UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ROBERTA NATÁLIA CESTARI

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

Ribeirão Preto
2018

ROBERTA NATÁLIA CESTARI

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

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

Ribeirão Preto
2018

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.

Cestari, Roberta Natália

Efeito do lúpus eritematoso sistêmico na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da atorvastatina. Ribeirão Preto, 2018.
156 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. OATP1B1. 2. Lúpus. 3. Atorvastatina.
4. Farmacocinética. 5. Farmacodinâmica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberta Natália Cestari

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

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Ao meu pai **Roberto**,

Por todo amor, carinho, dedicação, tempo e esforços que sempre foram dedicados a mim e a minha formação, criando os alicerces do ser humano que sou hoje.

A você meu querido pai, minha eterna gratidão e profunda saudade.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Dulce Cestari** e aos meus irmãos **Poliany e João Victor Cestari,** pelo amor incondicional e por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado **Bruno Akimoto,** pela paciência, amor, carinho e companheirismo ilimitados.

Aos meus tios, **Ivanice e Marcos Cestari** e aos meus avós **Tereza e Jair Cestari**, pelas oportunidades que sempre me foram oferecidas com tanto amor e carinho.

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote**, pelas oportunidades oferecidas em seu grupo de pesquisa, pelo comprometimento ao ensinar ciência e pelo apoio profissional, essenciais para o meu desenvolvimento científico.

Ao **Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira**, por ter me recebido em seu grupo de trabalho e proporcionado a oportunidade de vivência clínica, assim como, pelas portas sempre abertas para discutir ciência e engrandecer ainda mais esse trabalho.

Ao **Dr. Flávio Falcão Lima de Souza**, pela colaboração e disposição em ajudar neste trabalho.

Ao **Corpo Clínico** do **Ambulatório de Divisão de Imunologia Clínica** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela cordialidade e pela ajuda no recrutamento de pacientes.

Aos **funcionários** 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 das pacientes e na coleta de amostras.

Às especialistas de laboratório, **Dra. Adriana Rocha** e **Dra. Maria Paula Marques Pereira**, pela paciência, empenho e suporte constante nos ensinamentos das técnicas analíticas e da farmacocinética.

Ao **Sr. Natalino Bocardo**, que nos ensina a conciliar trabalho e alegria, fazendo de nosso ambiente de estudo e trabalho um lugar agradável.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacocinética Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Ana Carolina Conchon Costa**, **Dra. Carolina Pinto Vieira**, **Dr. Daniel Valente Neves**, **Dr. Diego Alberto Ciscato Cusinato**, **Dra. Fernanda de Lima Moreira**, **Dr. Glauco Henrique Balthazar Nardotto, Grazielle Rodrigues, Dr. João Paulo Bianchi Ximenez, Me. Jhohann Richard de Lima Benzi**, **Dra. Juciene Aparecida Caris**, **Me. Leandro Francisco Pippa**, **Milena Locci de Oliveira**, pela amizade, discussões científicas e constante troca de conhecimentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, especialmente **Rosemary Ioshimine Gerolineto** e **Rosana Florêncio**, à coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, **Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira** e ao Presidente da Comissão de Pós-Graduação, **Profa. Dra. Monica Tallarico Pupo**, por toda dedicação, apoio e orientação que recebi durante este período.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processo número 2015/ 02754-8 pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao **CNPQ** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), processo número 166141/2017-8, pela concessão da bolsa de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A educação é o grande motor do desenvolvimento pessoal. É através dela que a filha de um camponês se torna médica, que o filho de um mineiro pode chegar a chefe de mina, que um filho de trabalhadores rurais pode chegar a presidente de uma grande nação”.

