos medicamentos em uso na clínica (FARDEL; LE VÉE, 2009; HANADA et al., 2012; NAKAI et al., 2008; TARRAGÔ et al., 2014).

A hepatite C crônica induz ao estresse oxidativo celular, incluindo o aumento de espécies reativas de oxigênio (DE MARIA et al., 1996; HANADA et al., 2012). A produção elevada de IL-6 e TNF- α está associada ao progresso da hepatite C crônica (TARRAGÔ et al., 2014). A hepatite C crônica induz os perfis de citocinas T-Helper 2 (Th2) e T-citotóxico 2. A ineficácia em controlar a infecção leva ao recrutamento de infiltrados inflamatórios no parênquima do fígado induzidos pelas quimiocinas CXCL-9, CXCL-10 e CXCL-11 resultando em dano hepático continuado e, por fim, cirrose hepática (FALLAHI et al., 2012). Quando comparados a voluntários sadios, pacientes com cirrose compensada e com cirrose descompensada exibem concentrações plasmáticas aumentadas das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 (DIRCHWOLF et al., 2016).

Estudos *in vitro* reportam a relação entre a replicação do VHC e sua influência na atividade dos transportadores de membrana. Um estudo realizado em células de carcinoma hepatocelular HepG2 relatou que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (20 ng·mL⁻¹), IL-1 β (5 ng·mL⁻¹) e TNF- α (5 ng·mL⁻¹), diminuíram a expressão do RNA mensageiro do MRP2 em 30% nos tecidos de pacientes infectados quando comparados com tecidos de pacientes não infectados (HINOSHITA et al., 2001).

Outro estudo *in vitro* relatou aumento da expressão de *MDR1/P-gp*, *MRP1* e *MRP3* em hepatócitos humanos provenientes de biópsias de pacientes com hepatite C crônica, tanto no estágio precoce da fibrose quanto na fase de cirrose hepática quando comparados com hepatócitos humanos de pacientes não infectados pelo VHC (ROS et al., 2003). O efeito da replicação do VHC, avaliado em função da expressão da NS5A (proteína não-estrutural A, do VHC), em células da linhagem de hepatocarcinoma humano Huh7, sugere aumento da expressão da BCRP. A indução da BCRP pela replicação do VHC pode justificar a baixa eficácia de terapias antivirais em alguns pacientes com hepatite C crônica (RIVERO et al., 2013). Entretanto, os resultados apresentados por Rivero et al. (2013) sugerindo a diminuição da expressão

de *MDR1/P-gp* são conflitantes em relação a estudos anteriores, que reportam o aumento da expressão desse transportador (HINOSHITA et al., 2001; ROS et al., 2003). Estudos com placentas de parturientes com hepatite C também mostram aumento da expressão de *MDR1/P-gp* e BCRP (PFEIFER et al., 2018), corroborando os dados dos estudos anteriores (HINOSHITA et al., 2001; ROS et al., 2003).

Em um estudo detalhado conduzido em amostras de biópsias hepáticas obtidas de pacientes com hepatite C crônica, com ou sem evidências de cirrose, ou de pacientes não infectados pelo VHC, observou-se que a hepatite C crônica associada à cirrose aumenta a expressão dos transportadores *MDR1/P-gp*, MRP1 e MRP4 e diminui a expressão dos transportadores OCT1, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MRP2 e BCRP (OGASAWARA et al., 2010). Ressalta-se, no entanto, que os dados obtidos para a BCRP no estudo de Ogasawara et al. (2010) são contraditórios em relação aos demais estudos citados anteriormente (PFEIFER et al., 2018; RIVERO et al., 2013).

O estadiamento da fibrose hepática pode ser realizado por métodos invasivos, como a biópsia hepática, ou não-invasivos, como a elastografia hepática transitória (CASTÉRA et al., 2005; CASTÉRA; FORNS; ALBERTI, 2008). O escore METAVIR classifica os graus de fibrose hepática em F0 (ausência de fibrose), F1 (fibrose portal sem septo, inicial), F2 (fibrose portal com raros septos, moderada), F3 (numerosos septos sem cirrose, grave) e F4 (presença de cirrose) (BEDOSSA; POYNARD, 1996).

Estudos anteriores mostram que a expressão de RNA mensageiro de enzimas CYPs (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4) e transportadores de membranas (BSEP, *MDR3*, MRP2, NTCP, OAT2 e OATP) é significativamente menor em pacientes com hepatite C crônica classificados como F3 (fibrose hepática grave) quando comparados a pacientes classificados como F0/F1 (fibrose hepática inicial). Além disso, a expressão de RNA mensageiro para as CYP2E1 e CYP3A4, OATP e OCT1 difere significativamente entre os estágios F0/F1 e F2 (fibrose hepática moderada) (HANADA et al., 2012).

Um estudo analisou amostras de biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, doença do fígado alcoólico e hepatite autoimune, estratificadas de acordo com o escore Child-Pugh. Foram investigadas dez isoformas CYP e quatro isoformas UGT quanto à abundância proteica. As biópsias dos pacientes com hepatite C crônica mostraram redução de 52% da abundância da CYP2E1 e de 49% da abundância da UGT2B7. A abundância proteica das isoformas CYP1A1, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6 e UGT1A1, UGT1A3

e UGT2B15 permaneceu estável ao longo da progressão da disfunção hepática. Os resultados do estudo demonstram que a abundância proteica das enzimas metabolizadoras é afetada tanto pelo tipo da doença hepática quanto pelo estado funcional do órgão (DROZDZIK et al., 2021).

A expressão proteica de transportadores de membrana BCRP, BSEP, MATE1, MRP2, MRP3, MRP4, NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1 e P-gp foi avaliada em amostras de fígados cirróticos de pacientes com hepatite C crônica e em amostras de biópsias de fígados não-cirróticos (controle). O estudo mostrou aumento da expressão de MATE1 e diminuição da expressão de BSEP, MRP2, NTCP, OATP1B3, OCT1 e P-gp nos fígados cirróticos de pacientes com hepatite C quando comparados aos controles. No entanto, não foi observada alteração na expressão proteica da BCRP, MRP3, OATP1B1 e OATP2B1 (WANG et al., 2016).

A avaliação da atividade *in vivo* das isoformas CYP e/ou transportadores de membranas pode ser realizada por fenotipagem, através da administração de fármacos marcadores e cálculo de razões metabólicas ou *clearance* parcial de uma via metabólica específica (FUHR; JETTER; KIRCHHEINER, 2007). Fármacos marcadores são substratos seletivos para as diferentes isoformas CYP que podem ser administrados concomitantemente, os chamados coquetéis, com o objetivo de investigar simultaneamente diferentes enzimas CYP (CUSINATO et al., 2019; DONZELLI et al., 2014; WOHLFARTH et al., 2012), assim como diferentes transportadores de membranas (CHU et al., 2018). Os fármacos marcadores devem apresentar farmacocinética linear, não devem sofrer influência da ligação às proteínas plasmáticas e do fluxo sanguíneo hepático, assim como não devem induzir ou inibir as enzimas do metabolismo (LOFT, 1990). Outros estudos preconizam a administração de coquetéis em doses sub terapêuticas com o intuito de minimizar os riscos aos voluntários associados ao uso de fármacos marcadores, (INGS, 2010; OH et al., 2012; PRUEKSARITANONT et al., 2017). Ressalta-se que embora fármacos marcadores sejam consideravelmente específicos para isoformas CYP, a maioria dos fármacos marcadores para transportadores de membrana têm menor seletividade, pois são substratos de múltiplos transportadores de membrana (CHU et al., 2018).

A presente investigação abrange pela primeira vez o estudo da influência da hepatite C crônica na atividade da CYP1A2 (caféina), CYP2C9 (losartana), CYP2C19 (omeprazol), CYP2D6 (metoprolol) e CYP3A (omeprazol) e dos transportadores OATP1B1 & BCRP (rosuvastatina) e P-gp (fexofenadina) em participantes com

diferentes graus de fibrose hepática. Estudos anteriores realizados *in vitro* (HINOSHITA et al., 2001; ROS et al., 2003) reportam a relação entre a replicação do VHC e sua influência na atividade dos transportadores de membrana e das isoformas CYP e ressaltam a importância da confirmação desse resultado *in vivo*. A hepatite C crônica, a progressão da fibrose hepática e a presença da cirrose podem estar acompanhadas da indução de citocinas pró-inflamatórias, podendo resultar na inibição das enzimas CYP e inibição/indução da expressão dos transportadores de membrana envolvidos na absorção, distribuição e eliminação de diversos agentes antivirais de ação direta utilizados no tratamento da hepatite C crônica.

Neste estudo investigamos participantes com hepatite C crônica, genótipos 1 e 3 do VHC, um dia antes do início do tratamento com agentes antivirais de ação direta (Fase 1) e até 30 dias após a avaliação da resposta virológica sustentada (VHC-RNA indetectável após 12 semanas do fim do tratamento com agentes antivirais de ação direta) (Fase 2), período suficiente para a eliminação completa dos fármacos utilizados no tratamento da hepatite C crônica, garantindo que qualquer alteração na expressão dos transportadores de membrana ou inibição das enzimas CYP não será influenciada pelos fármacos utilizados no tratamento da doença. Assim, avaliamos se os relatos obtidos em estudos *in vitro* também são observados *in vivo*, para uma maior compreensão da influência da hepatite C nas enzimas CYP e transportadores de membranas e, conseqüentemente no ajuste de doses dos diversos medicamentos usados por esses pacientes.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a influência dos diferentes graus de fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite C crônica na atividade *in vivo* das enzimas CYP (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A) e transportadores de membrana (OATP1B1 & BCRP e P-gp) usando fármacos marcadores.
- Avaliar a influência do tratamento farmacológico para a hepatite C crônica na atividade *in vivo* das enzimas CYP (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A) e transportadores de membrana (OATP1B1 & BCRP e P-gp) usando fármacos marcadores.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Estudo clínico

3.1.1. Aspectos éticos

O protocolo clínico foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP – USP; ANEXO A) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP – USP, ANEXO B). Os participantes investigados foram recrutados no Ambulatório de Hepatites do Centro de Referência em Especialidades Central, da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto e foram incluídos no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Os participantes foram informados em detalhes sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos e encontraram-se livres para recusarem participar do estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalização ou prejuízo ao seu atendimento e/ou tratamento.

3.1.2. Protocolo clínico

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletados dos prontuários dos participantes os resultados dos exames clínicos e laboratoriais para a avaliação da função hepática (ALT, AST, bilirrubina, INR e proteínas totais), função renal (ureia, creatinina sérica e taxa de filtração glomerular estimada), sorologia e RNA-VHC pela metodologia quantitativa RT-PCR em tempo real para comprovação da presença do vírus.

O estudo prospectivo foi realizado com 28 participantes com hepatite C crônica recrutados por amostragem de conveniência no Centro de Referência do Ambulatório de Hepatites da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, no período de agosto de 2017 a janeiro de 2020. Os participantes com diferentes estágios de fibrose hepática (F) foram avaliados por elastografia hepática transitória (FibroScan[®], Echosens, Paris, França) com valores de corte estabelecidos de acordo com Castéra et al. (2005) e/ou biópsia hepática, aplicando a classificação do escore METAVIR (F0/F1 = 7, F2 = 8, F3 = 4, F4 = 9) (BEDOSSA; POYNARD, 1996). O tratamento farmacológico para a hepatite C crônica consistiu nos regimes com as

seguintes combinações de antivirais de ação direta (AADs): sofosbuvir + daclatasvir ± ribavirina, ou ombitasvir + ritonavir + dasabuvir ± ribavirina, ou sofosbuvir + simeprevir ± ribavirina.

Os critérios de exclusão compreenderam pacientes com infecção pelo HIV, hepatite B e outras comorbidades como doença renal crônica, diabetes mellitus ou hipotireoidismo, pacientes em uso de medicamentos inibidores ou indutores de isoformas CYP e transportadores de membranas e pacientes com outras causas de doenças hepáticas.

Os participantes de ambos os sexos, com idade entre 35 e 68 anos, foram alocados nos Grupos 1 ($n = 15$; F0/F1 e F2, fibrose hepática leve a moderada) e 2 ($n = 13$; F3 e F4, estágios avançados de fibrose/cirrose hepática).

- **Grupo 1 ($n = 15$):**
 - participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1) ($n = 7$);
 - participantes com fibrose hepática moderada (F2) ($n = 8$);
- **Grupo 2 ($n = 13$):**
 - participantes com fibrose hepática grave (F3) ($n = 4$);
 - participantes com cirrose (F4) – Child-Pugh A (escore de 5 a 6) ($n = 9$).

A investigação foi composta por duas fases descritas abaixo e ilustradas na Figura 1.

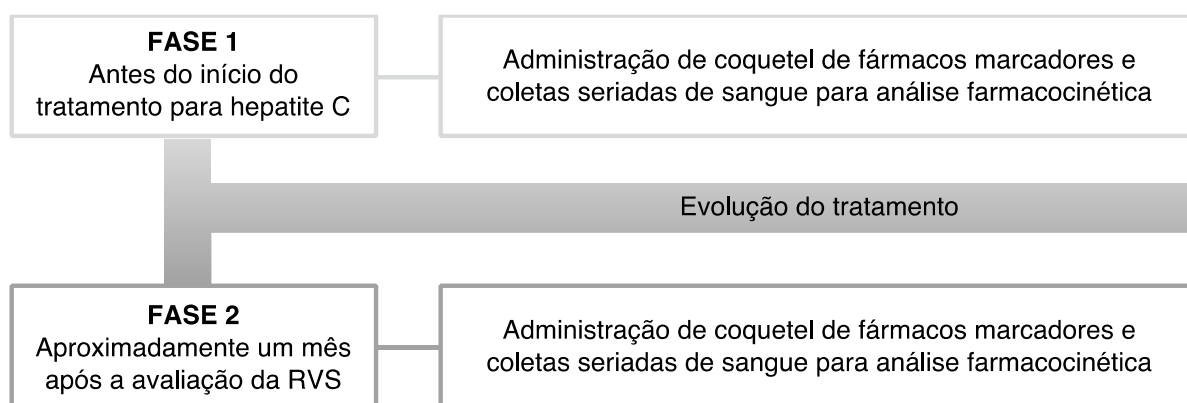
- **Fase 1:** um dia antes do início do tratamento com agentes antivirais de ação direta para hepatite C;
- **Fase 2:** até 30 dias após a avaliação da resposta virológica sustentada (RVS), realizada 12 semanas após o término do tratamento com agentes antivirais de ação direta. Nesta fase, o VHC-RNA foi indetectável.

Na Fase 1 do estudo, os participantes foram internados na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HCFMRP-USP em jejum de 8 horas e com abstenção do uso de cafeína por cinco dias para a avaliação *in vivo* da atividade das principais isoformas do CYP e dos transportadores de membranas OATP1B1 & BCRP e P-gp. Os participantes receberam uma cápsula gelatinosa contendo o coquetel de fármacos em doses subterapêuticas (CUSINATO et al., 2019): cafeína (10 mg), losartana (2 mg), fexofenadina (10 mg), omeprazol (2 mg), metoprolol (10 mg), rosuvastatina (2 mg) e metformina (50 mg) (cápsula manipulada na Farmácia Liane, Ribeirão Preto,

SP, administrada de único lote em ambas as fases a cada participantes) com 250 mL de água. Os participantes foram internados na UPC do HCFMRP-USP durante a administração do coquetel até a coleta de 12 h, retornando dois dias consecutivos para as coletas dos tempos 24 h e 48 h, visando sua comodidade. Os participantes permaneceram em jejum até 4 h após a administração do coquetel. As coletas de sangue em tubos heparinizados (5 mL por coleta) foram realizadas nos tempos 0 (15 minutos antes da administração do coquetel); 15 min; 30 min; 45 min; 1 h; 1,5 h; 2 h; 3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 8 h; 10 h; 12 h e 24 h e 48 h. As alíquotas de plasma foram obtidas por centrifugação ($1800 \times g$, 10 min) das amostras de sangue e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise.

Na Fase 2 do estudo, os participantes foram submetidos ao mesmo procedimento descrito na Fase 1.

Figura 1: Fases do protocolo clínico



RVS: resposta virológica sustentada

3.2. Métodos

3.2.1. Análise dos fármacos marcadores em plasma

Os padrões de fexofenadina (hidroloridrato de fexofenadina), losartana (losartana posássica), ácido carboxílico E-3174 (losartana ácido carboxílico E-3174), paraxantina, 5-hidroxiomeprazol (5-hidroxiomeprazol sódico), alfa-hidroximetoprolol, rosuvastatina (rosuvastatina sódica) e rosuvastatina-D3 (rosuvastatina-D3 sódica) foram adquiridos da Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canadá), enquanto os padrões de cafeína, cafeína-D9, metoprolol (tartarato de metoprolol), omeprazol e

tramadol (hidroloridrato de tramadol) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A daunorrubicina (hidrocloridrato de daunorrubicina) foi adquirida da European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (Strasbourg, AL, França), o metabólito omeprazol-sulfona foi adquirido da AstraZeneca (Mölnal, Suécia). O padrão de difenidramina foi gentilmente doado pela Aché Pharmaceutical (Guarulhos, SP, Brasil).

As soluções de cafeína, cafeína-D9 daunorrubicina, difenidramina, fexofenadina, losartana, ácido carboxílico E-3174, metoprolol, alfa-hidroxi metoprolol, omeprazol-sulfona, paraxantina e tramadol foram preparadas em metanol. As soluções de omeprazol e 5-hidroxiomeprazol foram preparados em metanol contendo dietilamina 0,1%. As soluções de rosuvastatina e rosuvastatina-D3 foram preparadas em acetonitrila.

A acetonitrila (Honeywell Riedel-de-Haën, Seelze, Alemanha), o acetato de etila (Honeywell Riedel-de-Haën) e o metanol (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) empregados foram grau HPLC. O ácido fórmico (90,1%, J. T. Baker), o acetato de amônio (98%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o fosfato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) utilizados foram grau PA. A água utilizada foi obtida do sistema de purificação Milli Q Plus® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2.1.1. Análise da cafeína e metabólito paraxantina em plasma

A análise da cafeína e metabólito paraxantina em plasma foi realizada por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS), de acordo com estudo anteriormente desenvolvido e validado em nosso laboratório (dados não publicados). Em resumo, alíquotas de 25 µL de plasma foram adicionadas do padrão interno (cafeína-D9, 200 ng·mL⁻¹ em metanol) e 800 µL de solução de ácido fórmico 0,5% em metanol. A mistura foi agitada vigorosamente por 10 s (agitador de soluções Phoenix Luferco, modelo AP56, Araraquara, SP, Brasil) e, então, centrifugada a 4 °C por 10 min a 21.500 × g (ultracentrífuga refrigerada Himac CT15RE; Hitachi, Tóquio, Japão). Alíquotas de 2 µL do sobrenadante foram analisados por UHPLC-MS/MS. A curva de calibração foi feita no intervalo de concentrações de 10–2.000 ng·mL⁻¹ em plasma e os estudos de precisão e exatidão mostraram valores de coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a ±15%.

3.2.1.2. Análise da losartana e metabólito ácido carboxílico E-3174 em plasma

A análise da losartana e metabólito ácido carboxílico E-3174 em plasma foi realizada por UHPLC-MS/MS, de acordo com estudo anteriormente desenvolvido e validado em nosso laboratório, recentemente publicado pelo grupo (CUSINATO et al., 2019). Resumidamente, 400 μL de ácido fórmico 0,1% em água foram adicionados a alíquotas de 400 μL de plasma adicionadas de 25 μL da solução de padrão interno (daunorrubicina, 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol). A mistura foi então agitada vigorosamente por 10 s e centrifugada a 4 °C por 10 min a 21.500 $\times g$. Um volume de 600 μL do sobrenadante foi adicionado a cartuchos de extração em fase sólida (Oasis® PRIME HLB $\mu\text{Elution Plate}$, Waters Corporation, Milford, MA, EUA). As etapas de lavagem foram feitas com 200 μL de água e 200 μL de metanol 5% em água. Os analitos foram eluídos com 100 μL de metanol em uma placa de 96 poços (Waters® ACQUITY UPLC 700 $\mu\text{L Round 96-Well Sample Plate}$, Waters Corporation, Milford, MA, EUA) contendo 100 μL de água. Após agitação, 10 μL da solução foram analisados por UHPLC-MS/MS. As curvas de calibração para a losartana e ácido carboxílico E-3174 foram construídas no intervalo de concentrações 0,03–5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma e os estudos de precisão e exatidão mostraram valores de coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a $\pm 15\%$.

3.2.1.3. Análise da fexofenadina em plasma

A análise da fexofenadina em plasma foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), de acordo com estudo anteriormente desenvolvido e validado em nosso laboratório (XIMENEZ, 2018). Resumidamente, alíquotas de 50 μL de plasma foram adicionadas de 25 μL da solução de padrão interno (difenidramina, 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol) e 100 μL de acetonitrila. A mistura foi então agitada vigorosamente por 10 s e centrifugada a 5 °C por 10 min a 21.500 $\times g$. Um volume de 100 μL do sobrenadante foi adicionado a 100 μL de água. Após agitação, 70 μL da solução foram cromatografados por LC-MS/MS. A curva de calibração da fexofenadina foi feita no intervalo de concentrações de 0,5–250 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma e os estudos de precisão e exatidão mostraram valores de coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a $\pm 15\%$.