Nelson Mandela

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

CESTARI, R. N. **Effect of systemic lúpus erythematosus on the activity of the sinusoidal influx transporter OATP1B1 evaluated based on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of atorvastatin**. 2018. 156f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

In vitro, in silico and clinical studies have shown that the inflammatory diseases associated with increased cytokines result in down-regulation of transporters and enzymes involved in drug metabolism. Atorvastatin is a drug with metabolism dependent of CYP3A4 (hydroxylated metabolites acids and lactones) and with distribution to the liver dependent of sinusoidal influx transporter OATP1B1, where it inhibits HMG-CoA reductase, an enzyme that catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonic acid during the synthesis of cholesterol. The present study evaluates the effect of systemic lúpus erythematosus (SLE), an inflammatory disease, on the activity of the transporter OATP1B1, using plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites to pharmacokinetic evaluation and plasma concentrations of mevalonic acid to pharmacodynamic evaluation. Fifteen healthy volunteers, thirteen patients with SLEDAI scores from 0 to 4 and twelve patients with non-controlled SLE from 6 to 15 were investigated. Atorvastatin and its five metabolites as total concentration, atorvastatin as free concentration, gemfibrozil and mevalonic acid were analyzed in plasma using UPLC-MS/MS. The methods had no matrix effect, and the coefficients of variation and the relative standard errors of the accuracy and precision studies were less than 15%. The linearities of the validated plasma methods were 0.025-200 ng/mL for the total concentration of atorvastatin and metabolites, 0.00625-25 ng/mL for the free concentration of atorvastatin, 0.01-100 μg/mL for gemfibrozil and 0.125-50 ng/mL for mevalonic acid. Oral clearance of midazolam, a probe of CYP3A4 activity, did not vary between groups of healthy volunteers, controlled SLE and uncontrolled SLE. Patients investigated with controlled SLE showed elevated plasma concentrations of the cytokines MCP-1 and TNF-α, whereas patients with uncontrolled SLE showed elevated plasma concentrations of the cytokines MCP-1, TNF-α and IL-10. Patients in the uncontrolled SLE group showed higher AUC (67.27 *vs* 35.04 ng.h/mL) and C_{max} (21.68 *vs* 9.52 ng/mL) and lower apparent clearance values (377.4 *vs* 742.9 L/h) and apparent volume of distribution (3398 *vs* 9005 L) of atorvastatin when compared with the group of healthy volunteers. In relation to the atorvastatin metabolites, uncontrolled SLE increased AUC values (100.70 *vs* 59.12 ng.h/mL) and C_{max} (10.78 *vs* 5.21 ng/mL) only of the inactive metabolite atorvastatin lactone. The pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites do not differ between healthy controlled and healthy SLE groups. Administration of gemfibrozil (600 mg/12 hours for 6 days) to patients in the uncontrolled SLE group resulted in increased AUC (96.16 *vs* 44.78 ng.h/mL) and C_{max} (34.13 *vs* 14.89 ng/mL) and lower apparent clearance values (238.30 *vs* 638.80 L/h) and apparent volume of distribution (1939 *vs* 4596 L) when compared with the healthy volunteer group. In relation to the metabolites, there was an increase in the systemic exposure for the metabolites ortho-hydroxy atorvastatin ($AUC^{0-\infty}$ 183.20 *vs* 46.29 ng.h/mL), para-hydroxy atorvastatin (AUC^{0-36h} 15.12 *vs* 2.33 ng.h/mL), atorvastatin lactone ($AUC^{0-\infty}$ 111.50 *vs* 59.12 ng.h/mL), ortho-hydroxy atorvastatin lactone ($AUC^{0-\infty}$ 194.20 *vs* 75.65 ng.h/mL) and para-hydroxy atorvastatin lactone (AUC^{0-36h} 34.27 *vs* 10.18 ng.hr/mL). Administration of single oral dose of atorvastatin as monotherapy reduced AUC^{0-24h} values of mevalonic acid by approximately 55.66% in healthy volunteers, 62.96% in patients with controlled SLE, and 62.75% in patients with uncontrolled SLE, with no statistical significance between groups. Administration of gemfibrozil (600 mg/12 h for 6 days) practically does not change the hysteretic areas between plasma concentrations of mevalonic acid and plasma concentrations of atorvastatin plus plasma concentrations of the active hydroxylated metabolites (ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin) in the group of healthy volunteers. However, the administration of gemfibrozil discreetly increases the area of hysteresis in patients in the controlled SLE group, and markedly in patients in the uncontrolled SLE group. In conclusion, uncontrolled SLE increases systemic exposure and reduces hepatic exposure of atorvastatin and metabolites, indicating inhibition of the OATP1B1 sinusoidal influx transporter, once the in vivo activity of CYP3A4 was not changed, according to the oral clearance of midazolam. The Inflammation, not the disease, is responsible for the changes in the uncontrolled SLE group due to the inhibition of the OATP1B1 sinusoidal influx transporter once the systemic exposure to atorvastatin and its metabolites was not changed in the patients with controlled SLE.

Keywords: OATP1B1; lúpus; atorvastatin; pharmacokinetics and pharmacodynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas e metabolismo da atorvastatina (LENNERNÄS, 2003). 6

Figura 2: Ultrafiltração do plasma humano. Antes da ultrafiltração, o fármaco encontra-se parcialmente livre no plasma e parcialmente ligado às proteínas plasmáticas (A). Durante a ultrafiltração, o fármaco livre atravessa a membrana junto com o plasma e tampão fosfato. Sua concentração no ultrafiltrado é a mesma da amostra acima da membrana (B) (MILLIPORE CORPORATION, 2018a, 2018b). ...10

Figura 3: Espectro de massas das moléculas protonadas e seus respectivos íons produtos. ATV-atorvastatina, p- e o-OH-ATV- para- e orto-hidroxi atorvastatina, ATV-LAC-atorvastatina lactona, p- e o-OH-ATV-LAC para- e orto-hidroxi atorvastatina lactona.....15

Figura 4: Espectro de massas das moléculas protonadas e seus respectivos íons produtos. ATV-D5 atorvastatina-D5, p- e o-OH-ATV-D5 para- e orto-hidroxi atorvastatina-D5, ATV-LAC-D5 atorvastatina lactona-D5, p- e o-OH-ATV-LAC-D5 para- e orto-hidroxi atorvastatina lactona-D5. 16

Figura 5: Cromatogramas referentes à análise do plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração de 0,025 ng/mL de plasma (limite inferior de quantificação) e amostra de paciente com LES coletada 0,5 h após a administração de dose oral de 20 mg de atorvastatina. ATV atorvastatina, ATV-D5 atorvastatina D5, p- e o-OH-ATV- para- e orto-hidroxiatorvastatina, p- e o-OH-ATV-D5 para- e orto-hidroxiatorvastatina-D5, ATV-LAC-atorvastatina lactona, ATV-LAC-D5 atorvastatina lactona D5, p- e o-OH-ATV-LAC para- e orto-hidroxiatorvastatina lactona, p- e o-OH-ATV-LAC para- e orto-hidroxiatorvastatina lactona-D5. 17

Figura 6: Cromatogramas referentes à análise do ultrafiltrado de plasma branco+tampão fosfato (UF+T), amostra de controle de qualidade na concentração do limite inferior de quantificação (CQLIQ 0,00625 µg/mL de UF+T) e amostra de paciente com LES coletada 4 h após a administração de dose única oral de 20 mg de atorvastatina. ATV atorvastatina, ATV-D5 atorvastatina-D5. 18

Figura 7: Curvas concentrações plasmáticas *vs* tempo da ATV e metabólitos para uma paciente com LES que recebeu dose única oral de 20 mg de ATV. 21

Figura 8: Espectro de massas das moléculas protonadas e seus respectivos produtos para a genfibrozila e fluvastatina.....34

Figura 9: Cromatogramas referentes à análise do plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração de 0,01 µg/mL de plasma (limite inferior de quantificação) e amostra de voluntária sadia coletada no sexto dia após administração de doses múltiplas orais de 600 mg de GFZ a cada12 h. 35

Figura 10: Concentrações plasmáticas de GFZ (genfibrozila), obtidas no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h, após a administração de doses múltiplas orais de GFZ (600 mg/12 h) a uma voluntária sadia. 37

Figura 11: Espectro de massas da molécula protonada (A) e do íon produto (B) da mevalonolactona (transição 131,0 > 69,2). 47

Figura 12: Espectro de massas da molécula protonada (A) e do íon produto (B) da mevalonolactona-D3 (transição 134,0 > 72,0).....47