3.2.1.4. Análise do omeprazol e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona e análise do metoprolol e seu metabólito alfa-hidroxi metoprolol em plasma

A análise do omeprazol (e metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroxi metoprolol) foi realizada por LC-MS/MS. Alíquotas de 50 μL de plasma foram adicionadas de 50 μL de acetonitrila e 25 μL da solução de padrão interno (tramadol, 8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol). A mistura foi então agitada vigorosamente por 5 s e centrifugada a 4 °C por 10 min a 21.500 $\times g$. Um volume de 50 μL do sobrenadante foi adicionado a 100 μL de fosfato de sódio 0,03 M em água. Após agitação, 50 μL foram cromatografados. As curvas de calibração para o omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e metoprolol foram preparadas nas concentrações de 0,1 a 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto a curva de calibração para o alfa-hidroxi metoprolol foi preparada nas concentrações de 0,5 a 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A análise dos fármacos e metabólitos foi realizada por LC-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, forno de coluna TCM/CHM® e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S® equipado com interface de ionização por eletronebulização (ESI) Zspray™, todos Waters Corp. (Milford, MA, EUA). A análise cromatográfica empregou a coluna de fase reversa LiChrospher® 60 RP-Select B (Merck, Darmstadt, Alemanha), 125 \times 4,6 mm, com partículas de 5 μm , protegida por coluna de guarda LiChrospher® 60 RP Select B, 5 μm , 4 \times 4 mm (Merck) e mantidas a 23°C. A fase móvel foi constituída por mistura isocrática de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila:água na proporção 60:40 (v/v) e vazão de 0,8 mL/min. As análises por MS/MS foram executadas no modo ionização positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3,0 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 150 e 550 °C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 1000 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na vazão de 0,20 mL/min. A energia do cone foi fixada em 30 V para todos os analitos e as energias de colisão foram ajustadas a 36, 17, 18, 18, 17 e 15 eV para omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona, metoprolol, alfa-hidroxi metoprolol e o padrão interno tramadol, respectivamente. As análises foram executadas no modo de monitoramento de

reações selecionadas (*selective reaction monitoring*, SRM). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 346,1 \rightarrow 136,1 m/z , 362,1 \rightarrow 214,1 m/z , 362,1 \rightarrow 150 m/z , 268,1 \rightarrow 116,1 m/z , 284,1 \rightarrow 116,1 m/z e 264 \rightarrow 58 m/z para omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona, metoprolol, alfa-hidroximetoprolol e o padrão interno tramadol, respectivamente. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx[®] versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.1.5. Análise da rosuvastatina em plasma

A análise da rosuvastatina em plasma foi realizada por UHPLC-MS/MS baseada em trabalhos publicados na literatura (BAI et al., 2018; PRUEKSARITANONT et al., 2017). Alíquotas de 125 μ L de plasma foram enriquecidas com 25 μ L da solução do padrão interno (rosuvastatina-D3, 5.000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol) e adicionadas de 65 μ L de tampão acetato de amônio 1 M pH 5 e 800 μ L de acetato de etila. Os tubos foram agitados horizontalmente em mesa agitadora a 30 ciclos por minuto durante 30 min e, então, centrifugados a 4 °C por 15 min a 21.500 $\times g$. Alíquotas de 700 μ L do sobrenadante foram transferidas para microtubos cônicos e evaporadas a pressão negativa por 45 min a 1200 rpm (evaporador de amostras AVC 2-25 CD plus acoplado a condensador CT 04-50 SR, ambos Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Alemanha). As amostras foram reconstituídas com 100 μ L da solução ácido fórmico 0,1% em água:acetonitrila (70:30, v/v) e agitadas vigorosamente durante 20 s. As amostras foram novamente centrifugadas a 4 °C por 10 min a 21.500 $\times g$ e 60 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos de injeção, dos quais 8 μ L foram cromatografados.

A curva de calibração para a rosuvastatina em plasma foi preparada nas concentrações de 10 a 16.000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A análise da rosuvastatina foi realizada por UHPLC-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 e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S[®] equipado com interface ESI Zspray[™], todos Waters Corp. (Milford, MA, EUA). A análise cromatográfica empregou a coluna ACQUITY UPLC[®] BEH C18 (1,7 μ m, 2.1 \times 50 mm, Waters, Dublin, Irlanda) protegida por coluna de guarda de mesma especificação e

mantidas a 40 °C. A fase móvel foi constituída por gradiente das soluções de ácido fórmico 0,1% em água (solução A) e acetonitrila (solução B) na vazão de 0,4 mL/min. O sistema do gradiente foi iniciado na proporção A:B 70:30 (v/v) e assim mantido por 0,3 min, com uma rampa até A:B 30:70 (v/v) por 0,5 min, uma nova rampa até A:B 15:85 (v/v) por 2,2 min e o retorno às condições iniciais (A:B 70:30, v/v) por 0,5 min. O sistema foi mantido na última condição por 2,5 min para reequilíbrio da coluna. As análises por MS/MS foram executadas no modo ionização positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3,50 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120 e 550 °C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 150 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na vazão de 0,21 mL/min. A energia do cone foi mantida a 25 V para rosuvastatina e 30 V para o padrão interno rosuvastatina-D3. A energia de colisão foi 32 eV para rosuvastatina e 35 eV para rosuvastatina-D3. As análises foram executadas no modo SRM. Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições $482 \rightarrow 258$ m/z para rosuvastatina e $485,2 \rightarrow 261,1$ m/z para rosuvastatina-D3. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx[®] versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.1.6. Análise da metformina em plasma

As alíquotas de plasma reservadas à análise de metformina em plasma estão acondicionadas a -80 °C e não foram analisadas até o presente momento em função das restrições das atividades durante a pandemia de COVID-19.

3.2.2. Validação do método de análise do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona) e metoprolol (e seu metabólito alfa-hidroxi metoprolol) e do método de análise da rosuvastatina em plasma

O método de análise do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e seu metabólito alfa-hidroxi metoprolol) e o método de análise da rosuvastatina em plasma foram desenvolvidos e validados de acordo com as normas estabelecidas na Resolução de número 27 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) quanto a seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidades.

Controles de qualidade

As soluções de controle de qualidade (CQ) em plasma foram preparadas nas concentrações do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), além de um segundo CQM (CQM₂) para o método de quantificação de rosuvastatina, controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD). As concentrações para cada analito estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações das soluções de controles de qualidade utilizadas no método de análise do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e seu metabólito alfa-hidroximetoprolol) e do método de análise da rosuvastatina em plasma.

Analitos	LIQ	CQB	CQM₁	CQM₂	CQA	CQD
omeprazol (ng·mL ⁻¹)	0,1	0,25	25	—	40	250 (1:10, v/v)
5-hidroxiomeprazol (ng·mL ⁻¹)	0,1	0,25	25	—	40	250 (1:10, v/v)
omeprazol-sulfona (ng·mL ⁻¹)	0,1	0,25	25	—	40	250 (1:10, v/v)
metoprolol (ng·mL ⁻¹)	0,1	0,25	25	—	40	250 (1:10, v/v)
alfa-hidroximetoprolol (ng·mL ⁻¹)	0,5	1	25	—	40	250 (1:10, v/v)
rosuvastatina (pg·mL ⁻¹)	10	15,63	250	8.000	12.800	32.000 (1:5, v/v)

LIQ: limite inferior de quantificação. **CQB:** controle de qualidade de baixa concentração. **CQM:** controle de qualidade de média concentração. **CQA:** controle de qualidade de alta concentração. **CQD:** controle de qualidade de diluição.

Seletividade

As seletividades dos métodos foram avaliadas em oito fontes distintas de plasma branco, sendo quatro normais, duas hemolisadas e duas lipêmicas. As áreas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% da área oriunda do respectivo LIQ. As áreas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno (PI) devem ser inferiores a 5% da área do PI.

Efeito residual

O efeito residual dos métodos foi avaliado realizando-se três injeções de cada amostra branco de plasma processada, sendo uma antes e duas após a injeção do respectivo do Limite Superior de Quantificação (LSQ) de cada analito. As áreas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos devem ser inferiores

a 20% da área oriunda do LIQ. As áreas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção de PI devem ser inferiores a 5% da área do PI.

Efeito matriz

O efeito matriz dos métodos foi avaliado utilizando-se oito amostras de plasma branco, sendo quatro normais, duas hemolisadas e duas lipêmicas. Os plasmas foram processados como descrito nos itens 3.2.1.4 e 3.2.1.5, sendo os sobrenadantes oriundos da etapa de centrifugação acrescidos da solução de PI e das soluções padrão de uso dos analitos para a obtenção de soluções nas concentrações de CQB e CQA de cada método. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação 1.

$$FMN = \frac{(\text{resposta do analito em matriz}) / (\text{resposta do PI em matriz})}{(\text{resposta do analito em solução}) / (\text{resposta do PI em solução})} \quad (1)$$

O Coeficiente de Variação (CV) relativo a todas as amostras de uma mesma matriz deve ser inferior a $\pm 15\%$.

Linearidade

A linearidade de cada método foi avaliada construindo três curvas de calibração para cada método conforme descrito nos itens 3.2.1.4 e 3.2.1.5. O coeficiente de determinação r^2 deve ser superior a 0,98.

Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intracorrída e intercorrídas. Os estudos foram realizados nas concentrações do LIQ, CQB, CQM (CQM₁ e CQM₂ para rosuvastatina), CQA e CQD de cada analito.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intracorrída foram analisadas, em uma mesma corrida analítica, oito replicatas de cada concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) para o método de análise dos fármacos marcadores omeprazol e metoprolol e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e alfa-hidroximetoprolol em plasma e cinco replicatas de cada concentração (LIQ, CQB, CQM₁ e CQM₂, CQA e CQD) para o método do fármaco marcador rosuvastatina em plasma.

A avaliação da precisão intracorrida e intercorridas foi realizada através do cálculo do CV dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido como preciso, o CV deve ser igual ou inferior a $\pm 15\%$, exceto o LIQ, com aceitação de CV de até 20%. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR; equação 2), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal.

$$\text{EPR} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração nominal}}{\text{Concentração nominal}} \times 100 \quad (2)$$

Estabilidades

Os estudos de estabilidade de ciclos de descongelamento foram conduzidos empregando cinco replicatas de amostras nas concentrações de CQB e CQA. As amostras de CQB e CQA foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 12 h e descongeladas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram analisadas empregando curvas de calibração recém preparadas.

A estabilidade de curta duração foi avaliada após a permanência das amostras de CQB e CQA a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h para o método de análise dos fármacos marcadores omeprazol e metoprolol e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e alfa-hidroxi metoprolol em plasma ou $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h para o método do fármaco marcador rosuvastatina em plasma. Todas as amostras foram analisadas empregando curvas de calibração recém preparadas.

A estabilidade pós-processamento foi avaliada após a permanência durante 13 h das amostras CQB e CQA na temperatura do auto injetor de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o método de análise dos fármacos marcadores omeprazol e metoprolol e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e alfa-hidroxi metoprolol em plasma ou durante 24 h na temperatura do auto injetor de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o método do fármaco marcador rosuvastatina em plasma. Todas as amostras foram analisadas empregando curvas de calibração recém preparadas.

A estabilidade dos analitos em plasma é demonstrada quando não se observar desvio em relação ao valor nominal superior a $\pm 15\%$.

3.2.3. Análise farmacocinética

As razões metabólicas (RM) foram calculadas dividindo-se a concentração plasmática do metabólito paraxantina pela cafeína (CYP1A2), do metabólito ácido carboxílico E-3174 pela losartana (CYP2C9), do metabólito 5-hidroxiomeprazol pelo omeprazol (CYP2C19), do metabólito alfa-hidroximetoprolol pelo metoprolol (CYP2D6), do metabólito omeprazol-sulfona pelo omeprazol (CYP3A) nas amostras coletadas 4 h após a administração do coquetel (DE ANDRÉS et al., 2016; FUHR; JETTER; KIRCHHEINER, 2007; RYU et al., 2007). A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo da rosuvastatina (OATP1B1 & BCRP) e da fexofenadina (P-gp) foram calculadas no intervalo de 0 a infinito após a administração do coquetel utilizando-se o método dos trapezoides empregando o programa Phoenix WinNonlin™, versão 8.3.3.33 (Certara USA, Inc., Princeton, NJ, Estados Unidos da América). A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo da fexofenadina também foi estimada empregando a equação 3, utilizando-se valores observados de concentração plasmática máxima (C_{max}) (RUSSELL; STOLTZ; WEIR, 1998; SRINIVAS, 2016).

$$AUC^{0-\infty} = C_{max} \times 4,4198 + 54,112 \quad (3)$$

3.2.4. Análise estatística

As distribuições dos valores dos parâmetros farmacocinéticos (RM e $AUC^{0-\infty}$) foram investigadas pela inspeção visual dos histogramas de densidade de probabilidade e gráficos quantil-quantil (Q-Q), bem como utilizando o teste estatístico de Shapiro-Wilk. Os dados foram classificados quanto à sua distribuição normal, log-normal ou não-paramétrica.

A comparação entre as Fases 1 e 2 de cada grupo foi feita pelo teste *t* para amostras pareadas para os parâmetros que apresentaram distribuição log-normal (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e P-gp) ou pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas para os parâmetros que apresentaram distribuição não-paramétrica (OATP1B1 & BCRP) utilizando os valores log-transformados. A comparação entre as Grupos 1 e 2 em cada fase foi feita pelo teste *t* para amostras não-pareadas para os parâmetros que apresentaram distribuição log-normal

(CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e P-gp) ou pelo teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas para os parâmetros que apresentaram distribuição não-paramétrica (OATP1B1 & BCRP) utilizando os valores log-transformados. A significância foi fixada em valor p menor que 0,05. Se o intervalo de confiança 90% (IC 90%) da razão das médias geométricas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e P-gp) ou das medianas (OATP1B1 & BCRP) dos parâmetros for totalmente contido no intervalo 0,8–1,25 (intervalo de bioequivalência), o conjunto de dados é considerado clinicamente equivalente (“Statistical Guide for Clinical Pharmacology & Therapeutics”, 2010). As análises estatísticas dos dados experimentais foram realizadas no software R, versão 4.0.3 (R CORE TEAM, 2020) e as figuras foram geradas utilizando o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016).

4. RESULTADOS

Foram recrutados 34 participantes com diagnóstico de infecção pelo VHC, sendo 11 diagnosticados com fibrose hepática inicial (F0/F1), 10 com fibrose hepática moderada (F2), 4 com fibrose hepática grave (F3) e 9 com cirrose (F4) – Child-Pugh A, escore de 5 a 6). Dos 34 participantes incluídos na Fase 1, 28 completaram com sucesso a Fase 2 do estudo. A Tabela 2 apresenta os parâmetros antropométricos, bioquímicos e hematológicos dos participantes com de hepatite C crônica. Os dados individuais estão apresentados no APÊNDICE C, Tabelas 11 e 12. Os dados individuais de estadiamento e regimes de antivirais de ação direta utilizados estão descritos na Tabela 13 (APÊNDICE C).

O método de análise do omeprazol (e metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroxiometoprolol) em plasma foi linear nos intervalos de concentrações de 0,1–50 ng·mL⁻¹ para os analitos omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e metoprolol e no intervalo de concentrações de 0,5–50 ng·mL⁻¹ para o alfa-hidroxiometoprolol. O método permitiu a quantificação de todas as amostras de plasma coletadas 4 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores contendo doses subterapêuticas de 2 mg de omeprazol e 10 mg de metoprolol.

Os cromatogramas referentes às análises do omeprazol (e metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroxiometoprolol) em plasma estão apresentados para amostras de plasma branco (Figura 2A) e plasma branco enriquecido com solução padrão na concentração do LIQ (0,1 ng·mL⁻¹ em plasma para omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e metoprolol e 0,5 ng·mL⁻¹ em plasma para alfa-hidroxiometoprolol) (Figura 2B). Os cromatogramas apresentados na Figura 3A são referentes a uma amostra de plasma branco enriquecida com solução padrão de omeprazol (e metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroxiometoprolol) (1 ng·mL⁻¹ em plasma), enquanto os cromatogramas apresentados na Figura 3B são referentes a uma amostra de plasma de participante com hepatite C crônica coletada 4 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores.

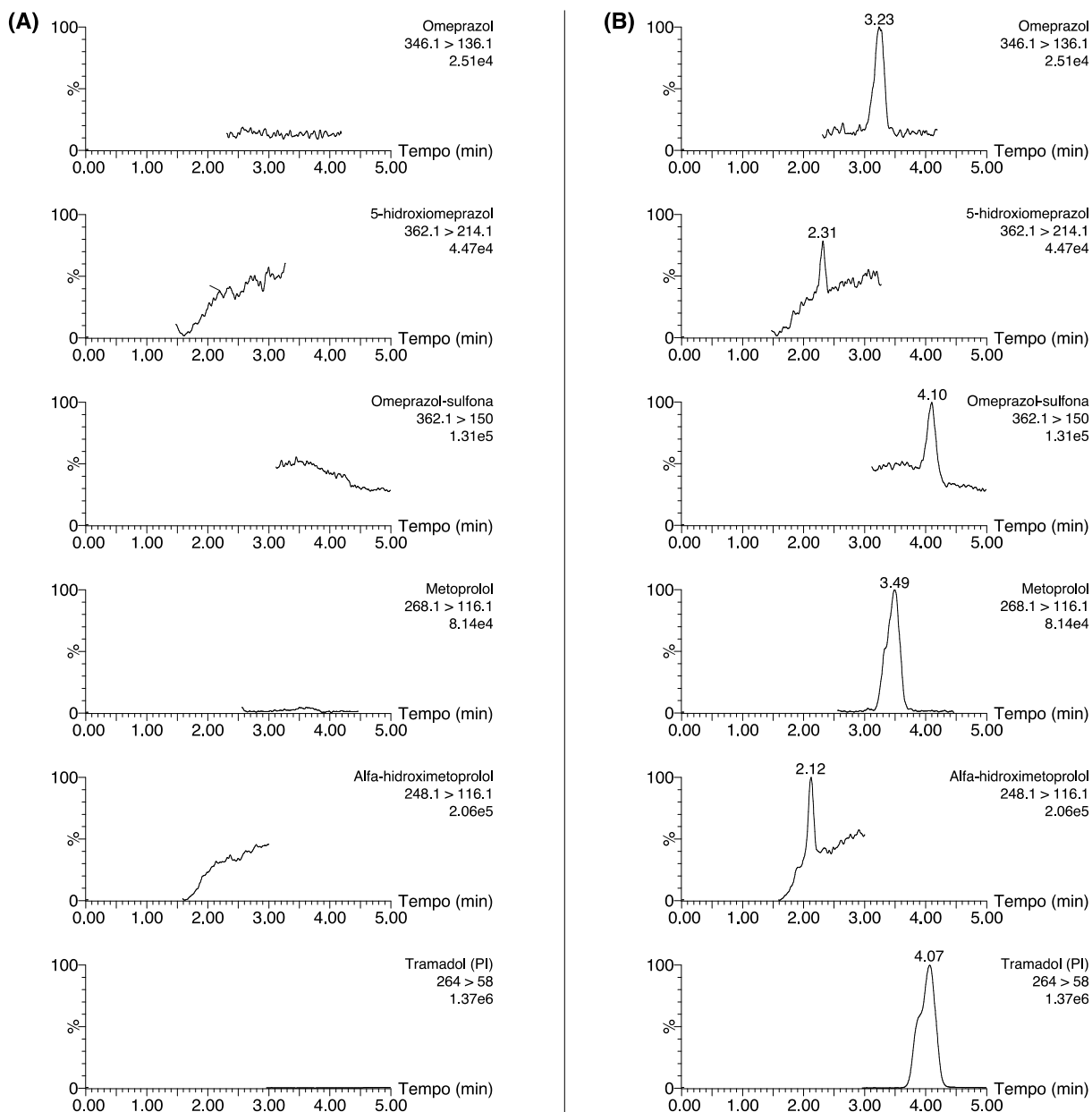
As Tabelas 3 e 4 apresentam os limites de confiança para os ensaios de validação do método mencionado.

Tabela 2: Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos participantes com hepatite C crônica. Dados apresentados como média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação.

	VR	Fase	Grupo 1			Grupo 2		
			Média	DP	CV	Média	DP	CV
Idade (anos)			49,33	9,00	18,24	53,00	11,78	22,23
Altura (m)			1,64	0,08	5,10	1,70	0,08	4,72
Peso (kg)			71,75	18,49	25,77	82,93	19,46	23,47
Índice de massa corpórea (kg·m ⁻²)			26,96	7,55	28,01	28,36	5,42	19,12
Glicemia (mg·dL ⁻¹)	70–99	Fase 1	81,67	13,88	16,99	90,08	13,22	14,68
		Fase 2	88,78	8,01	9,02	94,92	15,49	16,32
Proteínas totais (g·dL ⁻¹)	6,0–8,0	Fase 1	7,45	0,81	10,85	7,88	0,61	7,72
		Fase 2	7,40	0,54	7,30	7,88	0,49	6,21
Albumina (g·dL ⁻¹)	3,5–5,5	Fase 1	4,00	0,52	12,96	3,93	0,47	11,90
		Fase 2	4,03	0,29	7,27	4,19	0,45	10,73
Creatinina sérica (mg·dL ⁻¹)	0,6–1,2	Fase 1	0,87	0,14	16,46	0,99	0,29	29,23
		Fase 2	0,86	0,19	22,47	0,92	0,29	31,83
Taxa de filtração glomerular estimada (mL·min ⁻¹)	≥ 70	Fase 1	112,21	51,13	45,57	91,68	28,63	31,23
		Fase 2	124,30	49,23	39,61	91,23	18,75	20,55
Alanina aminotransferase (U·L ⁻¹)	15–40	Fase 1	65,87	52,26	79,34	145,77	213,61	145,54
		Fase 2	28,75	11,97	45,11	27,85	11,40	40,49
Aspartato aminotransferase (U·L ⁻¹)	0,1–1,0	Fase 1	41,40	18,04	43,57	79,54	98,28	123,57
		Fase 2	21,75	8,18	37,61	28,38	10,10	35,60
Bilirrubina total (mg·dL ⁻¹)	0,0–0,3	Fase 1	0,62	0,29	47,67	0,92	0,73	80,26
		Fase 2	0,50	0,23	46,60	0,67	0,28	42,23
Bilirrubina direta (mg·dL ⁻¹)	0,8–1,0	Fase 1	0,21	0,10	50,14	0,28	0,27	93,89
		Fase 2	0,14	0,05	37,64	0,21	0,10	48,22
INR		Fase 1	0,94	0,07	7,00	1,00	0,10	10,00
		Fase 2	0,95	0,03	3,11	1,01	0,09	9,35
Ureia (mg·dL ⁻¹)	16-40	Fase 1	28,29	5,64	19,92	36,18	18,43	50,93
		Fase 2	31,82	7,52	23,64	34,42	18,27	53,08
Sexo			masculino = 9, feminino = 6			masculino = 7, feminino = 6		
Graus de fibrose hepática			F0/F1 (n = 7), F2 (n = 8)			F3, (n = 4). F4 – Child-Pugh A (n = 9)		
Agentes antivirais de ação direta utilizados entre as Fases 1 e 2.			daclatasvir, dasabuvir, ledispavir, ombitasvir, ribavirina, ritonavir, sofosbuvir, veruprevir			daclatasvir, dasabuvir, ombitasvir, ribavirina, ritonavir, simeprevir, sofosbuvir, veruprevir		

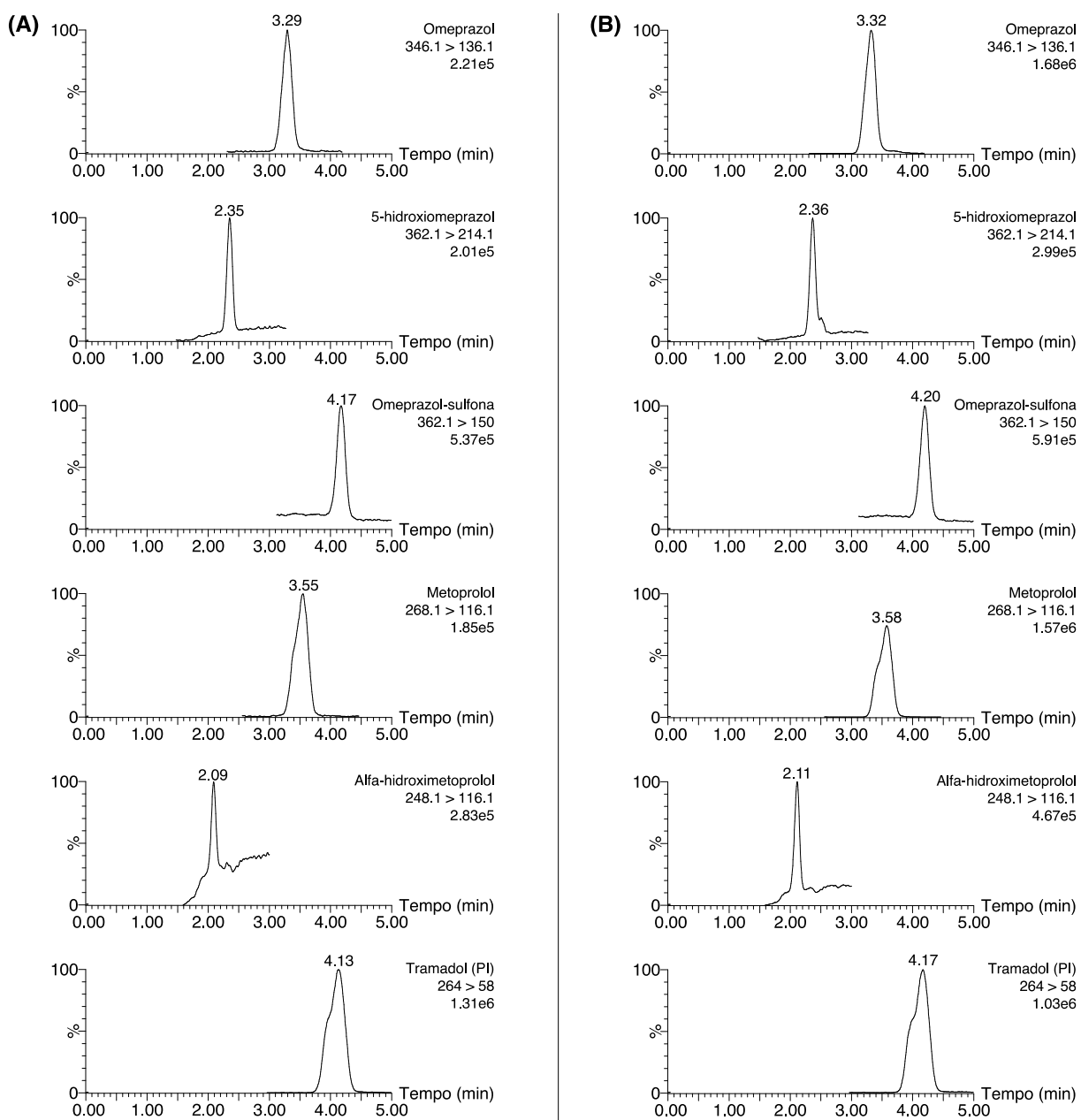
DP: desvio padrão. **CV:** coeficiente de variação. **VR:** valores de referência. **Taxa de filtração glomerular:** estimada pela equação de Cockcroft-Gault. **INR:** razão internacional normalizada. **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Figura 2: Cromatogramas referentes à análise de plasma branco **(A)** e plasma branco enriquecido com a solução padrão na concentração do limite inferior de quantificação **(B)** monitorados nas transições do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroximetoprolol) e padrão interno tramadol.



Limites inferiores de quantificação: $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma (omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona e metoprolol), $0,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma (alfa-hidroximetoprolol). Padrão interno: tramadol $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma.

Figura 3: Cromatogramas referentes à análise de plasma branco enriquecido com solução padrão na concentração $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ **(A)** e amostra de participante com hepatite C crônica **(B)** monitorados nas transições do omeprazol (e seus metabólitos 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona) e metoprolol (e metabólito alfa-hidroximetoprolol) e padrão interno tramadol.



Padrão interno: tramadol $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma.

Tabela 3: Limites de confiança do método de análise da omeprazol, 5-hidroxiomeprazol e omeprazol-sulfona em plasma humano.

	omeprazol		5-hidroxiomeprazol		omeprazol-sulfona	
Efeito matriz FMN médio (CV%)	0,90 (14%)		0,48 (5%)		1,15 (4)%	
Linearidade (ng·mL ⁻¹)	0,1–50		0,1–50		0,1–50	
Equação da reta	y = 0,114911·x + 0,00282309		y = 0,599984·x + 0,0198158		y = 0,356325·x + 0,0144949	
r ²	0,995110		0,994349		0,992523	
Precisão e Exatidão						
<i>Intracorrida (8 replicatas)</i>						
	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)
LIQ (0,1 ng·mL ⁻¹)	7	-7	6	-6	6	-4
CQB (0,25 ng·mL ⁻¹)	4	4	6	-4	4	7
CQM (25 ng·mL ⁻¹)	3	-5	2	-8	1	-12
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	2	-7	1	-13	1	-10
CQD (250 ng·mL ⁻¹ , 1:10, v/v)	2	0	2	-8	2	-13
<i>Intercorridas (3 corridas com 8 replicatas)</i>						
	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)
LIQ (0,1 ng·mL ⁻¹)	9	-2	10	2	8	-8
CQB (0,25 ng·mL ⁻¹)	4	4	8	-1	8	1
CQM (25 ng·mL ⁻¹)	3	-3	3	-8	6	-7
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	6	-4	4	-8	7	-8
CQD (250 ng·mL ⁻¹ , 1:10, v/v)	3	-1	3	-7	8	-4
Estabilidades						
<i>Ciclos descongelamento (-80 °C, 25 °C, 3 ciclos)</i>						
	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)
CQB (0,25 ng·mL ⁻¹)	3	-7	5	-15	3	-6
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	1	-7	2	-6	1	-9
<i>Curta duração (25 °C, 4 h)</i>						
	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)
CQB (0,25 ng·mL ⁻¹)	3	15	6	4	3	-6
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	0	9	1	-12	0	-9
<i>Pós-processamento (10 °C, 13 h)</i>						
	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)	(% CV)	(% EPR)
CQB (0,25 ng·mL ⁻¹)	9	-11	8	-9	8	4
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	4	-6	5	-6	4	-11

FMN: efeito matriz normalizado por padrão interno. **r²:** coeficiente de determinação. **CV:** coeficiente de variação. **EPR:** erro padrão relativo. **LIQ:** limite inferior de quantificação. **CQB:** controle de qualidade de baixa concentração. **CQM:** controle de qualidade de média concentração. **CQA:** controle de qualidade de alta concentração. **CQD:** controle de qualidade de diluição.

Tabela 4: Limites de confiança do método de análise do metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol em plasma humano.

	metoprolol	alfa-hidroxi metoprolol		
Efeito matriz FMN médio (CV%)	0,89 (13%)	0,43 (11%)		
Linearidade (ng·mL ⁻¹)	0,1–50	0,5–50		
Equação da reta	$y = 0,0907827 \cdot x + 0,0176085$	$y = 0,0481819 \cdot x + 0,0115781$		
r^2	0,0993823	0,0994359		
Precisão e Exatidão				
<i>Intracorrída (8 replicatas)</i>				
	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
LIQ *	10	-3	7	2
CQB *	5	-2	4	1
CQM (25 ng·mL ⁻¹)	1	-5	2	-7
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	1	-4	2	-1
CQD (250 ng·mL ⁻¹ , 1:10, v/v)	2	-3	1	-7
<i>Intercorrídas (3 corridas com 8 replicatas)</i>				
	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
LIQ *	13	-3	13	6
CQB *	7	1	8	-3
CQM (25 ng·mL ⁻¹)	2	-6	4	-11
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	5	-6	7	-6
CQD (250 ng·mL ⁻¹ , 1:10, v/v)	3	-4	3	-10
Estabilidades				
<i>Ciclos descongelamento (-80 °C, 25 °C, 3 ciclos)</i>				
	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
CQB *	12	-7	2	10
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	1	-8	3	-4
<i>Curta duração (25 °C, 4 h)</i>				
	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
CQB *	4	4	7	0
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	1	0	2	1
<i>Pós-processamento (10 °C, 13 h)</i>				
	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
CQB*	6	-12	3	-6
CQA (40 ng·mL ⁻¹)	3	0	1	-2

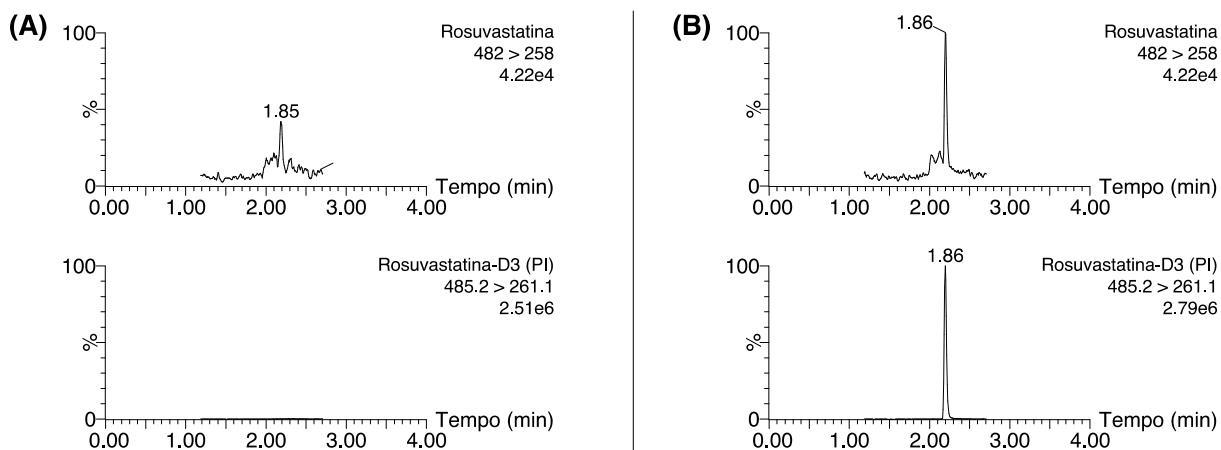
FMN: efeito matriz normalizado por padrão interno. r^2 : coeficiente de determinação. **CV:** coeficiente de variação. **EPR:** erro padrão relativo. **LIQ:** limite inferior de quantificação (* metoprolol 0,1 ng·mL⁻¹, alfa-hidroxi metoprolol 0,5 ng·mL⁻¹). **CQB:** controle de qualidade de baixa concentração (* metoprolol 0,25 ng·mL⁻¹, alfa-hidroxi metoprolol 1 ng·mL⁻¹). **CQM:** controle de qualidade de média concentração. **CQA:** controle de qualidade de alta concentração. **CQD:** controle de qualidade de diluição.

O método de análise da rosuvastatina em plasma mostrou linearidade no intervalo de concentrações plasmáticas de 10–16.000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e permitiu a quantificação de todas as amostras coletadas até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores contendo a dose subterapêutica de 2 mg de rosuvastatina administrado a participantes com hepatite C crônica.

Os cromatogramas referentes às análises de rosuvastatina em plasma estão apresentados como amostras de plasma branco (Figura 4A), amostras de plasma branco enriquecidas com solução padrão de rosuvastatina na concentração do LIQ ($10\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma, Figura 4B), amostra de plasma branco enriquecida com solução padrão de rosuvastatina ($4.000\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma, Figura 5A) e amostra de plasma de participante com hepatite C crônica (Figura 5B).

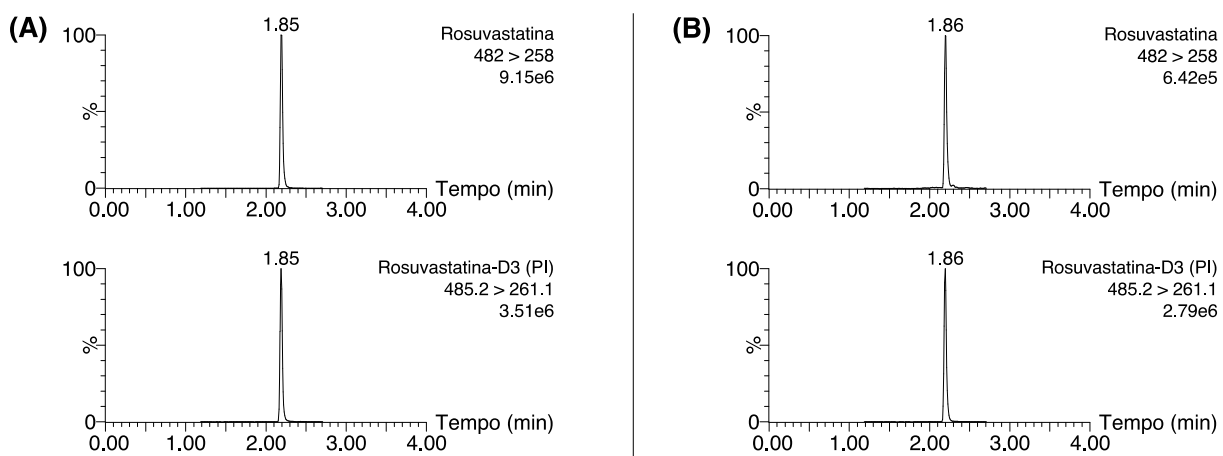
A Tabela 5 apresenta os limites de confiança para os ensaios de validação do método de análise da rosuvastatina em plasma.

Figura 4: Cromatogramas referentes à análise de plasma branco (A) e plasma branco enriquecido com a solução padrão na concentração do limite inferior de quantificação (B) monitorados nas transições da rosuvastatina e padrão interno rosuvastatina-D3.



Limite inferior de quantificação: $10\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma. Padrão interno: rosuvastatina-D3 $1.000\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma.

Figura 5: Cromatogramas referentes a amostra de plasma branco enriquecido com solução padrão na concentração $4.000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma **(A)** e amostra de participante com hepatite C crônica **(B)** monitorados nas transições do da rosuvastatina e padrão interno rosuvastatina-D3.



Padrão interno: rosuvastatina-D3 $1.000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em plasma.

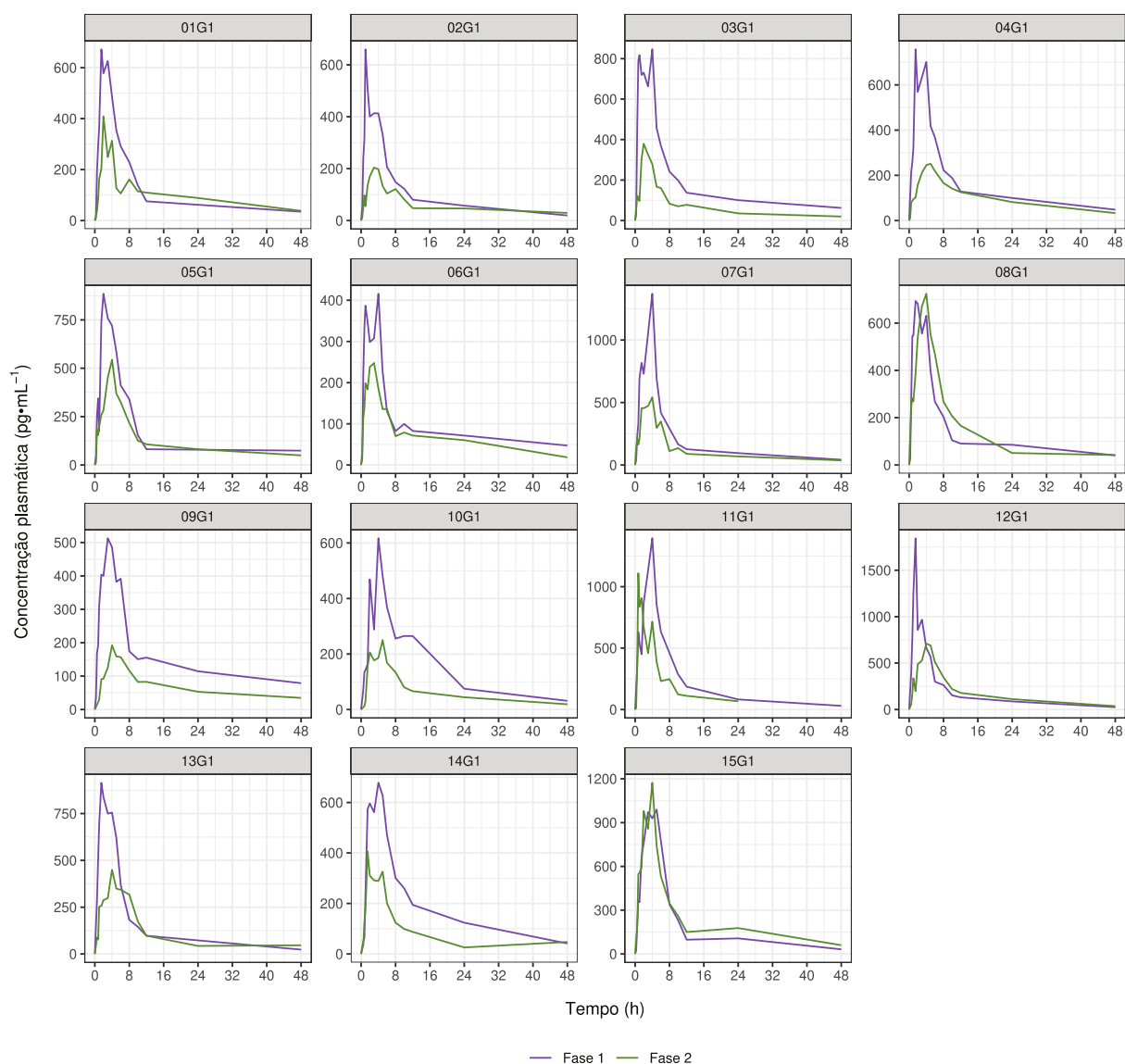
Tabela 5: Limites de confiança do método de análise da rosuvastatina em plasma humano.

rosuvastatina		
Efeito matriz FMN médio (CV%)	0,96 (8%)	
Linearidade (pg·mL ⁻¹)	10–16.000	
Equação da reta	$y = 0,000717399 \cdot x + 0,00555514$	
r^2	0,995158	
Precisão e Exatidão		
<i>Intracorrída (5 replicatas)</i>	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
LIQ (10 pg·mL ⁻¹)	15	-2
CQB (15,63 pg·mL ⁻¹)	12	-12
CQM ₁ (250 pg·mL ⁻¹)	3	-1
CQM ₂ (8.000 pg·mL ⁻¹)	5	-2
CQA (12.800 pg·mL ⁻¹)	7	-7
CQD (32.000 pg·mL ⁻¹ 1:5, v/v)	4	4
<i>Intercorridas (3 corridas com 5 replicatas)</i>	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
LIQ (10 pg·mL ⁻¹)	13	-2
CQB (15,63 pg·mL ⁻¹)	14	4
CQM ₁ (250 pg·mL ⁻¹)	7	-1
CQM ₂ (8.000 pg·mL ⁻¹)	5	-1
CQA (12.800 pg·mL ⁻¹)	8	2
CQD (32.000 pg·mL ⁻¹ 1:5, v/v)	4	1
Estabilidades		
<i>Ciclos descongelamento (-80 °C, 25 °C, 3 ciclos)</i>	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
CQB (15,63 pg·mL ⁻¹)	10	-3
CQA (12.800 pg·mL ⁻¹)	4	2
<i>Curta duração (25 °C, 2 h)</i>	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
CQB (15,63 pg·mL ⁻¹)	12	9
CQA (12.800 pg·mL ⁻¹)	4	3
<i>Pós-processamento (15 °C, 24 h)</i>	Precisão (% CV)	Exatidão (% EPR)
CQB (15,63 pg·mL ⁻¹)	7	3
CQA (12.800 pg·mL ⁻¹)	5	3

FMN: efeito matriz normalizado por padrão interno. r^2 : coeficiente de determinação. **CV:** coeficiente de variação. **EPR:** erro padrão relativo. **LIQ:** limite inferior de quantificação. **CQB:** controle de qualidade de baixa concentração. **CQM₁:** controle de qualidade de média concentração 1. **CQM₂:** controle de qualidade de média concentração 2. **CQA:** controle de qualidade de alta concentração. **CQD:** controle de qualidade de diluição.

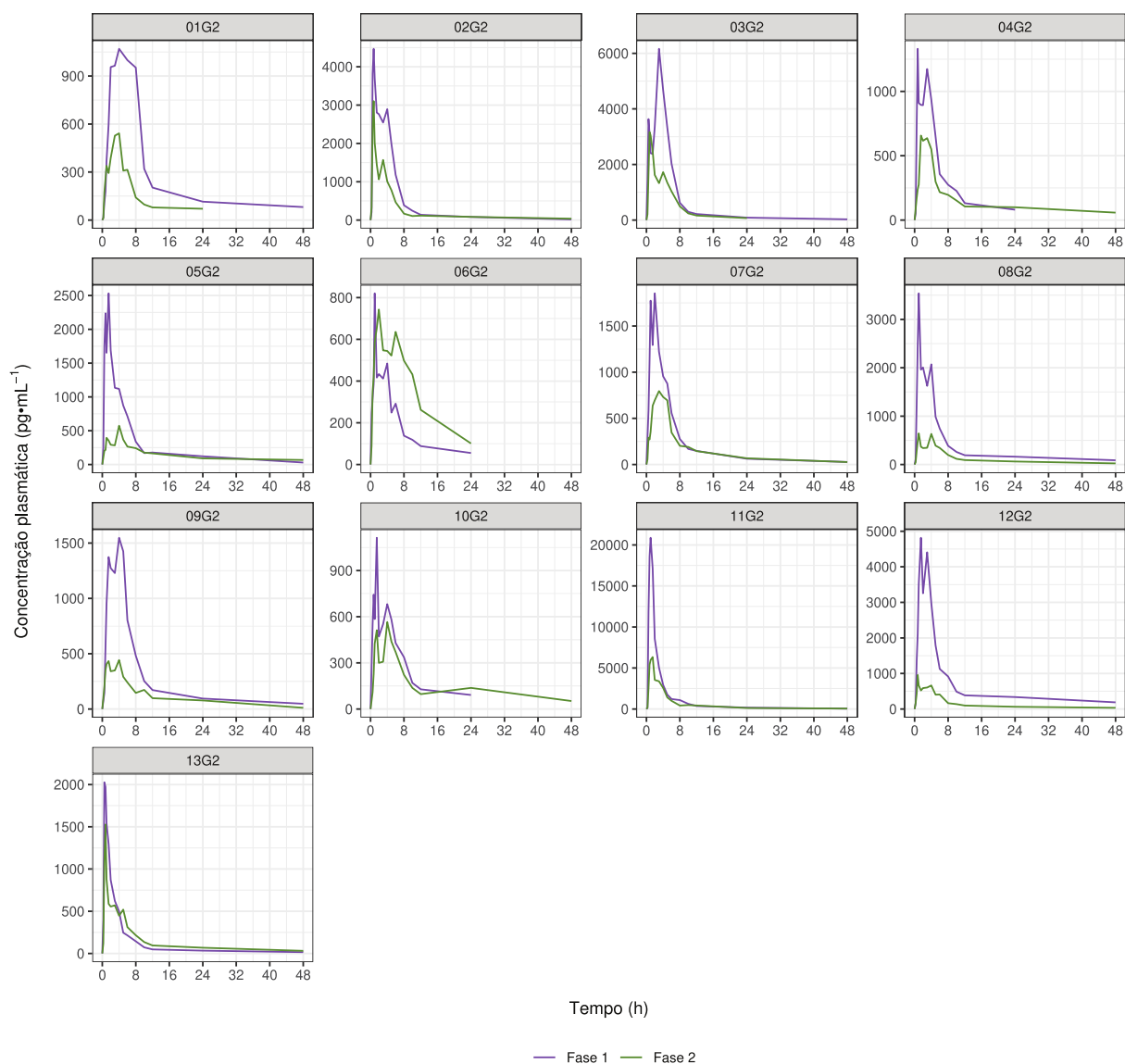
As Figuras 6 e 7 mostram os dados individuais das curvas de concentração plasmática da rosuvastatina *versus* tempo obtidas em ambas as fases para os Grupos 1 e 2, respectivamente.