Figura 13: Cromatogramas referentes à análise da mevalonolactona (MVL) e do padrão interno MVL-D3 (20 ng/mL de água). A- Branco de solução fosfato de potássio dibásico 0,1 M (SF); B- Padrão MVL 0,25 ng/mL de SF+PI; C- CQ MVL 1,80 ng/mL de plasma+PI; D-Amostra de voluntária sadia coletada no primeiro dia de internação, sem a administração de ATV (níveis basais) +PI. Escala: MVL $6,8x10^4$ e PI $5,0x10^5$. 48

Figura 14: Avaliação do efeito matriz. Os cromatogramas referentes à amostra de plasma injetada no sistema cromatográfico foram analisados simultaneamente com as soluções padrão de mevalonolactona (MVL, 50 ng/mL de tampão fosfato) e mevalonolactona deuterada (MVL-D3 50 ng/mL de metanol) infundidas diretamente no espectrômetro de massas. 51

Figura 15: Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo da MVL para uma paciente com LES e uma voluntária sadia no primeiro dia de internação, sem a administração de ATV (MVL basal) e no segundo dia de internação, imediatamente antes e até 24 h após a administração de dose única oral de 40 mg de ATV (MVL tratamento com ATV). 52

Figura 16: Gráfico ilustrativo do cálculo do tamanho da amostra (n) com nível de significência fixado em 5% e poder do teste em 80%, *Power and Sample Calculation*. 69

Figura 17: Protocolo clínico com inclusão de 13 pacientes com LES controlado, 12 pacientes com LES não controlado e 15 voluntárias sadias. Ácido mevalônico (MVA), Atorvastatina (ATV) e Genfibrozila (GFZ). 72

Figura 18: Boxplot das concentrações das citocinas em plasma para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Dados apresentados como medianas e interquartis. 81

Figura 19: Curvas de concentrações plasmáticas da ATV e seus metabólitos ativos p-OH-ATV e o-OH-ATV versus tempo (zero a 36 h) nas duas ocasiões de administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV): Fase I monoterapia e Fase II no sexto dia do tratamento com GFZ 600 mg/12h. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.....85

Figura 20: Curvas de concentrações plasmáticas da ATV-LAC, p-OH-ATV-LAC e o-OH-ATV-LAC versus tempo no intervalo de zero a 36 h, após administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV) como monoterapia ou em associação com GFZ. Os dados estão apresentados como média e IC95%. 86

Figura 21: Parâmetros farmacocinéticos da ATV com significância estatística (p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias e pacientes com LES não controlado. Os dados estão apresentados como medianas e interquartis. 88

Figura 22: Correlação entre o clearance total aparente da ATV e as concentrações plasmáticas da citocina MCP-1 (P=0,01088) para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES não controlado (n=12) e pacientes com LES controlado (n=13). 90

Figura 23: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV com significância estatística (p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias (n=15) e pacientes com LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como medianas e interquartis.....94

Figura 24: Boxplot referente aos valores de AUC0-24h do MVA nas fases basal (sem administração de ATV), administração de dose única oral de ATV como monoterapia (ATV) e administração de dose única oral de ATV associada com GFZ (ATV + GFZ), para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como mediana e interquartis. 97

Figura 25: Curvas de concentração plasmática da ATV e seus metabólitos ativos p-OH-ATV e o-OH-ATV versus tempo (zero a 36 h) nas duas ocasiões de administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV): Fase I monoterapia e Fase II no sexto dia do tratamento com GFZ 600 mg/12h (painel superior). Curvas de concentração plasmática versus tempo do MVA (0- 24 h) nas fases basal (sem administração de ATV), monoterapia e associação com GFZ (painel inferior) para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.....98

Figura 26: Áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de ATV somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (o-OH-ATV e p-OH-ATV) e as concentrações plasmáticas de MVA, nas Fases monoterapia e associação com GFZ, obtidas para os grupos de voluntárias sadias (n=15), LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média. 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos analisados e suas transições, energia do cone e energia de colisão 9

Tabela 2: Concentrações de ATV e metabólitos nos controles de qualidade utilizados na validação do método analítico 11

Tabela 3: Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) do método de análise da concentração total da ATV e metabólitos em plasma 19

Tabela 4: Parâmetros de validação do método de análise da concentração total da ATV e metabólitos em plasma.....20

Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos da ATV em uma paciente com LES após administração de dose única oral de 20 mg de ATV 22