Figura 6: Curvas de concentração plasmática da rosuvastatina *versus* tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (2 mg de rosuvastatina) em 15 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 1.



Grupo 1: participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

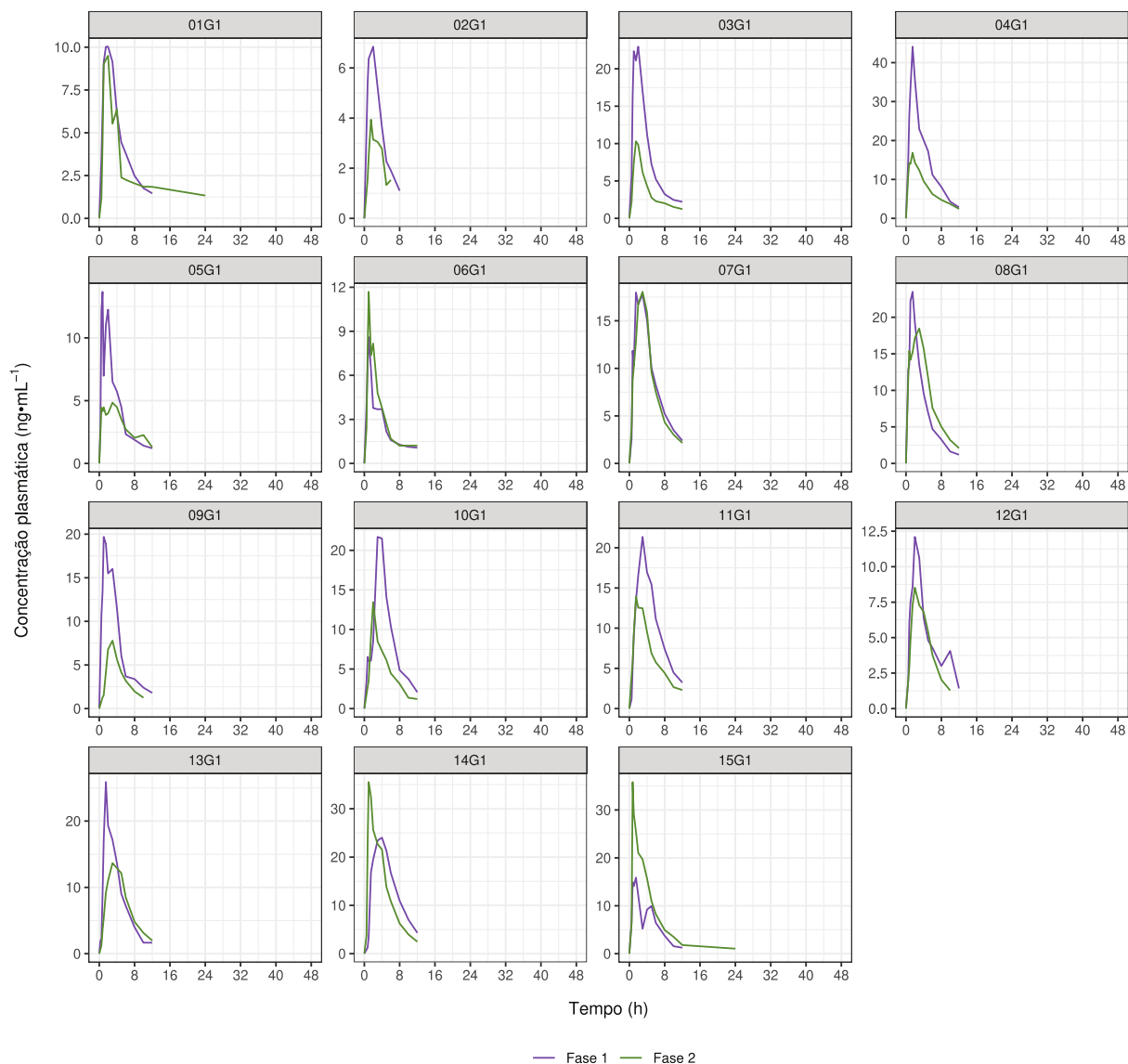
Figura 7: Curvas de concentração plasmática da rosuvastatina *versus* tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (2 mg de rosuvastatina) em 13 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 2.



Grupo 2: participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

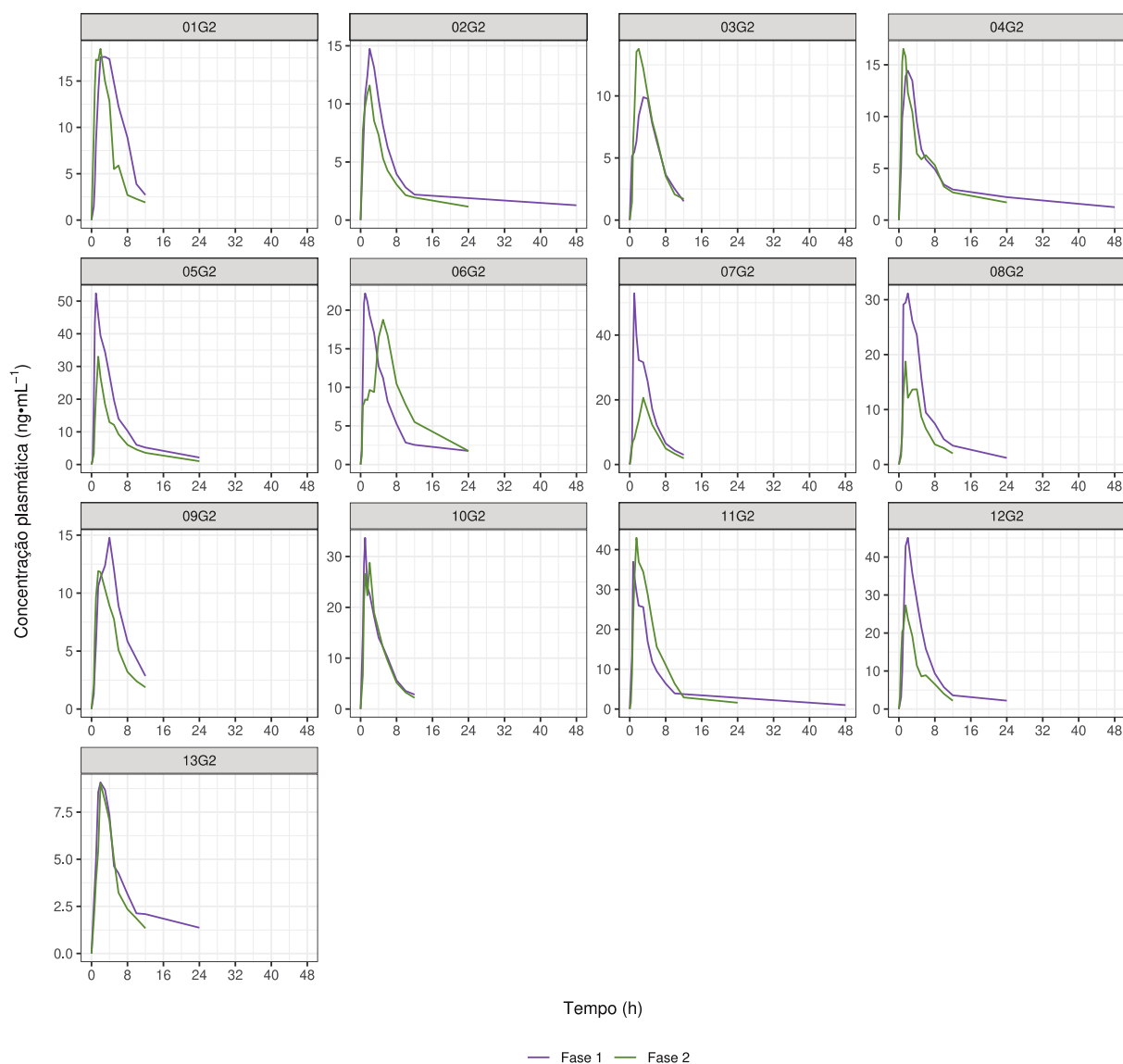
As Figuras 8 e 9 mostram os dados individuais das curvas de concentração plasmática da fexofenadina *versus* tempo obtidas em ambas as fases para os Grupos 1 e 2, respectivamente.

Figura 8: Curvas de concentração plasmática da fexofenadina *versus* tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (10 mg de fexofenadina) em 15 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 1.



Grupo 1: participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Figura 9: Curvas de concentração plasmática da fexofenadina *versus* tempo até 48 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores (10 mg de fexofenadina) em 13 participantes com hepatite C crônica alocados no Grupo 2.

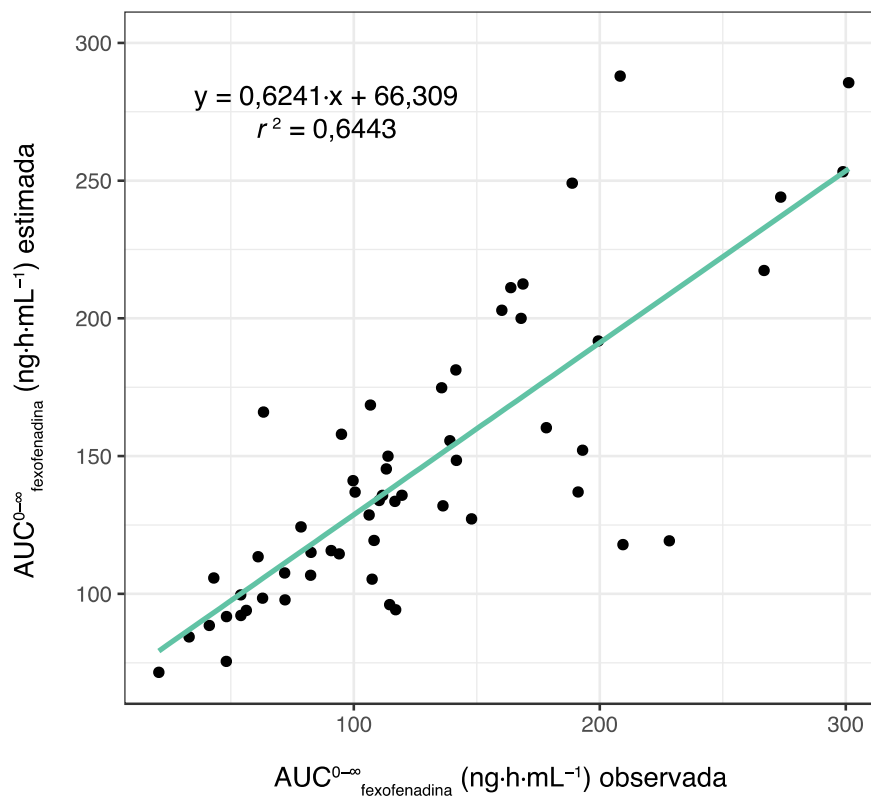


Grupo 2: participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

O método de quantificação da fexofenadina em plasma não foi sensível o suficiente para calcular a $AUC^{0-\infty}$ com apenas 20% de extrapolação da fase de eliminação para uma dose de 10 mg de fexofenadina administrada a participantes com hepatite C crônica. Desta forma, fez-se necessário utilizar um método alternativo de estimação da $AUC^{0-\infty}$, utilizando os dados de concentração plasmática máxima observada aplicando-se a equação 3 ($AUC^{0-\infty} = C_{max} \times 4,4198 + 54,112$), já utilizada na literatura (RUSSELL; STOLTZ; WEIR, 1998; SRINIVAS, 2016). A fórmula

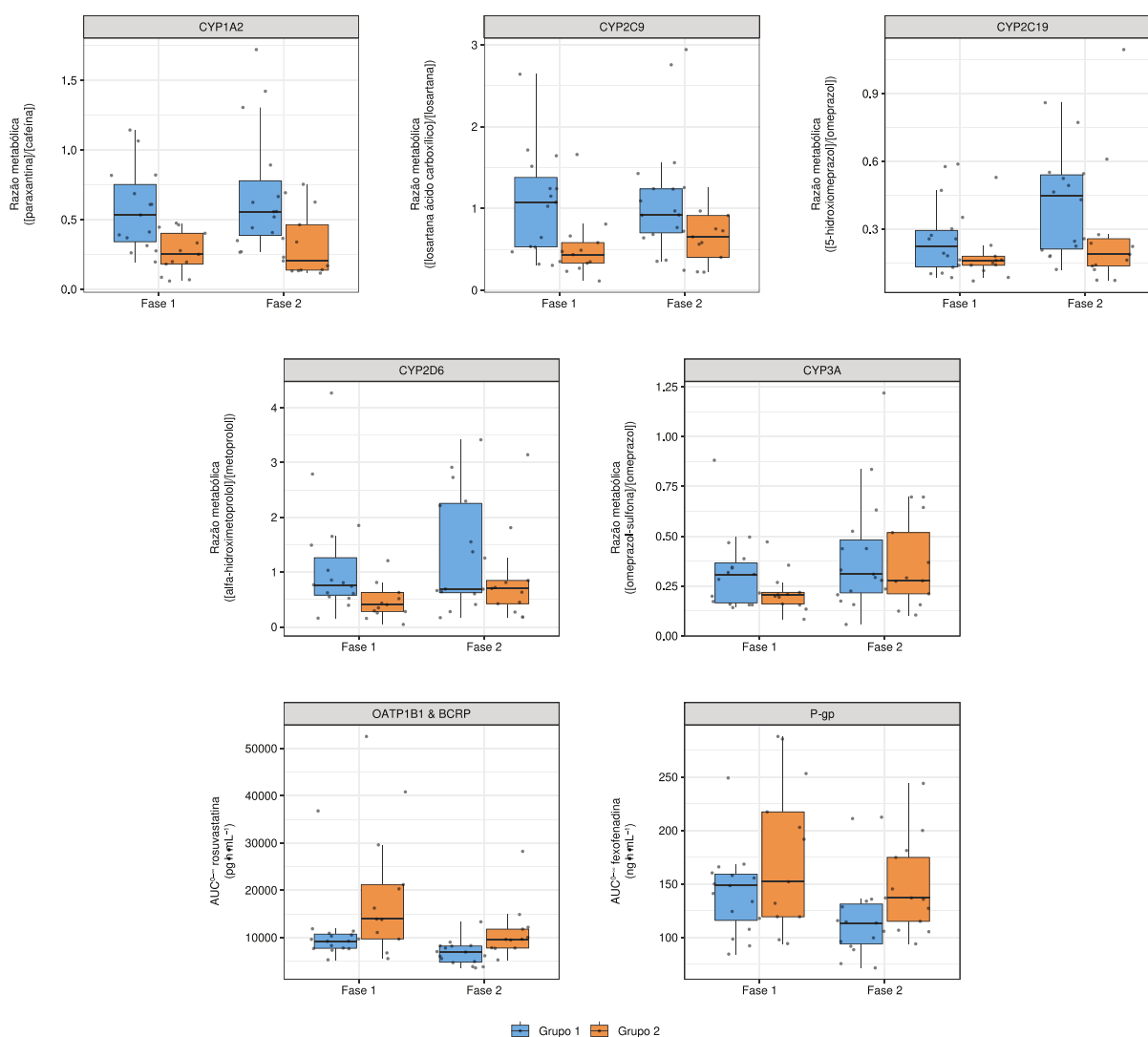
apresentou correlação linear adequada entre método dos trapézios empregando o programa Phoenix WinNonlin™, com os dados observados, e a estimativa da $AUC^{0-\infty}$, demonstrado na Figura 10.

Figura 10: Correlação linear entre $AUC^{0-\infty}$ observado (calculado com base no método dos trapézios empregando o programa Phoenix WinNonlin™) e $AUC^{0-\infty}$ estimado (calculado com base na equação. $AUC^{0-\infty} = C_{\max} \times 4,4198 + 54,112$ (RUSSELL; STOLTZ; WEIR, 1998; SRINIVAS, 2016).



A Figura 11 apresenta os gráficos *boxplots* das atividades das enzimas metabolizadoras e transportadores de membrana estudados, expressos também como dados individuais. Os dados individuais estão apresentados no APÊNDICE C, Tabelas 14–20.

Figura 11: Gráficos *boxplots* das atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A e transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP e P-gp avaliados em 28 participantes portadores de hepatite C crônica alocados nos Grupos 1 e 2.

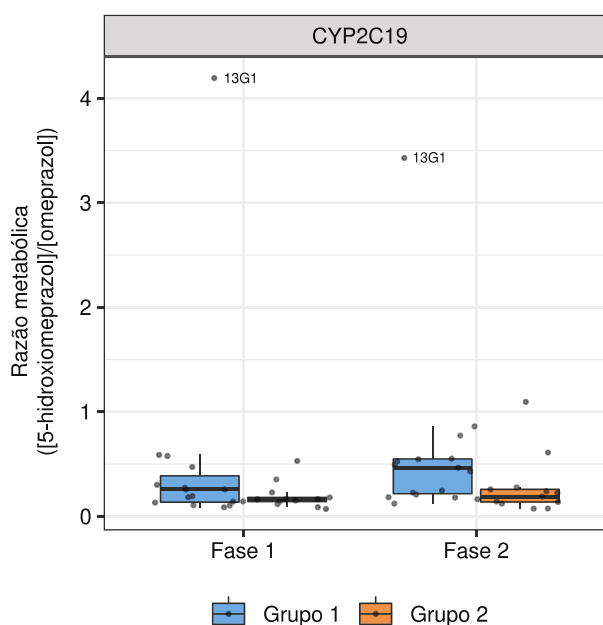


Grupo 1: participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

O participante 13 do Grupo 1 (13G1, fibrose hepática inicial F0/F1), apresentou valores de razões metabólicas de 5-hidroxiomeprazol por omeprazol de 4,19 na

Fase 1 e 3,43 na Fase 2 (APÊNDICE, Tabela 16). Estes valores são 19 e dez vezes superiores à média geométrica do Grupo 1 para as Fases 1 e 2, respectivamente, ou 22 e 10 vezes superiores à média geométrica de todos os participantes para as Fases 1 e 2, respectivamente, como mostrado na Figura 12. Desta forma, as RMs do o participante 13G1 para a CYP2C19 foram consideradas valores atípicos (*outlier*) e desconsiderados das análises estatísticas para a atividade da CYP2C19, apresentadas nas Tabelas 6–8 e Figuras 11–14.

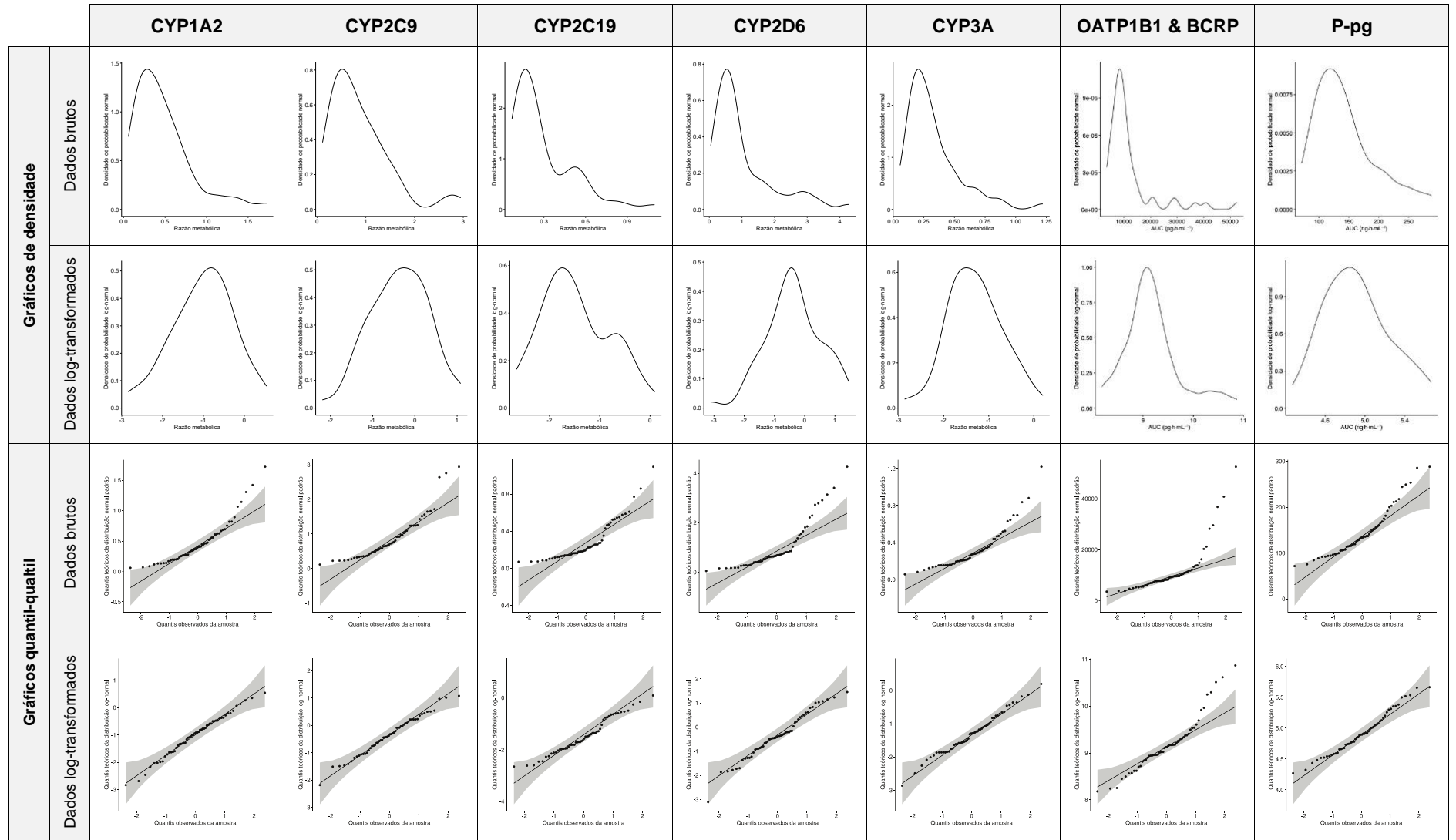
Figura 12: Gráfico *boxplot* da atividade da enzima metabolizadora CYP2C19 avaliados em 28 participantes portadores de hepatite C crônica alocados nos Grupos 1 e 2, incluindo os valores atípicos do participante 13G1.



13G1: participante 13 do Grupo 1. **Grupo 1:** participante com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participante com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

A Figura 13 permite a inspeção visual das distribuições normal ou log-normal para as atividades das enzimas metabolizadoras e transportadores de membrana.

Figura 13: Dados plotados como histogramas de densidade de probabilidade e gráficos quantil-quantil (Q-Q) para os valores originais e valores log-transformados.



A Tabela 6 apresenta os resultados dos testes de Shapiro-Wilk para cada fármaco marcador.

Tabela 6: Teste de Shapiro-Wilk para dados brutos e dados log-transformados.

Enzimas e transportadores	Dados brutos		Dados log-transformados	
	Valor <i>W</i>	Valor <i>p</i>	Valor <i>W</i>	Valor <i>p</i>
CYP1A2	0,86454	0,00001537	0,98836	0,86440322 (*)
CYP2C9	0,85237	0,00000673	0,98864	0,87559160 (*)
CYP2C19	0,81341	0,00000086	0,96461	0,11085758 (*)
CYP2D6	0,79701	0,00000024	0,97813	0,39994789 (*)
CYP3A	0,83053	0,00000167	0,98880	0,88182857 (*)
OATP1B1 & BCRP	0,66619	0,00000000	0,92893	0,00269087
P-gp	0,90553	0,00034417	0,97510	0,29757498 (*)

(*) $p > 0,05$.

Os valores $p > 0,05$ sugerem que não existem evidências estatísticas de que a distribuição dos dados seja significativamente diferente de uma distribuição normal. Em outras palavras, pode-se assumir uma distribuição normal quando $p > 0,05$. Os gráficos de inspeção visual apresentados na Figura 13 estão de acordo com os resultados obtidos no teste de Shapiro-Wilk (Tabela 6). Portanto, concluímos com segurança que CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e P-gp apresentam distribuições log-normais, enquanto OATP1B1 & BCRP apresentaram distribuição não-paramétrica. Desta forma, nas análises estatísticas foram empregados o teste *t* para amostras pareadas comparando as Fases 1 e 2 de cada grupo (Tabela 7), o teste *t* para amostras não-pareadas comparando os Grupos 1 e 2 em cada fase (Tabela 8) para CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e P-gp, o teste de Wilcoxon para amostras pareadas comparando as Fases 1 e 2 de cada grupo (Tabela 9) e o teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas comparando os Grupos 1 e 2 em cada fase (Tabela 10) para OATP1B1 & BCRP. A Figura 14 apresenta os gráficos das médias geométricas ou medianas, assim como dos respectivos IC 90% das atividades das enzimas metabolizadoras e transportadores de membrana obtidos pelos respectivos testes estatísticos plotados junto ao intervalo de bioequivalência 0,8–1,25.

Tabela 7: Atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, e CYP3A e do transportador de membrana P-gp comparando as Fases 1 e 2 de cada grupo analisadas pelo teste *t* para amostras pareadas. Dados apresentados como média geométrica (intervalo de confiança geométrico 90%).

Grupo		Fase 1			Fase 2			Fase 2 / Fase 1	
		<i>n</i>	Média geométrica (IC 90%)	CV geométrico (%)	<i>n</i>	Média geométrica (IC 90%)	CV geométrico (%)	Média geométrica (IC 90%)	Valor <i>p</i>
CYP1A2	1	15	0,50 (0,39–0,63)	57,50	15	0,58 (0,45–0,76)	63,51	1,17 (0,98–1,40)	0,13307
	2	13	0,22 (0,15–0,31)	83,32	13	0,25 (0,18–0,35)	79,71	1,16 (0,85–1,60)	0,40892
CYP2C9	1	15	0,89 (0,66–1,20)	72,26	15	0,91 (0,72–1,17)	57,17	1,02 (0,81–1,30)	0,85912
	2	13	0,42 (0,31–0,59)	72,75	13	0,62 (0,43–0,89)	84,90	1,45 (1,03–2,05)	0,07698
CYP2C19	1	14	0,22 (0,16–0,29)	70,23	14	0,35 (0,26–0,47)	67,10	1,63 (1,32–2,00)	0,00110 (**)
	2	13	0,17 (0,13–0,22)	56,95	13	0,20 (0,14–0,29)	88,21	1,22 (0,87–1,71)	0,30452
CYP2D6	1	15	0,85 (0,59–1,22)	94,07	15	0,98 (0,64–1,48)	114,67	1,15 (0,92–1,45)	0,28828
	2	13	0,39 (0,25–0,62)	118,12	13	0,63 (0,42–0,96)	101,46	1,61 (0,99–2,64)	0,10884
CYP3A	1	15	0,28 (0,22–0,35)	57,09	15	0,32 (0,23–0,45)	86,40	1,15 (0,82–1,61)	0,47681
	2	13	0,20 (0,16–0,25)	44,99	13	0,30 (0,22–0,40)	70,69	1,46 (1,08–1,98)	0,04740 (*)
P-gp	1	15	137,44 (121,11–155,97)	28,36	15	113,87 (98,67–131,41)	32,30	0,83 (0,71–0,97)	0,05452
	2	13	162,41 (133,42–197,71)	41,41	13	141,18 (123,16–161,84)	28,15	0,87 (0,77–0,98)	0,05653

IC 90%: intervalo de confiança 90%. **CV:** coeficiente de variação. **CYP1A2:** analisado pela razão metabólica paraxantina/cafeína em plasma. **CYP2C9:** analisado pela razão metabólica ácido carboxílico E-3174/losartana em plasma. **CYP2C19:** analisado como razão metabólica 5-hidroxiomeprazol/omeprazol. **CYP2D6:** analisado pela razão metabólica alfa-hidroxi metoprolol/metoprolol. **CYP3A:** analisado pela razão metabólica omeprazol-sulfona/omeprazol. **P-gp:** analisados como AUC^{0-∞} de fexofenadina (ng·h·mL⁻¹). **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, *n* = 7) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, *n* = 8). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, *n* = 4) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, *n* = 9). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada. (*) *p* < 0,05; (**) *p* < 0,01.

Tabela 8: Atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A e do transportador de membrana P-gp comparando os Grupos 1 e 2 em cada fase analisados pelo teste *t* para amostras não-pareadas. Dados apresentados como média geométrica (intervalo de confiança geométrico 90%).

Fase	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 2 / Grupo 1		
	<i>n</i>	Média geométrica (IC 90%)	CV geométrico (%)	<i>n</i>	Média geométrica (IC 90%)	CV geométrico (%)	Média geométrica (IC 90%)	Valor <i>p</i>	
CYP1A2	1	15	0,50 (0,39–0,63)	57,50	13	0,22 (0,15–0,31)	83,32	0,43 (0,28–0,66)	0,00238 (**)
	2	15	0,58 (0,45–0,76)	63,51	13	0,25 (0,18–0,35)	79,71	0,43 (0,28–0,65)	0,00219 (**)
CYP2C9	1	15	0,89 (0,66–1,20)	72,26	13	0,42 (0,31–0,59)	72,75	0,48 (0,31–0,72)	0,00573 (**)
	2	15	0,91 (0,72–1,17)	57,17	13	0,62 (0,43–0,89)	84,90	0,67 (0,44–1,03)	0,12278
CYP2C19	1	14	0,22 (0,16–0,29)	70,23	13	0,17 (0,13–0,22)	56,95	0,76 (0,52–1,12)	0,23802
	2	14	0,35 (0,26–0,47)	67,10	13	0,20 (0,14–0,29)	88,21	0,57 (0,36–0,91)	0,04820 (*)
CYP2D6	1	15	0,85 (0,59–1,22)	94,07	13	0,39 (0,25–0,62)	118,12	0,46 (0,26–0,82)	0,02903 (*)
	2	15	0,98 (0,64–1,48)	114,67	13	0,63 (0,42–0,96)	101,46	0,65 (0,37–1,14)	0,20402
CYP3A	1	15	0,28 (0,22–0,35)	57,09	13	0,20 (0,16–0,25)	44,99	0,73 (0,53–0,99)	0,08989
	2	15	0,32 (0,23–0,45)	86,40	13	0,30 (0,22–0,40)	70,69	0,92 (0,59–1,44)	0,75770
P-gp	1	15	137,44 (121,11–155,97)	28,36	13	162,41 (133,42–197,71)	41,41	1,18 (0,94–1,48)	0,21855
	2	15	113,87 (98,67–131,41)	32,30	13	141,18 (123,16–161,84)	28,15	1,24 (1,02–1,50)	0,06531

IC 90%: intervalo de confiança 90%. **CV:** coeficiente de variação. **CYP1A2:** analisado pela razão metabólica paraxantina/cafeína em plasma. **CYP2C9:** analisado pela razão metabólica ácido carboxílico E-3174/losartana em plasma. **CYP2C19:** analisado como razão metabólica 5-hidroxiomeprazol/omeprazol. **CYP2D6:** analisado pela razão metabólica alfa-hidroximetoprolol/metoprolol. **CYP3A:** analisado pela razão metabólica omeprazol-sulfona/omeprazol. **P-gp:** analisados como $AUC^{0-\infty}$ de fexofenadina ($ng \cdot h \cdot mL^{-1}$). **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Tabela 9: Atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP comparando as Fases 1 e 2 de cada grupo analisadas pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Dados apresentados como mediana (amplitude interquartil P5–P95) e mediana (intervalo de confiança 90%).

Grupo	Fase	Fase 1			Fase 2			Fase 2 / Fase 1	
		<i>n</i>	Mediana (P5–P95)	CV aritmético (%)	<i>n</i>	Mediana (P5–P95)	CV aritmético (%)	Mediana (IC 90%)	Valor <i>p</i>
OATP1B1 & BCRP	1	15	9.215,09 (6701,98–19321,16)	67,60	15	6.916,43 (3725,98–10293,65)	38,25	0,75 (0,53–0,82)	0,00201 (**)
	2	13	13.910,67 (6259,33–45501,38)	72,43	13	9.592,45 (5778,90–20212,60)	54,06	0,69 (0,46–0,85)	0,02148 (*)

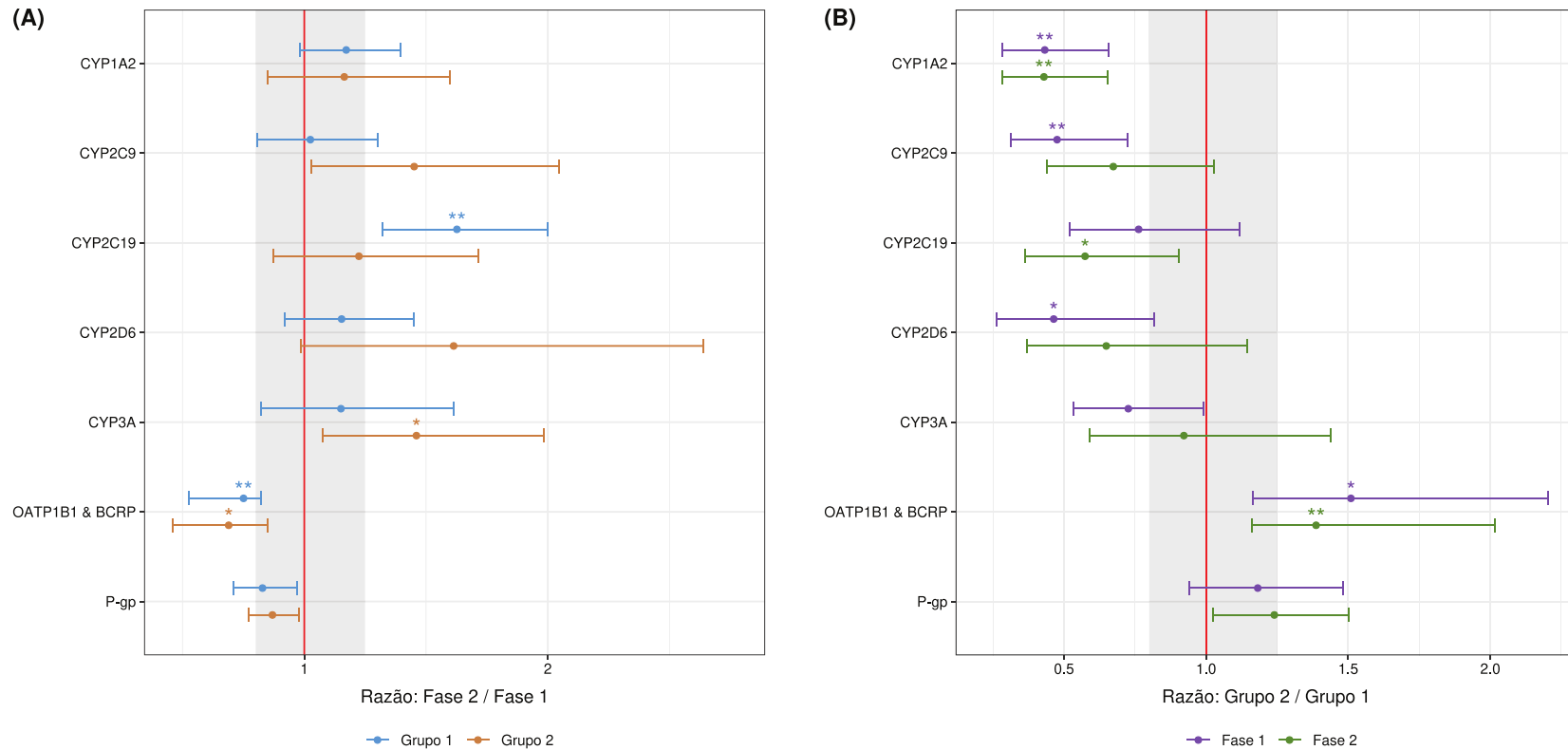
P5–P95: amplitude interquartil. **CV:** coeficiente de variação. **IC 90%:** intervalo de confiança 90%. **OATP1B1 & BCRP:** analisados como AUC^{0–∞} de rosuvastina (pg·h·mL⁻¹). **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, *n* = 7) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, *n* = 8). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, *n* = 4) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, *n* = 9). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada. (*) *p* < 0,05; (**) *p* < 0,01.

Tabela 10: Atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP comparando os Grupos 1 e 2 em cada fase analisados pelo teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas. Dados apresentados como mediana (amplitude interquartil P5–P95) e mediana (intervalo de confiança 90%).

Fase	Grupo	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 2 / Grupo 1	
		<i>n</i>	Mediana (P5–P95)	CV aritmético (%)	<i>n</i>	Mediana (P5–P95)	CV aritmético (%)	Mediana (IC 90%)	Valor <i>p</i>
OATP1B1 & BCRP	1	15	9.215,09 (6701,98–19321,16)	67,60	13	13.910,67 (6259,33–45501,38)	72,43	1,51 (1,17–2,20)	0,02530 (*)
	2	15	6.916,43 (3725,98–10293,65)	38,25	13	9.592,45 (5778,90–20212,60)	54,06	1,39 (1,16–2,02)	0,00829 (**)

P5–P95: amplitude interquartil. **CV:** coeficiente de variação. **IC 90%:** intervalo de confiança 90%. **OATP1B1 & BCRP:** analisados como AUC^{0–∞} de rosuvastina (pg·h·mL⁻¹). **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, *n* = 7) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, *n* = 8). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, *n* = 4) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, *n* = 9). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada. (*) *p* < 0,05; (**) *p* < 0,01.

Figura 14: Gráficos de bioequivalência das atividades das enzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A e dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP e P-gp.



A: Comparação das Fases 1 e 2 de cada grupo utilizando o teste *t* para amostras pareadas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A e P-gp, expressas como médias geométricas e intervalo de confiança 90%) e o teste de Wilcoxon para amostras pareadas (OATP1B1 & BCRP, expressas como medianas e intervalos de confiança 90%). **B:** Comparação dos Grupos 1 e 2 em cada fase utilizando o teste *t* para amostras não-pareadas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A, P-gp, expressas como médias geométricas e intervalos de confiança 90%) e o teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas (OATP1B1 & BCRP, expressas como medianas e intervalos de confiança 90%). A área hachurada representa o intervalo de bioequivalência 0,8–1,25. **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

Embora haja informações provenientes de estudos *in vivo* sobre como a inflamação afeta a atividade de isoformas CYP, trabalhos anteriores realizaram estudos comparando voluntários saudáveis a pacientes com diferentes etiologias e gravidade da doença hepática (FRYE et al., 2006). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a atividade *in vivo* de isoformas CYP e transportadores de membrana em pacientes com fibrose hepática decorrente de hepatite C crônica antes e após o tratamento com AADs e em que cada participante é seu próprio controle.

É fundamental ressaltar que os participantes avaliados no estudo não estavam sob a influência dos AADs utilizados para o tratamento da hepatite C crônica (sofosbuvir + daclatasvir ± ribavirina, ou ombitasvir + ritonavir + dasabuvir ± ribavirina, ou sofosbuvir + simeprevir ± ribavirina) em qualquer uma das duas fases do estudo, considerando que a Fase 1 foi realizada antes do início do tratamento para a hepatite C crônica e a Fase 2 foi realizada após a obtenção da resposta virológica sustentada (avaliada 12 semanas após o término do tratamento farmacológico). Portanto, as diferenças observadas nas razões das RMs não se devem a interações com os medicamentos associados para tratar a hepatite C crônica.

O coquetel de fármacos marcadores para isoformas CYP e transportadores de membrana foi utilizado em doses subterapêuticas, de acordo com estudo anterior do grupo (COELHO et al., 2020; CUSINATO et al., 2019). O emprego de doses subterapêuticas requer o desenvolvimento e a validação de métodos mais sensíveis do que aqueles normalmente reportados na literatura para doses terapêuticas. Os métodos de análise em amostras de plasma para a cafeína e paraxantina (dados não publicados); losartana e metabólito ácido carboxílico E-3174 (CUSINATO et al., 2019) e para a fexofenadina (XIMENEZ, 2018) já estavam desenvolvidos e validados no laboratório. O presente estudo exigiu o desenvolvimento e a validação de dois métodos analíticos: (1) análise sequencial do omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol-sulfona, metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol em plasma; (2) análise da rosuvastatina em plasma. Ambos os métodos mostraram sensibilidade para a análise das amostras de plasma coletadas 4 h após a administração do omeprazol (2 mg) e metoprolol (10 mg) (Tabelas 3 e 4; Figuras 2 e 3) ou para as amostras seriadas de plasma coletadas até 48 h após a administração de 2 mg de rosuvastatina (Tabela 5, Figuras 4 e 5).

As isoformas CYP, predominantemente expressas no fígado, são as principais enzimas envolvidas na fase 1 do metabolismo de fármacos. Entre as 57 isoformas CYP conhecidas, apenas a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A contribuem significativamente para o metabolismo dos fármacos disponíveis na clínica. A importância relativa da contribuição dessas enzimas para o metabolismo varia de 46% para a CYP3A, 16% para a CYP2C9, 12% para ambas a CYP2C19 e CYP2D6, 9% para a CYP1A e apenas 2% para a CYP2B6. A variabilidade interindividual na atividade das isoformas CYP depende de fatores genéticos e ambientais ou de diferentes doenças (WIENKERS; HEATH, 2005).

Estudos recentes vêm mostrando que a atividade da maioria das isoformas CYP pode aumentar ou diminuir na presença de substâncias endógenas, como citocinas pró-inflamatórias, podendo resultar em alterações farmacocinéticas e interações de fármacos (LENOIR et al., 2021a). A principal consequência clínica e preocupação desses achados é que um processo inflamatório agudo ou crônico pode modificar a exposição plasmática de um fármaco, possivelmente resultando em aumento da incidência de reações adversas ou ineficácia (MORGAN, 2009).

Uma vez que a hepatite C crônica é uma infecção do fígado e o fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo de fármacos, a investigação do efeito da infecção pelo VHC na atividade das isoformas CYP é de interesse na clínica (SAMER et al., 2013). Além disso, não se sabe como a introdução dos AADs alteraria o perfil do metabolismo de fármacos ao longo do tempo, à medida que os pacientes eliminam a infecção (após a obtenção da RVS). Se a inflamação for reduzida durante o tratamento, pode-se esperar que mudanças na farmacocinética possam ser observadas ao longo do tratamento farmacológico. Estudos anteriores mostram redução da atividade da CYP3A em pacientes com hepatite C crônica quando comparados com voluntários saudáveis (MORCOS et al., 2013).

Considerando as diferentes isoformas CYP e suas seletividades de substrato, nenhum fármaco marcador único pode fornecer uma medida da atividade de todas as enzimas responsáveis pelo metabolismo em um indivíduo. Uma estratégia alternativa é o uso de fármacos marcadores específicos selecionados com base em uma via do metabolismo predominantemente ou exclusivamente mediada por uma única isoforma CYP. A administração simultânea de vários fármacos marcadores de isoformas CYP, a estratégia de coquetel, oferece a vantagem da avaliação simultânea da atividade de diferentes isoformas CYP. No entanto, a estratégia do coquetel deve ser previamente

validada para evitar a ocorrência de interações entre os fármacos do coquetel (FRYE et al., 1997). O coquetel empregado no presente estudo para a avaliação das isoformas CYP foi desenvolvido com base em estudos anteriores da literatura incluindo estudos do nosso grupo de pesquisa (COELHO et al., 2020; CUSINATO et al., 2019; GIRI; PATEL; SRINIVAS, 2019).

A Tabela 7 e a Figura 14 mostram que não houve evidência estatística de alterações nas atividades *in vivo* das isoformas CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6 quando foram comparadas as Fases 1 (antes do tratamento com AADs) e 2 (após a obtenção da RVS) em ambos os Grupos 1 (fibrose hepática leve a moderada) e 2 (fibrose hepática avançada ou cirrose hepática). Esse resultado está de acordo com relatos de ausência de alterações significativas na abundância proteica da CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6 em biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica quando comparadas com biópsias hepáticas de pacientes com câncer de cólon metastático (DROZDZIK et al., 2021).

O omeprazol é metabolizado a 5-hidroxiomeprazol majoritariamente pela CYP2C19, mas também em menor proporção a omeprazol-sulfona pela CYP3A4 (BLUME et al., 2006; SHIRASAKA et al., 2013; WEDEMEYER; BLUME, 2014). As razões metabólicas (RM) das concentrações plasmáticas de 5-hidroxiomeprazol por concentrações plasmáticas de omeprazol em amostras de sangue coletadas 4 h após a administração de uma dose oral única de coquetel de fármacos marcadores contendo de 2 mg de omeprazol, expressam a atividade *in vivo* da CYP2C19 (DE ANDRÉS et al., 2016; RYU et al., 2007). Este é um aspecto chave do nosso estudo, em que cada participante é seu próprio controle, uma vez que a CYP2C19 é polimórfica e a comparação com indivíduos saudáveis introduziria uma variável adicional no estudo (SAKAI et al., 2001; SHIRAI et al., 2001).

As razões entre os valores de RM obtidos na Fase 2 pela Fase 1 do estudo foram de 1,63 (1,32–2,00; IC 90%) para o Grupo 1 e 1,22 (0,87–1,71; IC 90%) para o Grupo 2, dados mostrados na Tabela 7 e Figura 14A. A Tabela 7 apresenta os valores *p* para os testes *t* pareados menores que 0,05, enquanto a Figura 14A indica em cinza o intervalo de bioequivalência (0,8–1,25). A razão entre os valores de RMs para o Grupo 1 (F/0F1 e F2) foi superior a 1, evidenciando que a atividade da CYP2C19 foi reduzida em 37% com significância ($p < 0,01$) na Fase 1 quando comparada à Fase 2. Em relação ao Grupo 2, não foi observada alteração com significância na razão entre os valores de RMs obtidos nas Fases 1 e 2 do estudo.