Tabela 6: Parâmetros de validação do método de análise da concentração livre da atorvastatina em plasma 23

Tabela 7: Compostos analisados e suas transições, energia do cone e energia de colisão 30

Tabela 8: Concentrações plasmáticas de genfibrozila nos controles de qualidade utilizados na validação do método analítico 31

Tabela 9: Parâmetros de validação do método de análise da genfibrozila em plasma 36

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos da genfibrozila para uma voluntária sadia tratada com doses múltiplas orais (600 mg/12 h).....37

Tabela 11: Análise estatística das inclinações das curvas de calibração da mevalonolactona obtidas em plasma e em solução de fostato de potássio dibásico 0,1M (SF) 49

Tabela 12: Parâmetros de validação do método de análise da mevalonolactona em plasma e em solução fosfato de potássio dibásico 0,1 M (SF) 50

Tabela 13: Porcentagem de formação da MVL a partir do MVA.....52

Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos da MVL nas fases basal e tratamento com dose única oral de 40 mg de ATV. Dados individuais de uma paciente com LES e uma voluntária sadia 53

Tabela 15: Critérios para diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico (LES), propostos em 1982 pelo *American College of Rheumatology* e modificados em 1997. 67

Tabela 16: SLEDAI (*Systemic Lúpus Erythematosus Disease Activity*) com escores de 0-105 68

Tabela 17: Número de pacientes com LES controlado, LES não controlado e voluntárias sadias que receberam a dose de 80, 40 ou 20 mg de ATV em estudo randomizado.....71

Tabela 18: Características antropométricas das voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média e IC 95% 76

Tabela 19: Escores SLEDAI para as pacientes com LES controlado (n=13) 77

Tabela 20: Escores SLEDAI para as pacientes com LES não controlado (n=12) 78

Tabela 21: Exames laboratoriais das voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n= 12), apresentados como media e IC 95% 79

Tabela 22: Concentrações das citocinas em plasma para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Dados apresentados como média e IC 95% 80

Tabela 23: Clearance total aparente do midazolam (mL/min/kg) para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). 82

Tabela 24: Parâmetros farmacocinéticos da GFZ administrada em doses múltiplas orais de 600 mg/12 h para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Dados apresentados como média e IC 95%..83

Tabela 25: Parâmetros farmacocinéticos da ATV para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.....87

Tabela 26: Fração livre da ATV nas fases monoterapia e associação com GFZ para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como valores individuais, média e IC 95% 89

Tabela 27: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV para as voluntárias sadias. Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.....91

Tabela 28: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV para as pacientes com LES controlado. Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.....92

Tabela 29: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV para as pacientes com LES não controlado. Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.....93

Tabela 30: Razões metabólicas de $AUC^{0-\infty}$ ou AUC^{0-36h} referentes a monoterapia e associação com GFZ, para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES

controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média e IC 95%. 95

Tabela 31: Parâmetros farmacocinéticos do MVA para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média e IC 95%. 96

Tabela 32: Dados individuais das características antropométricas e escore SLEDAI das pacientes com LES controlado (n=13) 128

Tabela 33: Dados individuais das características antropométricas e escore SLEDAI das pacientes com LES não controlado (n=12) 128

Tabela 34: Dados individuais das características antropométricas das voluntárias sadias (n=15) 129

Tabela 35: Dados individuais dos exames laboratoriais das pacientes com LES controlado (n=13) 130

Tabela 36: Dados individuais dos exames laboratoriais das pacientes com LES não controlado (n=12) 131

Tabela 37: Dados individuais dos exames laboratoriais das voluntárias sadias (n= 15) 132

Tabela 38: Dados individuais do hemograma das pacientes com LES controlado (n= 13) 133

Tabela 39: Dados individuais do hemograma das pacientes com LES não controlado (n= 12) 133

Tabela 40: Dados individuais do hemograma das voluntárias sadias (n= 15) 134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-1 GPA	Alfa-1 glicoproteína ácida
ABC	*ATP-binding cassette*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
ATV	Atorvastatina
ATV-LAC	Atorvastatina lactona
BCRP	*Breast cancer resistance protein*
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
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450
E_H	Extração hepática
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Electrospray ionization
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
γ-GT	Gama glutamil transferase
GFZ	Genfibrozila
h	horas
HCFMRP/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSD	*Honest significant differences*
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corpórea
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

LDL	Low density lipoprotein
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LIQ	Limite inferior de quantificação
LPL	Lipoproteína lipase
LSQ	Limite superior de quantificação
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein*
MDR1	*Multi-drug resistance gene*
$[M+H]^+$	Íon molecular protonado
min	minutos
MRM	*Multiple reaction monitoring*
MS/MS	Espectrometria de massas
MVA	Ácido mevalônico
MVL	Mevalonolactona
NEFA	*non-esterified fatty acid*
NSB	Nonspecific binding
OATP1B1	*organic anion transporting polypeptides*
o-OH-ATV	orto-hidroxi atorvastatina
o-OH-ATV-LAC	orto-hidroxi atorvastatina lactona
PI	Padrão interno
p-OH-ATV	para-hidroxi atorvastatina
p-OH-ATV-LAC	para-hidroxi atorvastatina lactona
PK-PD	Farmacocinética-Farmacodinâmica
PPARs	receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
SF	Solução fosfato de potássio dibásico 0,1 M
SLC	*Solute Carrier*
SLEDAI	*Systemic Lúpus Erythematosus Disease Activity Index*
SPE	Extração em fase sólida
TGP/ALT	Transaminase glutâmico pirúvica/Alanina aminotransferase
TGO/AST	Transaminase glutâmico oxalacética/Aspartato aminotransferase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRC	Toronto Research Chemicals Inc.
UF+T	Ultrafiltrado de plasma e tampão fosfato
UGTs	Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrômetro de massas
UV	ultravioleta
vs	*versus*
v/v	volume/volume
VLDL	*Very low density lipoprotein*

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC	Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo
$AUC^{0-\infty}$	Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero até o infinito
AUC^{0-12h}	Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero até 12 horas
AUC^{0-24h}	Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero até 24 horas
AUC^{0-36h}	Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero até 36 horas
β	Constante de velocidade de eliminação
β-oxidação	Beta-oxidação
C_{ss}	Concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio
CL/F	Clearance total aparente
$CL^{c}ef$	Clearance de efluxo canalicular
$CL^{s}ef$	Clearance de efluxo sinusoidal
CLm	Clearance metabólico
C_{max}	Concentração plasmática máxima
F_u	Fração livre
K_{el}	Constante de velocidade de eliminação total
r^2	Coeficiente de correlação
τ	Intervalo de dose
$t_{1/2}$	Meia-vida
t_{max}	Tempo para alcançar a concentração máxima
Vd/F	Volume de distribuição aparente

Sumário

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS vi

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ix

LISTA DE SÍMBOLOS xi

INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO I 4

I.1 ANÁLISE SEQUENCIAL DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DA ATV E SEUS CINCO METABÓLITOS EM PLASMA E DA CONCENTRAÇÃO LIVRE DA ATV EM PLASMA 5

I.1.1 INTRODUÇÃO 5

I.1.2 OBJETIVOS 7

I.1.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 7

I.1.3.1 Soluções padrão e reagentes 7

I.1.3.2 Análise Cromatográfica 8

I.1.3.3 Preparo das amostras para a concentração total da ATV e seus metabólitos 9