Os resultados estão de acordo com o nosso conhecimento de que a inflamação diminui a atividade da CYP2C19 e, uma vez que a inflamação cessa, a inibição da CYP2C19 é ao menos parcialmente revertida (FRYE et al., 2006; KUGLER; KLEIN; ZANGER, 2020; OHNISHI et al., 2005; VERBEECK, 2008). No entanto, pacientes com hepatite C crônica e cirrose, como aqueles observados no Grupo 2, podem perder a capacidade de reversão da atividade de isoformas CYP.

A CYP2C19 e a CYP3A4 são referidas como as principais isoformas suprimidas em biópsias hepáticas de pacientes com inflamação hepática (KUGLER; KLEIN; ZANGER, 2020). Em um estudo clínico, pacientes com hepatite C crônica e cirrose genotipados como metabolizadores rápidos para a CYP2C19 apresentaram uma diminuição de dez vezes na capacidade de hidroxilação do omeprazol quando comparados a indivíduos saudáveis com o mesmo genótipo. A atividade da CYP2C19 foi a mais suscetível a alterações da função hepática quando comparada à CYP3A4 (OHNISHI et al., 2005). Estudos anteriores compararam o efeito da disfunção hepática em CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2E1 e propuseram que diferentes isoformas de CYP são afetadas de forma diferente pela gravidade da disfunção hepática. Dentre as isoformas avaliadas, a CYP2C19 foi a que diminuiu sua atividade com maior intensidade e velocidade em resposta a pequenas alterações na função hepática, sendo a isoforma mais sensível a tais alterações (FRYE et al., 2006; VERBEECK, 2008).

As RMs de concentrações plasmáticas omeprazol-sulfona por omeprazol, avaliadas 4 h após a administração do omeprazol, indicam a atividade da CYP3A, considerando que a formação do metabólito é dependente da referente isoforma (BLUME et al., 2006; SHIRASAKA et al., 2013; WEDEMEYER; BLUME, 2014). Em relação a CYP3A, não houve diferença entre as Fases 1 e 2 do estudo para os pacientes do Grupo 1, mas os dados apresentados na Tabela 7 e Figura 14A mostram que a atividade *in vivo* da enzima aumentou 46% [1,46 (1,08–1,98)] ($p < 0,05$) na Fase 2 (após a obtenção da RVS) quando comparada a Fase 1 (antes do tratamento com os AADs) para os pacientes do Grupo 2. Os dados observados no Grupo 2 estão de acordo com estudo clínico que mostra redução da atividade da CYP3A em pacientes com hepatite C crônica quando comparados a voluntários saudáveis (MORCOS et al., 2013), bem como com estudos de avaliação dos níveis de RNA mensageiro de isoformas CYP em culturas de hepatócitos humanos expostos a diferentes concentrações de IL-6, com relatos de diminuição de mais de 90% na

expressão da CYP3A4 (AITKEN; MORGAN, 2007). No entanto, os dados obtidos para o Grupo 2, mas não para o Grupo 1, são contraditórios em relação aos estudos que relatam ausência de alterações na abundância da CYP3A4 em biópsias de pacientes com hepatite C crônica (DROZDZIK et al., 2021).

Na Fase 1 do estudo, as atividades das isoformas CYP2C19 e CYP3A não demonstraram diferenças entre os Grupos 1 e 2, mas as atividades da CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6 no Grupo 2 foram, respectivamente, de 43% [0,43 (0,28–0,66)] ($p < 0,01$), 48% [0,48 (0,31–0,72)] ($p < 0,01$) e 46% [0,46 (0,26–0,82)] ($p < 0,05$) dos valores observados para o Grupo 1; Tabela 8 e Figura 14B. A menor atividade das isoformas CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6 no Grupo 2 é esperada em função do maior grau de fibrose hepática e/ou da presença de cirrose com conseqüente redução na capacidade de reversão da atividade da isoforma CYP. Um estudo anterior avaliou a expressão de RNA mensageiro em biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica em estádios de fibrose F0/F1 (fibrose hepática inicial), F2 (fibrose hepática moderada) e F3 (fibrose hepática grave) e observou que as isoformas CYP1A e CYP2C9 tinham suas expressões reduzidas em função da progressão da fibrose hepática (HANADA et al., 2012).

Na Fase 2 do estudo, as atividades das isoformas CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A não apresentaram diferenças significativas entre os Grupos 1 e 2, no entanto, as atividades da CYP1A2 e CYP2C19 no Grupo 2 representaram, respectivamente, 43% [0,43 (0,28–0,65)] ($p < 0,01$) e 57% [0,57 (0,36–0,91)] ($p < 0,05$) das atividades observadas para o Grupo 1; Tabela 8 e Figura 14B.

A fexofenadina não é um marcador específico para a P-gp, pois também é um substrato para o transportador de captação intestinal OATP2B1 (IMANAGA et al., 2011), para os transportadores de captação hepática OATP1B1 e OATP1B3 (NIEMI et al., 2005) e provavelmente um substrato para os transportadores de efluxo renal OATs (YASUI-FURUKORI et al., 2005) e possivelmente para outros, como MRP2 (MATSUSHIMA et al., 2008). A fexofenadina tem sido usada como um marcador da P-gp porque, em camundongos, a P-gp tem um efeito dominante na absorção intestinal, mas não na excreção biliar ou renal da fexofenadina (CVETKOVIC et al., 1999; TAHARA et al., 2005). Outros fármacos marcadores alternativos da P-gp, como a digoxina, também sofrem de falta de especificidade (MA et al., 2010; SHI; ZHANG; YELESWARAM, 2011). O etexilato de dabigatrana, proposto como um fármaco marcador mais específico da P-gp requer validação (EMA, 2012), pois também está

sujeito ao metabolismo intestinal limitado da CYP3A4 e a glicuronidação (BLECH et al., 2008; STANGIER et al., 2007). No entanto, devido à biodisponibilidade relativamente baixa da digoxina, o etexilato de dabigatrana e a fexofenadina são considerados fármacos marcadores de P-gp mais apropriados em comparação com a digoxina na avaliação da atividade da P-gp intestinal (CHU et al., 2018).

Dado que o coquetel de fármacos foi administrado por via oral, ao analisar a razões Fase 2/Fase 1 de $AUC^{0-\infty}$ da fexofenadina, observamos a atividade da P-gp intestinal associada a influência de outros transportadores. Uma razão inferior a 1 significaria que a atividade P-gp intestinal, um transportador de efluxo, era menor na Fase 1 do estudo, onde observar-se-ia valores de $AUC^{0-\infty}$ maiores. No entanto, não houve diferenças significativas entre as Fases 1 e 2 para nenhum dos grupos avaliados (Tabela 7 e Figura 14A). Assim, os dados sugerem que a progressão da fibrose hepática não altera a atividade da P-gp intestinal. Ressalta-se que um estudo de expressão de RNA mensageiro e imuno-histoquímica da *MDR1*/P-gp em amostras de biópsias hepáticas reporta aumento da expressão do transportador em pacientes com hepatite C crônica associada à cirrose (OGASAWARA et al., 2010). Por outro lado, estudos anteriores mostram redução da expressão proteica da P-gp em fígados cirróticos de pacientes com hepatite C quando comparados aos controles (WANG et al., 2016).

A rosuvastatina vem sendo utilizada como fármaco marcador do transportador de membrana OATP1B1/1B3, seja após uma dose oral terapêutica, subterapêutica ou microdose como parte de um coquetel de fármacos marcadores. Estudos com culturas de hepatócitos humanos mostram que o metabolismo da rosuvastatina é extremamente lento e com formação de um único metabólito abundante, a N-desmetilrosuvastatina. A CYP2C9 é a principal enzima envolvida no metabolismo da rosuvastatina, com contribuições minoritárias da CYP2C19 e CYP3A4. Aproximadamente 72% da rosuvastatina é eliminada por via fecal sob a forma inalterada, com aproximadamente 28% por excreção renal (ÂNGELO et al., 2018; COOPER et al., 2002).

A rosuvastatina, embora considerada substrato de OATP1B, também é substrato *in vitro* de outros transportadores, como OATP2B1, NTCP, BCRP, P-gp, OAT3, MRP3 e MRP4 (ELSBY; HILGENDORF; FENNER, 2012; LEE et al., 2015; MOMPER; TSUNODA; MA, 2016). A alteração da atividade dos múltiplos transportadores diferentes do OATP1B expressos no intestino (BCRP e OATP2B1),

fígado (NTCP e OATP2B1) ou rins (OAT3) pode ser o fator responsável pela alteração da farmacocinética da rosuvastatina após a administração oral de um inibidor desses transportadores (PASANEN et al., 2007). Assim, a rosuvastatina é um fármaco marcador adequado para o OATP1B1 devido a disponibilidade de dados farmacogenômicos, dados clínicos de interações de fármacos e conhecimento de que a atividade do OATP1B1 hepático representa a etapa limitante de sua distribuição para o fígado. No entanto, o efeito potencial do envolvimento dos outros transportadores também deve ser considerado ao interpretar as alterações observadas na exposição sistêmica da rosuvastatina (CHU et al., 2018).

Conforme discutido acima, a rosuvastatina é um substrato para múltiplos transportadores de captação e efluxo, incluindo o BCRP. O polimorfismo em *ABCG2* (c.421C>A) resulta em aumento significativo da exposição plasmática da rosuvastatina, apoiando seu uso também como fármaco marcador do BCRP (GIACOMINI et al., 2013; YEE et al., 2018). Como a inibição do BCRP pode alterar tanto a absorção intestinal quanto a excreção hepatobiliar da rosuvastatina, essa estatina também pode ser empregada como fármaco marcador do BCRP intestinal e hepático (LEE et al., 2015).

Ao observamos a atividade do OATP1B1, um transportador de influxo hepático, as razões Fase 2/Fase 1 de $AUC^{0-\infty}$ da rosuvastatina inferiores a 1 demonstram uma maior atividade desse transportador na Fase 2, com conseqüente menor exposição plasmática de rosuvastatina. Os Grupos 1 e 2 apresentaram, respectivamente, atividades de OATP1B1 superiores em 25% [0,75 (0,53–0,82)] ($p < 0,01$) e 31% [0,69 (0,46–0,85)] ($p < 0,01$) na Fase 2 quando comparados à Fase 1 (Tabela 9 e Figura 14A). No entanto, um estudo anterior utilizando biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica comparadas a biópsias hepáticas de pacientes controle não observou alterações na expressão proteica do OATP1B1 (WANG et al., 2016).

A atividade da P-gp intestinal avaliada com o fármaco marcador fexofenadina não mostrou diferenças significativas entre os Grupos 1 e 2, tanto para a Fase 1 quanto para a Fase 2 do estudo (Tabela 8 e Figura 14B). Estudos de expressão de RNA mensageiro em fígados de pacientes com hepatite C crônica não mostraram alterações da P-gp hepática em função da progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica (HANADA et al., 2012).

A atividade dos transportadores OATP1B1 & BCRP foi 51% [1,51 (1,17–2,20)] menor ($p < 0,05$) na Fase 1 e 39% [1,39 (1,16–2,02)] menor ($p < 0,01$) na Fase 2 no Grupo 2 quando comparada à atividade do Grupo 1 nas respectivas fases (Tabela 10 e Figura 14B). Nakai et al. (2008) e Hanada et al. (2012) relataram diminuição significativa nos níveis de RNA mensageiro do OATP1B1 em biópsias de fígado de pacientes com hepatite C crônica de acordo com a progressão do estágio da fibrose hepática. Ogasawara et al. (2010) também observaram redução dos níveis de RNA mensageiro de OATP1B1 em pacientes com cirrose em comparação com pacientes sem cirrose.

Apesar das limitações do nosso estudo referentes a ausência de dados de genótipo para isoformas CYP e transportadores de membranas, bem como de dados de concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, os principais achados de relevância clínica incluem a redução na atividade da CYP2C19, CYP3A e OATP1B1 & BCRP na Fase 1 do estudo (antes do tratamento com AADs) quando comparada a Fase 2 (após a obtenção da RVS). O presente estudo também mostra que a progressão da doença (comparação dos Grupos 1 e 2) resulta na redução da atividade da CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e do OATP1B1 & BCRP. Assim, pelo olhar da farmacologia translacional, o presente estudo reforça que a administração de medicamentos de baixo índice terapêutico, substratos das referidas isoformas CYP e do OATP1B1 & BCRP, deve levar em consideração a fase do tratamento e o estágio da hepatite C crônica.

6. CONCLUSÕES

1. A atividade da CYP2C19 foi reduzida em 37% [razão 1,63 (1,32–2,00), $p < 0,01$] na Fase 1 do estudo (antes do tratamento com os AADs) quando comparada à Fase 2 do estudo (após a obtenção da RVS) para os participantes com hepatite C crônica com fibrose hepática leve a moderada (Grupo 1).
2. A atividade da CYP3A foi reduzida em 64% [razão 1,46 (1,08–1,98), $p < 0,05$] na Fase 1 do estudo (antes do tratamento com os AADs) quando comparada à Fase 2 do estudo (após a obtenção da RVS) para os participantes com hepatite C crônica com fibrose hepática grave ou cirrose (Grupo 2).
3. As atividades da CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6 não diferiram entre as Fases 1 (antes do tratamento com os AADs) e 2 do estudo (RVS) para os participantes com hepatite C crônica com fibrose hepática leve a moderada (Grupo 1) ou fibrose hepática grave ou cirrose (Grupo 2).
4. As atividades da CYP1A2, CYP2C9 e CYP2D6 foram reduzidas, respectivamente, em 57% [razão 0,43 (0,28–0,66), $p < 0,01$], 52% [razão 0,48 (0,31–0,72), $p < 0,01$] e 54% [razão 0,46 (0,26–0,82), $p < 0,05$] no Grupo 2 (fibrose hepática grave ou cirrose) quando comparadas ao Grupo 1 (fibrose hepática leve a moderada do estudo) na Fase 1 do estudo (antes do tratamento com os AADs).
5. As atividades da CYP1A2 e CYP2C19 foram reduzidas, respectivamente, em 57% [razão 0,43 (0,28–0,65), ($p < 0,01$)] e 43% [razão 0,57 (0,36–0,91), $p < 0,05$] no Grupo 2 (fibrose hepática grave ou cirrose) quando comparada ao Grupo 1 (fibrose hepática leve a moderada do estudo) na Fase 2 do estudo (após a obtenção da RVS).
6. A atividade da CYP3A não diferiu entre os Grupos 1 (fibrose hepática leve a moderada do estudo) e 2 (fibrose hepática grave ou cirrose) nas Fases 1 (antes do tratamento com os AADs) ou 2 do estudo (RVS).
7. A atividade da P-gp não diferiu entre os Grupos 1 (fibrose hepática leve a moderada do estudo) e 2 (fibrose hepática grave ou cirrose) em ambas as fases ou entre as Fases 1 (antes do tratamento com os AADs) e 2 (após a obtenção da RVS) em ambos os grupos do estudo.

8. A atividade do OATP1B1 & BCRP foi reduzida nos Grupos 1 (fibrose hepática leve a moderada do estudo) e 2 (fibrose hepática grave ou cirrose), respectivamente, em 25% [razão 0,75 (0,53–0,82), $p < 0,01$] e 31% [razão 0,69 (0,46–0,85), $p < 0,05$] na Fase 1 (antes do tratamento com os AADs) quando comparada à Fase 2 (após a obtenção da RVS) do estudo.
9. A atividade do OATP1B1 & BCRP foi reduzida nas Fases 1 (antes do tratamento com os AADs) e 2 (após a obtenção da RVS), respectivamente, em 49% [razão 1,51 (1,17–2,20), $p < 0,05$] e 61% [razão 1,39 (1,16–2,02), $p < 0,01$] no Grupo 2 (fibrose hepática grave ou cirrose) quando comparada ao Grupo 1 (fibrose hepática leve a moderada do estudo).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012**. Brasília, 2012. 12 p.

AITKEN, A. E.; MORGAN, E. T. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 9, p. 1687–93, set. 2007.

AITKEN, A. E.; RICHARDSON, T. A.; MORGAN, E. T. Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 123–149, fev. 2006.

ALMEIDA, A. C. et al. Impact of Plasmodium vivax malaria and antimalarial treatment on cytochrome P450 activity in Brazilian patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 1859–1868, 30 set. 2020.

ÂNGELO, M. L. et al. Analytical Methods for the Determination of Rosuvastatin in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids: A Critical Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 317–329, 4 jul. 2018.

BAI, X. et al. Simultaneous Determination of Rosuvastatin, Rosuvastatin-5 S-lactone, and N-desmethyl Rosuvastatin in Human Plasma by UPLC-MS/MS and Its Application to Clinical Study. **Drug Research**, v. 68, n. 06, p. 328–334, 12 jun. 2018.

BEALES, I. L. P.; CALAM, J. Interleukin 1 β and tumour necrosis factor α inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. **Gut**, v. 42, n. 2, p. 227–234, 1998.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289–293, 1996.

BERTILSSON, P. M.; OLSSON, P.; MAGNUSSON, K. E. Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDRI in intestinal cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 5, p. 638–46, maio 2001.

BLECH, S. et al. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 2, p. 386–399, fev. 2008.

BLUME, H. et al. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors. **Drug Safety**, v. 29, n. 9, p. 769–784, 2006.

CARIS, J. A. et al. Rheumatoid arthritis downregulates the drug transporter OATP1B1: Fluvastatin as a probe. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 146, p. 105264, 15 abr. 2020.

CASTÉRA, L. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 128, n. 2, p. 343–350, 2005.

CASTÉRA, L.; FORNS, X.; ALBERTI, A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 835–847, maio 2008.

CESTARI, R. N. et al. Systemic lupus erythematosus activity affects the sinusoidal uptake transporter OATP1B1 evaluated by the pharmacokinetics of atorvastatin. **Clinical and Translational Science**, 2020.

CHEN, Y. L. et al. Acute-phase response, interleukin-6, and alteration of cyclosporine pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 55, n. 6, p. 649–660, jun. 1994.

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 & Therapeutics**, v. 104, n. 5, p. 836–864, 1 nov. 2018.

COELHO, E. B. et al. Limited Sampling Modeling for Estimation of Phenotypic Metrics for CYP Enzymes and the ABCB1 Transporter Using a Cocktail Approach. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 22, 14 fev. 2020.

COOPER, K. J. et al. The effect of fluconazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 8, p. 527–531, 2002.

COUTANT, D. E.; HALL, S. D. Disease-Drug Interactions in Inflammatory States via Effects on CYP-Mediated Drug Clearance. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 7, p. 849–863, 1 jul. 2018.

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, 10 jan. 2012.

CUSINATO, D. A. C. et al. LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 and P-glycoprotein probe substrates and their metabolites using subtherapeutic doses. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 430–441, 5 fev. 2019.

CVETKOVIC, M. et al. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 8, p. 866–871, 1999.

DE ANDRÉS, F. et al. Multiplex Phenotyping for Systems Medicine: A One-Point Optimized Practical Sampling Strategy for Simultaneous Estimation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 Activities Using a Cocktail Approach. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 20, n. 2, p. 88–96, fev. 2016.

DE MARIA, N. et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 3, p. 291–295, 1996.

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**, v. 39, n. 8, p. 1415–1422, ago. 2011.

DIRCHWOLF, M. et al. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. **Cytokine**, v. 77, n. September, p. 14–25, 1 jan. 2016.

DONZELLI, M. et al. The Basel cocktail for simultaneous phenotyping of human cytochrome P450 isoforms in plasma, saliva and dried blood spots. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 3, p. 271–282, mar. 2014.

DROZDZIK, M. et al. Gene Expression and Protein Abundance of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Liver Pathology. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1334, 25 ago. 2021.

ELSBY, R.; HILGENDORF, C.; FENNER, K. Understanding the critical disposition pathways of statins to assess drug-drug interaction risk during drug development: it's not just about OATP1B1. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 5, p. 584–598, nov. 2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on the Investigation of Drug Interactions**. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>. Acesso em: 31 jan. 2022.

FALLAHI, P. et al. Cytokines and HCV-related disorders. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

FARDEL, O.; LE VÉE, M. Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 5, n. 12, p. 1469–1481, 28 dez. 2009.

FRYE, R. F. et al. Validation of the five-drug “Pittsburgh cocktail” approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes*. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 4, p. 365–376, out. 1997.

FRYE, R. F. et al. Plasma levels of TNF- α and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 8, n. 5, p. 315–319, out. 2002.

FRYE, R. F. et al. Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 3, p. 235–245, 2006.

FUHR, U.; JETTER, A.; KIRCHHEINER, J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the “cocktail” approach. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 2, p. 270–283, fev. 2007.

GIACOMINI, K. M. et al. International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 1, p. 23–26, jul. 2013.

GIRI, P.; PATEL, H.; SRINIVAS, N. R. Use of Cocktail Probe Drugs for Indexing Cytochrome P450 Enzymes in Clinical Pharmacology Studies – Review of Case Studies. **Drug Metabolism Letters**, v. 13, n. 1, p. 3–18, 30 abr. 2019.

HANADA, K. et al. Effect of nuclear receptor downregulation on hepatic expression of cytochrome P450 and transporters in chronic hepatitis C in association with fibrosis development. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 3, p. 301–6, 2012.

HINOSHITA, E. et al. Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 35, n. 6, p. 765–73, dez. 2001.

HOCHEPIED, T. et al. α 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 1, p. 25–34, 1 fev. 2003.

IMANAGA, J. et al. The effects of the SLCO2B1 c.1457C > T polymorphism and apple juice on the pharmacokinetics of fexofenadine and midazolam in humans. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 2, p. 84–93, fev. 2011.

INGS, R. Welcome to 'Microdosing.' *Bioanalysis*, v. 2, n. 3, p. 371–372, mar. 2010.

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, 27 set. 2012.

KUGLER, N.; KLEIN, K.; ZANGER, U. M. MiR-155 and other microRNAs downregulate drug metabolizing cytochromes P450 in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 171, n. November 2019, p. 1–13, 2020.

LANCHOTE, V. L. et al. Impact of visceral leishmaniasis and curative chemotherapy on cytochrome P450 activity in Brazilian patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 1160–1168, 1 nov. 2015.

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

LEE, C. A. et al. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 4, p. 490–509, 1 abr. 2015.

LENOIR, C. et al. Impact of Acute Inflammation on Cytochromes P450 Activity Assessed by the Geneva Cocktail. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 6, p. 1668–1676, 8 jun. 2021a.

LENOIR, C. et al. Impact of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19) on Cytochromes P450 Activity Assessed by the Geneva Cocktail. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 110, n. 5, p. 1358–1367, 1 nov. 2021b.

LENOIR, C. et al. Influence of Inflammation on Cytochromes P450 Activity in Adults: A Systematic Review of the Literature. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 16 nov. 2021c.

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, 8 mar. 2011.

LOFT, S. Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism. **Pharmacology & Toxicology**, v. 66 Suppl 6, p. 1–31, 1990.

MA, J. D. et al. Evaluation of in vivo P-glycoprotein phenotyping probes: a need for validation. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 4, p. 223–237, 2010.