I.1.3.4 Preparo das amostras para a concentração livre da ATV 10

I.1.3.5 Validação do método 10

I.1.3.6 Casuística e protocolo clínico 13

I.1.3.7 Análise farmacocinética 14

I.1.4 RESULTADOS 14

I.1.5 DISCUSSÃO 24

I.2 ANÁLISE DA GFZ EM PLASMA 28

I.2.1 INTRODUÇÃO 28

I.2.2 OBJETIVOS 29

I.2.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 29

I.2.3.1 Soluções padrão e reagentes 29

I.2.3.2 Análise Cromatográfica 29

I.2.3.3 Preparo das amostras 30

I.2.3.4 Validação do método 31

I.2.3.5 Casuística e protocolo clínico 33

I.2.3.6 Análise farmacocinética 33

I.2.4 RESULTADOS 34

I.2.5 DISCUSSÃO 38

I.3 ANÁLISE DO MVA EM PLASMA 40

I.3.1 INTRODUÇÃO 40

I.3.2 OBJETIVOS 41

I.3.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 41

I.3.3.1 Soluções padrão e reagentes 41

I.3.3.2 Análise Cromatográfica 42

I.3.3.3 Preparo das amostras 43

I.3.3.4 Validação do método 43

I.3.3.5 Casuística e protocolo clínico 45

I.3.3.6 Análise farmacocinética 46

I.3.4 RESULTADOS 47

I.3.5 DISCUSSÃO 53

I.4. CONCLUSÃO 56

CAPÍTULO II 58

II.1 INTRODUÇÃO 59

II.2 OBJETIVOS 65

II.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 66

II.3.1 Casuística 66

II.3.2 Protocolo clínico 70

II.3.3 Métodos analíticos 72

II.3.4 Análise farmacocinética 73

II.3.4.1 Análise farmacocinética da ATV e seus metabólitos 73

II.3.4.2 Análise farmacocinética da GFZ 74

II.3.4.3 Análise farmacocinética do MVA 75

II.3.5 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A4 empregando midazolam como fármaco marcador 75

II.3.6 Análise estatística 75

II.4 RESULTADOS 76

II.4.1 Dados clínicos e demográficos 76

II.4.2 Dados das citocinas plasmáticas 80

II.4.3 Efeito da atividade in vivo do CYP3A4 na disposição da ATV e seus metabólitos 81

II.4.4 Farmacocinética da genfibrozila administrada em dose múltipla 83

II.4.5 Efeito do LES na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da ATV, administrada como monoterapia ou associada a GFZ 84