MACHAVARAM et al. A Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling Approach to Predict Disease–Drug Interactions: Suppression of CYP3A by IL-6. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 2, p. 260–268, 10 abr. 2013.

MATSUSHIMA, S. et al. Investigation of the inhibitory effects of various drugs on the hepatic uptake of fexofenadine in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 4, p. 663–669, abr. 2008.

MAYO, P. R. et al. Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, n. 6, p. 605–613, 2000.

MOMPER, J. D.; TSUNODA, S. M.; MA, J. D. Evaluation of Proposed In Vivo Probe Substrates and Inhibitors for Phenotyping Transporter Activity in Humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56 Suppl 7, p. S82–S98, 2016.

MORCOS, P. N. et al. Influence of chronic hepatitis C infection on cytochrome P450 3a4 activity using midazolam as an in vivo probe substrate. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 10, p. 1777–1784, 14 out. 2013.

MORGAN, E. T. et al. Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Infection, Inflammation, and Cancer. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 2, p. 205–216, 1 fev. 2008.

MORGAN, E. T. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, n. 4, p. 434–438, abr. 2009.

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

NAKAI, K. et al. Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 9, p. 1786–1793, set. 2008.

NIEMI, M. et al. Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 6, p. 468–478, jun. 2005.

OGASAWARA, K. et al. Hepatitis c virus-related cirrhosis is a major determinant of the expression levels of hepatic drug transporters. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 25, n. 2, p. 190–199, 2010.

OH, K. S. et al. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 895–896, p. 56–64, 1 maio 2012.

OHNISHI, A. et al. In vivo metabolic activity of CYP2C19 and CYP3A in relation to CYP2C19 genetic polymorphism in chronic liver disease. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 11, p. 1221–1229, 2005.

PASANEN, M. K. et al. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 6, p. 726–733, dez. 2007.

PETROVIC, V.; TENG, S.; PIQUETTE-MILLER, M. Regulation of drug transporters: During infection and inflammation. **Molecular Interventions**, v. 7, n. 2, p. 99–111, abr. 2007.

PFEIFER, E. et al. Regulation of human placental drug transporters in HCV infection and their influence on direct acting antiviral medications. **Placenta**, v. 69, p. 32–39, 1 set. 2018.

PRUEKSARITANONT, T. et al. Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, n. 4, p. 519–530, 1 abr. 2017.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RENTON, K. W. Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 1, n. 4, p. 629–640, dez. 2005.

RIVERO, C. W. et al. Dissimilar expression of multidrug resistance *mdr1* and *bcrp* by the replication of hepatitis C virus: Role of the nonstructural 5A protein. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 20, n. 4, p. e127-30, abr. 2013.

RIVORY, L. P.; SLAVIERO, K. A.; CLARKE, S. J. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 3, p. 277–280, 29 jul. 2002.

ROS, J. E. et al. High expression of MDRI, MRPI, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 5, p. 553–560, 1 ago. 2003.

RUSSELL, T.; STOLTZ, M.; WEIR, S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerance of single- and multiple-dose fexofenadine hydrochloride in healthy male volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, n. 6, p. 612–621, dez. 1998.

RYU, J. Y. et al. Development of the “Inje cocktail” for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 5, p. 531–540, nov. 2007.

SAKAI, T. et al. CYP2C19 genotype and pharmacokinetics of three proton pump inhibitors in healthy subjects. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 721–727, 2001.

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

SCHMITT, C. et al. Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 5, p. 735–740, maio 2011.

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, 3 jun. 2017.

SHI, J. G.; ZHANG, Y.; YELESWARAM, S. The relevance of assessment of intestinal P-gp inhibition using digoxin as an in vivo probe substrate. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 75, jan. 2011.

SHIRAI, N. et al. Effects of CYP2C19 genotypic differences in the metabolism of omeprazole and rabeprazole on intragastric pH. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, n. 12, p. 1929–1937, 2001.

SHIRASAKA, Y. et al. Inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 by omeprazole metabolites and their contribution to drug-drug interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 7, p. 1414–1424, jul. 2013.

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. 224–32, abr. 2003.

SRINIVAS, N. R. Prediction of area under the curve for a p-glycoprotein, a CYP3A4 and a CYP2C9 substrate using a single time point strategy: assessment using fexofenadine, itraconazole and losartan and metabolites. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 6, p. 945–957, 2016.

STANGIER, J. et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 292, set. 2007.

Statistical Guide for Clinical Pharmacology & Therapeutics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 2, p. 150–152, 2010.

TAHARA, H. et al. P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role in its biliary excretion. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 7, p. 963–968, jul. 2005.

TARRAGÔ, A. M. et al. Combined impact of hepatitis C virus genotype 1 and interleukin-6 and tumor necrosis factor- α polymorphisms on serum levels of pro-inflammatory cytokines in Brazilian HCV-infected patients. **Human Immunology**, v. 75, n. 11, p. 1075–1083, 1 nov. 2014.

VERBEECK, R. K. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1147–1161, dez. 2008.

WANG, L. et al. Transporter Expression in Liver Tissue from Subjects with Alcoholic or Hepatitis C Cirrhosis Quantified by Targeted Quantitative Proteomics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 11, p. 1752–1758, 3 out. 2016.

WEDEMEYER, R.-S.; BLUME, H. Pharmacokinetic Drug Interaction Profiles of Proton Pump Inhibitors: An Update. **Drug Safety**, v. 37, n. 4, p. 201–211, 19 abr. 2014.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. [s.l.] Springer-Verlag Nova Iorque, 2016.

WIENKERS, L. C.; HEATH, T. G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 825–833, out. 2005.

WOHLFARTH, A. et al. Cocktail approach for in vivo phenotyping of 5 major CYP450 isoenzymes: Development of an effective sampling, extraction, and analytical procedure and pilot study with comparative genotyping. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 8, p. 1200–1214, ago. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Hepatitis C**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 14 maio. 2020.

XIMENEZ, J. P. B. **Farmacocinética não compartimental e populacional do tamoxifeno em pacientes em tratamento para o câncer de mama: estudo do metabolismo, estado hormonal e polimorfismo genético**. Ribeirão Preto, 2018. 147 p.

YASUI-FURUKORI, N. et al. Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 17–23, jan. 2005.

YEE, S. W. et al. Influence of Transporter Polymorphisms on Drug Disposition and Response: A Perspective From the International Transporter Consortium. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 104, n. 5, p. 803–817, 1 nov. 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

PESQUISA CIENTÍFICA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

NOME DO PACIENTE / IDADE:/.....
REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO:

NOME DA PESQUISA: “Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas CYP e dos transportadores BCRP, OATP1B1, OCT e P-gp em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO PROJETO:

SUPERVISORA: Dra. Vera Lucia Lanchote (Professora Titular da FCFRP-USP)

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Dra. Rosamar Eulira Fontes Rezende – CRM: 84.082

RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TCLE: Carolina Pinto Vieira

(Pós-doutoranda FCFRP-USP; CPF: 067680606-60)

TELEFONE PARA CONTATO: (16) 3315-4195 ou (16) 98116-2016

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em/...../..... concordei voluntariamente em participar como paciente do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes, pelo médico e pela pós-doutoranda responsáveis pela pesquisa, que:

Este estudo procura entender se a hepatite C crônica, em diferentes estágios e de acordo com a gravidade da doença, altera a atividade de algumas enzimas que participam da eliminação de medicamentos do organismo, podendo aumentar ou diminuir seus efeitos. Assim, se você resolver participar desta pesquisa, você irá realizar, primeiramente, alguns exames de sangue para saber se existem alguma doença nos rins, coração ou outro órgão, que não seja o fígado. O estudo será feito em 3 etapas: a primeira etapa será um dia antes de você começar a tomar os medicamentos que sua médica, Dra. Rosamar Eulira Fontes Rezende, receitou para tratar a hepatite C crônica. Na primeira etapa, você deverá comparecer em jejum de 8 horas a Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Avenida dos bandeirantes, 3900 – Monte Alegre), localizada no 12º andar, onde você irá ingerir 1 (uma) cápsula, que contém os medicamentos cafeína, omeprazol, metoprolol, losartana, rosuvastatina, metformina e fexofenadina, em doses seguras. As amostras de seu sangue serão coletadas, através de uma veia do seu braço. Nós iremos colocar um cateter, semelhante a um tubinho de plástico, na sua veia nessa primeira picada, para que você não precise ser mais picado na veia durante as próximas coletas. Depois disso, teremos ainda que coletar seu sangue algumas vezes, totalizando 15 coletas (iremos tirar cerca de uma colher de sopa por vez = 5 mL). A coleta de sangue é levemente dolorosa e pode causar hematomas e, muito raramente, uma infecção no local da punção da veia. A segunda etapa ocorrerá quando você já estiver tomando os medicamentos que lhe foram receitados para o tratamento da hepatite C crônica, pois nessa etapa iremos coletar seu sangue para saber como os medicamentos, que são usados para o tratamento da hepatite C crônica entram e saem do seu corpo. Assim, você terá que comparecer novamente a UPC e levar com você os medicamentos que a médica receitou para o tratamento da hepatite C crônica. Nós iremos coletar seu sangue antes de você tomar os medicamentos para o tratamento da hepatite C crônica naquele dia, através de uma veia do seu braço. E depois que você tomar os medicamentos para tratamento da hepatite C crônica, iremos coletar seu sangue, cerca de 15 coletas. A terceira etapa ocorrerá quando você já estiver terminado de tomar os medicamentos utilizados para tratar a hepatite

C crônica e tiver realizado o exame para saber se o vírus da hepatite C já foi eliminado do seu corpo. Isso ocorrerá após 12 semanas da primeira internação. Você terá que comparecer novamente, em jejum, a UPC e irá ingerir novamente 1 (uma) cápsula contendo os medicamentos cafeína, omeprazol, metoprolol, losartana, rosuvastatina, metformina e fexofenadina, em doses seguras, da mesma maneira em que foi feita na primeira etapa. Nessa etapa queremos saber se, com a eliminação dos vírus da hepatite C, a atividade das enzimas que participam da eliminação de medicamentos no organismo estão funcionando normalmente. Nós iremos colocar novamente um cateter, semelhante a um tubinho de plástico na sua veia como foi feito nas duas primeiras etapas e depois disso, iremos coletar seu sangue algumas vezes, totalizando cerca de 15 coletas. Portanto, se você quiser participar do estudo, terá que comparecer 3 vezes a UPC em um intervalo de três meses entre a 1º etapa e a 3º etapa.

A sua colaboração será importante para entendermos o porquê algumas pessoas conseguem eliminar o vírus da hepatite C com o tratamento e outras não. Isto poderá ajudar na escolha do melhor tratamento e no ajuste da dose dos remédios para pessoas que tem hepatite C crônica. Esse documento será feito em duas vias e se você desejar participar dessa pesquisa, você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- 1- Você não é obrigado a participar desta pesquisa e caso aceite a participar, a qualquer momento, caso seja de sua vontade, você poderá sair da pesquisa, sem que isso impeça que você deixe de ser tratado da hepatite C, como os demais pacientes do Ambulatório de Hepatites do Centro de Referência em Especialidades Central, da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto, situado na Rua Prudente de Moraes, 35, Ribeirão Preto – SP.
- 2- Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEP/FCFRP. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Avenida do Café, sem número, Campus USP Ribeirão Preto, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP, telefone: (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br
- 3- A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para você. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a te alertar sobre o fato e a suspender, de imediato, sua participação como voluntário.
- 4- Os pesquisadores garantem que responderão a qualquer pergunta ou farão esclarecimentos a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e com o tratamento que você será submetido.
- 5- Os pesquisadores se comprometem a proporcionar a você informações atualizadas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a sua vontade de continuar participando da pesquisa.
- 6- Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente.
- 7- Você terá direito a ressarcimento financeiro caso hajam gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.
- 8- Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito a indenização, conforme a resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/12.

Ribeirão Preto,dede.....

Assinatura do paciente
ou de seu responsável

Responsável pela obtenção
do TCLE – Carolina P Vieira
CPF: 067680606-60

APÊNDICE B: Dados individuais antropométricos, bioquímicos e de estadiamento da fibrose hepática dos 28 participantes investigados.

Tabela 11: Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos participantes portadores de hepatite C crônica dos 15 participantes portadores de hepatite C crônica alocados no Grupo 1.

ID	VR	Fase	01G1	02G1	03G1	04G1	05G1	06G1	07G1	08G1	09G1	10G1	11G1	12G1	13G1	14G1	15G1
Sexo			F	M	M	M	F	M	M	M	F	F	F	M	M	M	F
Idade (anos)			41	48	41	59	59	49	65	45	40	47	57	41	35	59	54
Peso (kg)			119,3	87	61	86	55	58	69	64	101	60,6	58	67,9	61,8	67,6	60,1
Altura (m)			1,64	1,72	1,65	1,78	1,53	1,72	1,64	1,66	1,5	1,51	1,62	1,65	1,61	1,74	1,57
Índice de massa corpórea (kg·m ⁻²)			44	29	22	27	23	20	26	23	45	27	22	25	24	22	24
Glicemia (mg·dL ⁻¹)	70–99	Fase 1	93	96	90	86	59	88	87	59	87	74	93	53	93	82	85
		Fase 2	—	99	86	—	—	79	92	79	—	88	90	—	102	—	84
Proteínas totais (g·dL ⁻¹)	6,0–8,0	Fase 1	6,4	8,4	7,5	8,7	6,0	7,1	7,2	7,2	7,9	6,5	8,3	6,7	7,7	7,9	8,2
		Fase 2	—	7,6	—	—	—	—	7,8	7,5	—	6,9	8,0	6,6	—	—	—
Albumina (g·dL ⁻¹)	3,5–5,5	Fase 1	3,0	4,3	4,6	4,3	3,3	3,5	3,5	4,5	4,3	3,4	4,2	4,2	4,6	4,3	4,0
		Fase 2	—	4	4,4	—	3,8	4,5	3,8	4,5	—	3,6	4,1	4	3,8	3,9	4,0
Creatinina sérica (mg·dL ⁻¹)	0,6–1,2	Fase 1	0,8	0,8	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	1,1	0,8	0,7
		Fase 2	0,6	0,9	1,1	—	0,7	0,8	1,1	0,7	1,1	0,7	0,7	0,8	1,1	—	—
Taxa de filtração glomerular estimada (mL·min ⁻¹)	≥ 70	Fase 1	174	139	76	97	53	73	72	106	170	83	81	117	82	95	87
		Fase 2	232	124	76	—	75	92	65	121	108	95	81	117	82	—	—
Alanina aminotransferase (U·L ⁻¹)	10–40	Fase 1	46	40	237	99	20	66	34	84	32	31	80	62	48	45	64
		Fase 2	14	25	28	—	—	24	17	63	24	19	28	35	40	—	28
Aspartato aminotransferase (U·L ⁻¹)	15–40	Fase 1	33	29	85	59	28	37	30	49	20	27	70	45	26	41	42
		Fase 2	24	19	27	—	—	23	17	42	11	14	28	22	16	—	18
Bilirrubina total (mg·dL ⁻¹)	0,1–1,0	Fase 1	0,3	0,4	0,7	0,4	0,7	0,3	0,5	1,2	0,3	65,4	0,6	1,2	0,6	0,9	0,6
		Fase 2	—	0,4	—	—	—	—	0,5	1,0	0,2	0,5	0,6	—	0,4	—	0,4
Bilirrubina direta (mg·dL ⁻¹)	0,0–0,3	Fase 1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,4	0,1	—	0,3	0,4	0,1	0,4	0,2
		Fase 2	—	0,1	—	—	—	—	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	—	0,1	—	0,2
INR	0,8–1,0	Fase 1	1,00	0,99	0,96	0,93	0,92	0,93	1,00	1,02	0,76	0,92	0,97	0,91	0,88	1,00	0,90
		Fase 2	—	0,97	—	—	—	—	0,99	0,95	—	0,91	0,95	—	—	—	—
Ureia (mg·dL ⁻¹)	16-40	Fase 1	21	28	—	34	28	28	35	32	23	20	34	35	24	33	21
		Fase 2	35	26	—	—	26	47	36	27	—	25	38	25	26	—	39

Grupo 1: participantes com fibrose hepática inicial ou moderada. **VR:** valores de referência. **Taxa de filtração glomerular:** estimada pela equação de Cockcroft-Gault. **INR:** razão internacional normalizada. **M:** sexo masculino. **F:** sexo feminino. **F0/F1:** fibrose hepática inicial. **F2:** fibrose hepática moderada. **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 12: Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos participantes portadores de hepatite C crônica dos 13 participantes portadores de hepatite C crônica alocados no Grupo 2.

ID	VR	Fase	01G2	02G2	03G2	04G2	05G2	06G2	07G2	08G2	09G2	10G2	11G2	12G2	13G2
Sexo			M	M	F	M	F	M	F	F	F	M	F	M	M
Idade (anos)			40	38	39	68	63	56	37	46	56	67	53	59	67
Peso (kg)			99	108	90	77	60	62	79	82,5	108	71	53	76	112,6
Altura (m)			1,76	1,82	1,71	1,76	1,61	1,68	1,61	1,66	1,67	1,68	1,58	1,80	1,81
Índice de massa corpórea (kg·m ⁻²)			32	33	31	25	23	22	30	30	39	25	21	23	34
Glicemia (mg·dL ⁻¹)	70–99	Fase 1	80	81	80	84	78	85	81	88	118	101	109	82	104
		Fase 2	83	92	104	82	89	89	106	81	92	91	140	89	96
Proteínas totais (g·dL ⁻¹)	6,0–8,0	Fase 1	7,9	8,0	6,9	8,7	8,8	8,0	8,0	6,8	7,2	7,9	8,4	7,8	8,0
		Fase 2	7,5	8,1	7,4	7,3	8,3	8,1	8,3	7,7	7,6	7,3	8,7	7,6	8,6
Albumina (g·dL ⁻¹)	3,5–5,5	Fase 1	4,3	4,1	3,8	4,9	3,7	3,9	4,4	3,5	3,1	3,8	3,4	4,1	4,1
		Fase 2	4,3	4,8	4,3	4,1	3,7	3,3	3,6	4,1	4,4	4,7	4,3	4,2	4,7
Creatinina sérica (mg·dL ⁻¹)	0,6–1,2	Fase 1	1,2	0,9	0,5	1,1	1,3	1,6	0,6	1,1	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1
		Fase 2	1,0	1,1	0,6	1,2	—	1,6	0,7	0,9	0,7	0,9	0,7	0,6	1,0
Taxa de filtração glomerular estimada (mL·min ⁻¹)	≥ 70	Fase 1	115	170	215	70	42	45	160	83	119	80	60	107	104
		Fase 2	138	155	179	64	—	45	134	102	153	81	78	143	114
Alanina aminotransferase (U·L ⁻¹)	10–40	Fase 1	125	845	170	125	55	31	80	90	48	55	120	74	77
		Fase 2	25	33	49	14	42	16	27	28	9	24	33	23	39
Aspartato aminotransferase (U·L ⁻¹)	15–40	Fase 1	47	392	127	26	24	28	42	83	27	47	72	71	48
		Fase 2	25	27	33	20	24	23	26	25	22	25	60	30	29
Bilirrubina total (mg·dL ⁻¹)	0,1–1,0	Fase 1	0,6	3,0	1,0	0,7	0,6	0,6	0,3	0,6	1,0	1,1	1,7	0,4	0,3
		Fase 2	0,4	1,4	0,9	0,4	0,4	0,5	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,4	0,6
Bilirrubina direta (mg·dL ⁻¹)	0,0–0,3	Fase 1	0,1	0,9	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,3	0,8	0,1	0,1
		Fase 2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,4	0,1	0,2
INR	0,8–1,0	Fase 1	0,92	1,02	1,04	1,03	0,98	0,95	0,98	0,97	0,92	0,96	1,30	1,02	0,91
		Fase 2	0,93	0,94	0,97	1,04	1,00	0,95	1,11	0,94	1,00	0,98	1,25	1,11	0,93
Ureia (mg·dL ⁻¹)	16–40	Fase 1	27	34	26	33	49	58	—	—	32	25	18	18	78
		Fase 2	28	37	20	23	—	66	25	34	32	28	23	20	77

Grupo 2: participantes com fibrose hepática grave ou com cirrose. **VR:** valores de referência. **Taxa de filtração glomerular:** estimada pela equação de Cockcroft-Gault. **INR:** razão internacional normalizada. **M:** sexo masculino. **F:** sexo feminino. **F3:** fibrose hepática grave. **F4:** cirrose (Child-Pugh A). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 13: Dados individuais do estadiamento da fibrose hepática e regime antiviral de ação direta dos participantes do estudo com hepatite C crônica ($n = 28$).

Grupo	ID	Genótipo do VHC	Estadiamento Fibroscan®	Estadiamento biópsia	Regimes antivirais de ação direta
Grupo 1	01G1	1B	F2	—	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg)
	02G1	3	F2	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	03G1	3	F2	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	04G1	1	F2	—	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg), ribavirina (11 mg·kg ⁻¹)
	05G1	3	F2	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	06G1	1	F2	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	07G1	1	—	A2F2	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg)
	08G1	1	F2	—	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg), ribavirina (11 mg·kg ⁻¹)
	09G1	1B	—	A1F1	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg)
	10G1	1B	F0/F1	—	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg)
	11G1	1B	F0/F1	—	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg)
	12G1	1A	F0/F1	—	sofosbuvir (400 mg), ledispavir (90 mg)
	13G1	1	—	A1F1	sofosbuvir (400 mg), ledispavir (90 mg)
	14G1	1A	F0/F1	—	sofosbuvir (400 mg), ledispavir (90 mg)
	15G1	1B	F0/F1	—	sofosbuvir (400 mg), ledispavir (90 mg)
Grupo 2	01G2	1A	F3	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), simeprevir (150 mg), sofosbuvir (400 mg)
	02G2	1B	F4	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), simeprevir (150 mg), sofosbuvir (400 mg)
	03G2	1B	F4	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), simeprevir (150 mg), sofosbuvir (400 mg)
	04G2	3	F3	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	05G2	3	F3	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	06G2	1A	—	A3/F4	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), simeprevir (150 mg), sofosbuvir (400 mg)
	07G2	1B	F4	—	simeprevir (150 mg), sofosbuvir (400 mg)
	08G2	3	F4	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	09G2	1A	F3	—	simeprevir (150 mg), sofosbuvir (400 mg)
	10G2	1B	F4	—	ombitasvir (12,5 mg), veruprevir (75 mg), ritonavir (50 mg), dasabuvir (250 mg)
	11G2	3	F4	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	12G2	3	F4	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)
	13G2	1B	F4	—	ribavirina (11 mg·kg ⁻¹), daclatasvir (60 mg), sofosbuvir (400 mg)

F0/F1: fibrose hepática inicial. **F2:** fibrose hepática moderada. **F3:** fibrose hepática grave. **F4:** cirrose (Child-Pugh A).

APÊNDICE C: Dados individuais das quantificações do coquetel de fármacos marcadores dos 28 participantes investigados.

Tabela 14: Atividade da enzima metabolizadora CYP1A2 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 10 mg de cafeína) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1			Fase 2		
		PRX (ng·mL ⁻¹)	CAF (ng·mL ⁻¹)	PRX / CAF	PRX (ng·mL ⁻¹)	CAF (ng·mL ⁻¹)	PRX / CAF
Grupo 1	01G1	32,37	165,67	0,20	32,73	123,35	0,27
	02G1	38,26	55,76	0,69	46,79	84,13	0,56
	03G1	57,78	140,62	0,41	50,97	139,73	0,36
	04G1	66,03	123,90	0,53	61,38	110,03	0,56
	05G1	173,69	163,20	1,06	254,98	179,37	1,42
	06G1	83,58	73,13	1,14	698,14	405,72	1,72
	07G1	70,21	180,15	0,39	49,64	55,67	0,89
	08G1	52,38	190,48	0,27	63,08	180,84	0,35
	09G1	54,23	147,09	0,37	158,70	254,59	0,62
	10G1	73,85	121,47	0,61	80,56	155,27	0,52
	11G1	64,39	105,72	0,61	64,95	97,64	0,67
	12G1	71,30	86,98	0,82	60,74	149,38	0,41
	13G1	70,54	270,29	0,26	311,48	706,67	0,44
	14G1	59,71	191,17	0,31	51,55	191,60	0,27
	15G1	85,09	104,11	0,82	95,32	73,04	1,31
Grupo 2	01G2	47,77	107,35	0,44	52,14	112,65	0,46
	02G2	108,87	393,35	0,28	64,23	279,63	0,23
	03G2	159,73	885,74	0,18	21,08	182,79	0,12
	04G2	237,27	500,19	0,47	220,53	318,36	0,69
	05G2	60,25	305,32	0,20	38,32	274,52	0,14
	06G2	46,07	138,70	0,33	51,53	152,18	0,34
	07G2	323,57	806,55	0,40	243,07	388,69	0,63
	08G2	56,45	961,90	0,06	104,89	801,69	0,13
	09G2	263,47	1052,44	0,25	28,00	204,88	0,14
	10G2	493,40	1068,56	0,46	322,59	1588,04	0,20
	11G2	695,41	8175,98	0,09	361,38	2731,06	0,13
	12G2	208,69	1071,65	0,19	92,73	123,11	0,75
	13G2	11,14	164,00	0,07	19,09	113,70	0,17

PRX: paraxantina. **CAF:** cafeína. **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 15: Atividade da enzima metabolizadora CYP1C9 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de losartana) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1			Fase 2		
		E-3174 (ng·mL ⁻¹)	LOS (ng·mL ⁻¹)	E-3174 / LOS	E-3174 (ng·mL ⁻¹)	LOS (ng·mL ⁻¹)	E-3174 / LOS
Grupo 1	01G1	0,72	1,35	0,53	0,41	1,16	0,35
	02G1	2,14	0,81	2,64	2,84	1,03	2,76
	03G1	2,16	1,74	1,24	1,87	1,31	1,43
	04G1	1,14	1,06	1,08	0,71	0,65	1,09
	05G1	1,01	1,92	0,53	99,93	64,08	1,56
	06G1	0,46	0,37	1,24	0,67	0,93	0,72
	07G1	1,07	1,66	0,64	0,59	0,77	0,77
	08G1	0,59	1,85	0,32	0,47	1,28	0,37
	09G1	0,97	0,64	1,52	0,30	0,44	0,68
	10G1	0,78	0,76	1,03	0,44	0,48	0,92
	11G1	0,90	1,92	0,47	1,03	1,61	0,64
	12G1	4,39	2,56	1,71	2,06	1,66	1,24
	13G1	1,99	1,73	1,15	1,26	1,30	0,97
	14G1	0,65	2,14	0,30	1,38	1,50	0,92
	15G1	3,47	2,11	1,64	2,92	2,36	1,24
Grupo 2	01G2	0,82	2,34	0,35	1,22	1,26	0,97
	02G2	1,72	3,52	0,49	1,87	1,49	1,26
	03G2	1,07	4,64	0,23	1,10	2,74	0,40
	04G2	8,30	5,00	1,66	4,15	1,41	2,94
	05G2	1,03	2,37	0,43	0,77	1,06	0,73
	06G2	1,31	1,62	0,81	0,72	0,96	0,75
	07G2	0,57	0,86	0,66	0,45	0,69	0,65
	08G2	0,51	1,90	0,27	0,71	2,92	0,24
	09G2	0,42	3,74	0,11	0,71	1,22	0,58
	10G2	0,63	1,33	0,47	0,45	0,80	0,56
	11G2	2,91	8,81	0,33	1,16	5,26	0,22
	12G2	1,16	3,35	0,35	1,17	1,28	0,91
	13G2	1,17	2,01	0,58	0,31	1,38	0,22

E-3174: ácido carboxílico E-3174. **LOS:** losartana. **Grupo 1:** pacientes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 16: Atividade da enzima metabolizadora CYP2C19 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de omeprazol) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1			Fase 2		
		5-OH-OME (ng·mL ⁻¹)	OME (ng·mL ⁻¹)	5-OH-OME / OME	5-OH-OME (ng·mL ⁻¹)	OME (ng·mL ⁻¹)	5-OH-OME / OME
Grupo 1	01G1	1,27	12,07	0,11	1,71	14,10	0,12
	02G1	0,94	3,66	0,26	0,84	1,81	0,46
	03G1	1,59	11,36	0,14	1,34	7,49	0,18
	04G1	2,29	8,40	0,27	1,51	2,88	0,52
	05G1	1,73	3,00	0,58	1,06	2,15	0,49
	06G1	0,29	1,13	0,26	0,55	0,64	0,86
	07G1	1,35	13,13	0,10	1,07	4,34	0,25
	08G1	1,75	9,06	0,19	1,61	2,92	0,55
	09G1	2,38	7,90	0,30	1,08	1,98	0,55
	10G1	1,34	2,28	0,59	0,88	1,14	0,77
	11G1	0,93	5,11	0,18	0,52	2,86	0,18
	12G1	0,66	7,73	0,09	0,69	3,07	0,22
	13G1	1,30	0,31	4,19	1,20	0,35	3,43
	14G1	1,51	11,56	0,13	1,24	5,98	0,21
	15G1	1,65	3,50	0,47	1,93	4,49	0,43
Grupo 2	01G2	2,81	12,31	0,23	2,17	3,56	0,61
	02G2	0,96	11,13	0,09	1,20	8,78	0,14
	03G2	1,81	12,92	0,14	1,81	9,62	0,19
	04G2	2,78	19,60	0,14	3,30	14,78	0,22
	05G2	2,65	16,21	0,16	1,89	7,96	0,24
	06G2	3,85	7,28	0,53	2,78	2,54	1,09
	07G2	1,37	11,79	0,12	1,56	6,06	0,26
	08G2	0,78	11,08	0,07	1,42	8,72	0,16
	09G2	2,01	5,71	0,35	2,15	17,81	0,12
	10G2	3,32	20,31	0,16	3,16	11,47	0,28
	11G2	1,81	11,22	0,16	14,89	201,00	0,07
	12G2	2,04	11,33	0,18	1,59	11,25	0,14
	13G2	1,53	10,14	0,15	0,51	6,99	0,07

5-OH-OME: 5-hidroxiomeprazol. **OME:** omeprazol. **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 17: Atividade da enzima metabolizadora CYP2D6 (4 h após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 10 mg de metoprolol) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1			Fase 2		
		α -OH-MET (ng·mL ⁻¹)	MET (ng·mL ⁻¹)	α -OH-MET / MET	α -OH-MET (ng·mL ⁻¹)	MET (ng·mL ⁻¹)	α -OH-MET / MET
Grupo 1	01G1	3,04	1,84	1,65	3,72	1,68	2,21
	02G1	3,43	3,32	1,03	2,15	3,56	0,60
	03G1	3,07	5,03	0,61	6,35	4,63	1,37
	04G1	2,89	4,64	0,62	3,27	5,08	0,64
	05G1	2,57	16,15	0,16	3,41	20,18	0,17
	06G1	0,67	1,28	0,52	4,24	6,16	0,69
	07G1	4,65	6,27	0,74	5,53	2,41	2,29
	08G1	2,77	3,24	0,85	3,96	2,55	1,55
	09G1	3,99	1,43	2,79	4,53	1,66	2,73
	10G1	5,31	6,92	0,77	5,63	13,75	0,41
	11G1	4,29	7,81	0,55	3,58	5,40	0,66
	12G1	1,29	3,27	0,39	1,00	3,59	0,28
	13G1	4,14	5,13	0,81	6,22	8,99	0,69
	14G1	4,15	2,78	1,49	3,67	1,26	2,91
	15G1	6,02	1,41	4,27	6,49	1,90	3,42
Grupo 2	01G2	2,45	8,37	0,29	1,47	8,29	0,18
	02G2	1,83	3,55	0,52	2,90	3,42	0,85
	03G2	3,09	8,88	0,35	3,37	7,49	0,45
	04G2	6,00	3,24	1,85	6,57	2,09	3,14
	05G2	5,54	12,78	0,43	5,60	8,84	0,63
	06G2	5,63	4,66	1,21	6,16	3,40	1,81
	07G2	2,22	8,71	0,25	2,90	4,13	0,70
	08G2	0,70	15,62	0,04	5,38	4,28	1,26
	09G2	2,79	3,44	0,81	2,89	6,84	0,42
	10G2	2,91	4,63	0,63	3,62	4,46	0,81
	11G2	2,44	15,77	0,15	2,39	13,12	0,18
	12G2	3,50	12,51	0,28	3,32	4,61	0,72
	13G2	1,20	2,95	0,41	1,88	6,95	0,27

α -OH-MET: alfa-hidroxi metoprolol. MET: metoprolol. **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 18: Atividade da enzima metabolizadora CYP3A (4 h após a administração do coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de omeprazol) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1			Fase 2		
		OME-S (ng·mL ⁻¹)	OME (ng·mL ⁻¹)	OME-S / OME	OME-S (ng·mL ⁻¹)	OME (ng·mL ⁻¹)	OME-S / OME
Grupo 1	01G1	1,71	12,07	0,14	2,46	14,10	0,17
	02G1	1,71	3,66	0,47	0,53	1,81	0,29
	03G1	3,50	11,36	0,31	2,32	7,49	0,31
	04G1	2,67	8,40	0,32	1,26	2,88	0,44
	05G1	0,85	3,00	0,28	0,71	2,15	0,33
	06G1	0,56	1,13	0,50	0,78	0,64	1,22
	07G1	2,04	13,13	0,16	1,90	4,34	0,44
	08G1	3,12	9,06	0,34	2,44	2,92	0,84
	09G1	1,36	7,90	0,17	0,31	1,98	0,16
	10G1	2,01	2,28	0,88	0,72	1,14	0,63
	11G1	0,81	5,11	0,16	0,59	2,86	0,21
	12G1	1,20	7,73	0,16	0,69	3,07	0,22
	13G1	0,12	0,31	0,39	0,02	0,35	0,06
	14G1	2,30	11,56	0,20	3,14	5,98	0,53
	15G1	1,19	3,50	0,34	1,25	4,49	0,28
Grupo 2	01G2	2,45	12,31	0,20	2,48	3,56	0,70
	02G2	1,72	11,13	0,15	1,85	8,78	0,21
	03G2	2,51	12,92	0,19	1,50	9,62	0,16
	04G2	4,21	19,60	0,21	5,44	14,78	0,37
	05G2	2,59	16,21	0,16	2,20	7,96	0,28
	06G2	2,58	7,28	0,35	1,77	2,54	0,70
	07G2	2,43	11,79	0,21	3,14	6,06	0,52
	08G2	0,92	11,08	0,08	2,05	8,72	0,24
	09G2	1,53	5,71	0,27	2,21	17,81	0,12
	10G2	4,43	20,31	0,22	3,34	11,47	0,29
	11G2	5,29	11,22	0,47	129,50	201,00	0,64
	12G2	1,52	11,33	0,13	3,08	11,25	0,27
	13G2	2,11	10,14	0,21	0,73	6,99	0,10

OME-S: omeprazol-sulfona. **OME:** omeprazol. **Grupo 1:** participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2:** participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1:** antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2:** após a obtenção da resposta virológica sustentada.

Tabela 19: Atividade dos transportadores de membrana OATP1B1 & BCRP analisado como área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (após a administração do coquetel de fármacos marcadores contendo 2 mg de rosuvastatina) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1	Fase 2
		AUC ^{0-∞} _{rosuvastatina} (pg·h·mL ⁻¹)	AUC ^{0-∞} _{rosuvastatina} (pg·h·mL ⁻¹)
Grupo 1	01G1	7.312,19	6.024,23
	02G1	5.278,17	4.907,14
	03G1	11.348,33	3.838,82
	04G1	9.185,68	5.537,39
	05G1	36.780,67	8.238,24
	06G1	7.615,87	3.794,09
	07G1	10.529,77	6.916,43
	08G1	8.287,84	8.279,63
	09G1	11.838,51	4.666,25
	10G1	7.656,70	3.567,06
	11G1	10.907,09	7.015,27
	12G1	9.215,09	8.998,53
	13G1	7.766,16	7.787,57
	14G1	9.611,99	8.174,98
	15G1	10.294,26	13.315,59
Grupo 2 HC	01G2	16.216,12	11.767,75
	02G2	20.283,04	12.155,43
	03G2	29.601,43	14.870,93
	04G2	9.681,06	10.018,19
	05G2	13.791,87	9.625,01
	06G2	5.540,33	9.452,42
	07G2	11.061,80	7.819,96
	08G2	21.193,16	6.131,88
	09G2	13.910,67	5.249,42
	10G2	9.662,12	9.592,45
	11G2	52.536,31	28.225,10
	12G2	40.811,42	7.684,01
	13G2	6.738,66	7.756,68

AUC[∞]: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito. **Grupo 1**: participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2**: participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1**: antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2**: após a obtenção da resposta virológica sustentada.

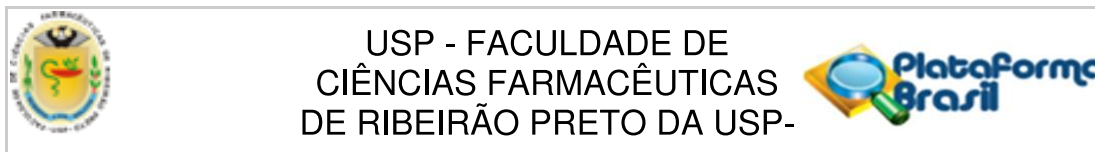
Tabela 20: Atividade do transportador de membrana P-gp analisado como área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (após a administração de coquetel de fármacos marcadores contendo 10 mg de fexofenadina) relativa a 28 participantes com hepatite C crônica.

Grupo	ID	Fase 1		Fase 2	
		C _{max} , fexofenadina (ng·mL ⁻¹)	AUC ^{0-∞} fexofenadina (ng·h·mL ⁻¹)	C _{max} , fexofenadina (ng·mL ⁻¹)	AUC ^{0-∞} fexofenadina (ng·h·mL ⁻¹)
Grupo 1	01G1	10,03	98,44	9,50	96,10
	02G1	6,85	84,39	3,94	71,53
	03G1	22,96	155,59	10,30	99,64
	04G1	44,11	249,07	16,86	128,63
	05G1	25,31	165,98	4,84	75,50
	06G1	8,61	92,17	11,69	105,78
	07G1	17,98	133,58	18,05	133,89
	08G1	23,49	157,93	18,48	135,79
	09G1	19,68	141,09	7,79	88,54
	10G1	21,69	149,98	13,43	113,47
	11G1	21,35	148,47	13,94	115,72
	12G1	12,10	107,59	8,52	91,77
	13G1	25,89	168,54	13,67	114,53
	14G1	24,03	160,32	35,53	211,15
	15G1	15,88	124,30	35,83	212,47
Grupo 2	01G2	17,61	131,94	18,47	135,75
	02G2	14,74	119,26	11,59	105,34
	03G2	9,89	97,82	13,79	115,06
	04G2	14,43	117,89	16,54	127,22
	05G2	52,36	285,53	33,01	200,01
	06G2	22,18	152,14	18,75	136,98
	07G2	52,90	287,92	20,64	145,34
	08G2	31,15	191,79	18,74	136,94
	09G2	14,77	119,39	11,91	106,75
	10G2	33,67	202,93	28,77	181,27
	11G2	36,94	217,38	42,97	244,03
	12G2	45,05	253,22	27,31	174,82
	13G2	9,08	94,24	9,02	93,98

C_{max}: concentração plasmática máxima observada. **AUC^{0-∞}**: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, do tempo zero extrapolada ao infinito. **Grupo 1**: participantes com fibrose hepática inicial (F0/F1, $n = 7$) e participantes com fibrose hepática moderada (F2, $n = 8$). **Grupo 2**: participantes com fibrose hepática grave (F3, $n = 4$) e participantes com cirrose (F4 – Child-Pugh A, $n = 9$). **Fase 1**: antes do tratamento farmacológico para a hepatite C. **Fase 2**: após a obtenção da resposta virológica sustentada.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer de aprovação do CEP/FCFRP – USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas CYP e dos transportadores BCRP, OATP1B1, OCT e P-gp em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática

Pesquisador: Carolina Pinto Vieira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 60161116.4.0000.5403

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.921.171

Apresentação do Projeto:

Não houve modificações; ver primeiro parecer.

Objetivo da Pesquisa:

Não houve modificações; ver primeiro parecer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve modificações; ver primeiro parecer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não houve modificações; ver primeiro parecer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não houve modificações; ver primeiro parecer.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi aprovado pela Comissão de Avaliação de Projeto de Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto e a secretaria foi incluída na Plataforma Brasil como coparticipante.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 160ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-**



Continuação do Parecer: 1.921.171

vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve “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”. O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_753622.pdf	05/01/2017 16:35:18		Aceito
Outros	Aprovacao_do_CAPP.pdf	05/01/2017 16:34:39	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Outros	Carta_pedencias.pdf	18/11/2016 12:33:49	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Orçamento	Orcamento_versao_2.docx	18/11/2016 12:23:37	Carolina Pinto Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_VERSAO_2.docx	17/11/2016 15:18:26	Carolina Pinto Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPOSDOC.pdf	21/09/2016 10:55:27	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Outros	protocoloprefeitura.jpg	21/09/2016 10:07:14	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPOSDOC.pdf	19/09/2016 16:57:51	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Orçamento	OrcamentoUPC.pdf	19/09/2016 16:52:08	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisadoresPKCLIN.pdf	19/09/2016 16:51:04	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaocordenadorclinico.pdf	19/09/2016 16:50:08	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de	AutorizacaodeinfraestruturaPKCLIN.	19/09/2016	Carolina Pinto	Aceito

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-



Continuação do Parecer: 1.921.171

Instituição e Infraestrutura	pdf	16:48:35	Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoUPC.pdf	19/09/2016 16:43:35	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Folha de Rosto	Folharosto.pdf	19/09/2016 16:38:42	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Orçamento	Orcamento_carol.docx	31/08/2016 12:23:05	Carolina Pinto Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 15 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador)

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

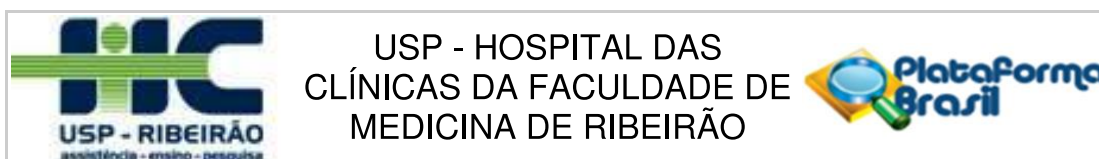
Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

ANEXO B: Parecer de aprovação do CEP/HCFMRP – USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da hepatite C crônica na atividade das principais isoformas CYP e dos transportadores BCRP, OATP1B1, OCT e P-gp em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática

Pesquisador: Carolina Pinto Vieira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60161116.4.3001.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.933.684

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa da instituição proponente Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e a Unidade de pesquisa Clínica do HCFMRP-USP será uma coparticipante da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

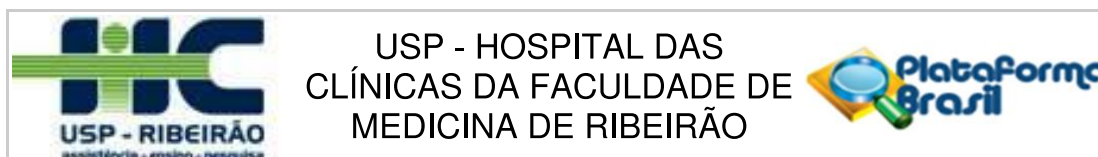
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No projeto de pesquisa consta que os pacientes investigados serão recrutados do Ambulatório de Hepatites do Centro de Referência em Especialidades Central, da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto e serão internados na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP durante o período de 24 h de coletas de amostras sanguíneas. Não haverá recrutamento de pacientes no HCFMRP-USP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os termos obrigatórios, incluindo a autorização do responsável pela Unidade de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.933.684

Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP, onde ocorrerá a realização de parte da pesquisa supracitada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP concorda com o parecer da instituição proponente e aprova o HCFMRP-USP (Unidade de Pesquisa Clínica) como coparticipante da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

“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”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_753622.pdf	05/01/2017 16:35:18		Aceito
Outros	Aprovacao_do_CAPP.pdf	05/01/2017 16:34:39	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_753622.pdf	18/11/2016 12:34:48		Aceito
Outros	Carta_pedencias.pdf	18/11/2016 12:33:49	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Orçamento	Orcamento_versao_2.docx	18/11/2016 12:23:37	Carolina Pinto Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_VERSAO_2.docx	17/11/2016 15:18:26	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_753622.pdf	21/09/2016 10:55:45		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPOSDOC.pdf	21/09/2016 10:55:27	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Outros	protocoloprefeitura.jpg	21/09/2016 10:07:14	Carolina Pinto Vieira	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

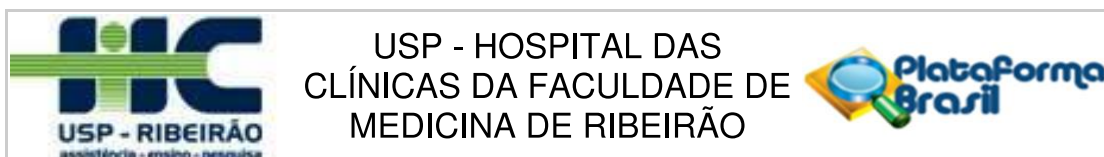
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 1.933.684

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_753622.pdf	19/09/2016 16:59:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPOSDOC.pdf	19/09/2016 16:57:51	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Orçamento	OrcamentoUPC.pdf	19/09/2016 16:52:08	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisadoresPKCLIN.pdf	19/09/2016 16:51:04	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaocordenadorclinico.pdf	19/09/2016 16:50:08	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaodeinfraestruturaPKCLIN.pdf	19/09/2016 16:48:35	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoUPC.pdf	19/09/2016 16:43:35	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Folha de Rosto	Folharosto.pdf	19/09/2016 16:38:42	Carolina Pinto Vieira	Aceito
Orçamento	Orcamento_carol.docx	31/08/2016 12:23:05	Carolina Pinto Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 15 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