II.5 DISCUSSÃO 99

II.6 CONCLUSÃO 108

REFERÊNCIAS 110

ANEXOS 121

APÊNDICES 128

INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO I

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

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

I.1.1 INTRODUÇÃO

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

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

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

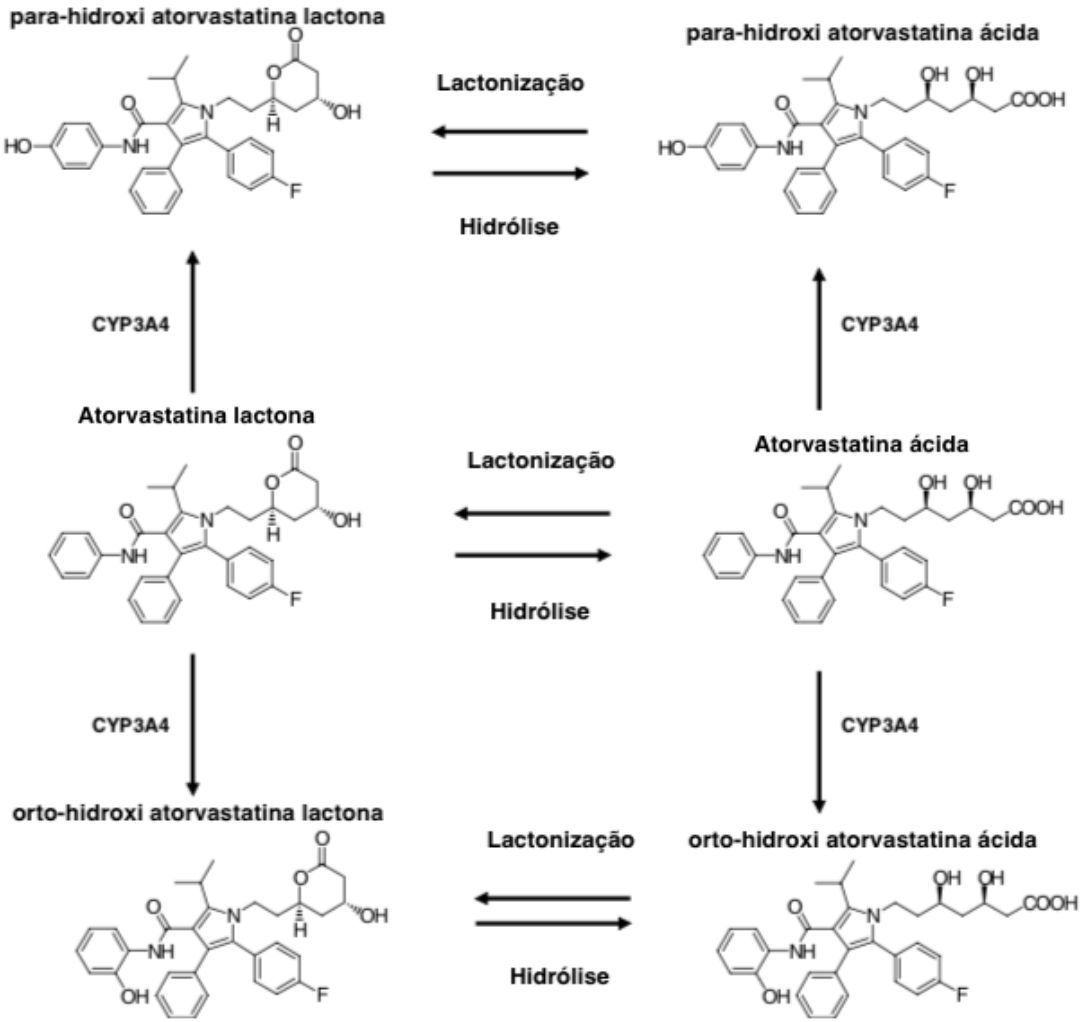


Figura 1: Estruturas químicas e metabolismo da atorvastatina (LENNERNÄS, 2003).

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

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

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

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

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

I.1.2 OBJETIVOS

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

I.1.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

I.1.3.1 Soluções padrão e reagentes

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

(ATV-LAC, 98%, TRC), para-hidroxi atorvastatina (p-OH-ATV, 98%, TRC), orto-hidroxi atorvastatina (o-OH-ATV, 96%, TRC), para-hidroxi atorvastatina lactona (p-OH-ATV-LAC, 98,77%, TRC), orto-hidroxi atorvastatina lactona (o-OH-ATV-LAC, 98%, TRC) foram preparadas individualmente na concentração de 200 µg/mL de acetonitrila e posteriormente diluídas nas concentrações de 400; 200; 100; 40; 20; 4; 2; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 ng/mL de acetonitrila. As soluções de atorvastatina-D5 [ATV-D5, 96%, Toronto Research Chemicals Inc. (TRC), North York, ON, Canadá], atorvastatina lactona-D5 (ATV-LAC-D5, 97%, TRC), para-hidroxi atorvastatina-D5 (p-OH-ATV-D5, 95%, TRC), orto-hidroxi atorvastatina-D5 (o-OH-ATV-D5, 94%, TRC), para-hidroxi atorvastatina lactona-D5 (p-OH-ATV-LAC-D5, 98%, TRC), orto-hidroxi atorvastatina lactona-D5 (o-OH-ATV-LAC-D5, 95%, TRC), foram utilizadas como padrão interno (PI) na concentração de 10 e 1 ng/mL de acetonitrila.

A acetonitrila (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) utilizada foi grau cromatografia e o ácido fórmico (J. T. Baker, 90,1%) utilizado foi grau PA. A água utilizada foi obtida do sistema de purificação Milli Q Plus® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

I.1.3.2 Análise Cromatográfica

A análise da ATV e seus metabólitos foi realizada por UPLC-MS/MS constituído por bomba quaternária ACQUITY UPLC® H-Class, injetor automático ACQUITY UPLC® Sample Manager – FTN equipado com organizador de amostras ACQUITY Sample Organizer, forno de coluna TCM/CHM® e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S® equipado com interface por eletronebulização (ESI) Zspray™, todos Waters (Milford, CT, EUA). A separação foi realizada na coluna ACQUITY UPLC®BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm**,** Waters, Irlanda) mantida na temperatura de 40°C com fase móvel constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,2% e acetonitrila (55:45, v/v) na vazão de 0,4 mL/min. As análises foram executadas no modo ionização positivo. A voltagem do capilar foi de 3,50 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 e o argônio foi utilizado como gás de colisão na vazão de 0,20 mL/min. A Tabela 1 detalha as energias do cone e de colisão dos compostos de interesse e do PI, bem como a monitorização das moléculas protonadas $[M + H]^+$ e seus respectivos produtos. As

condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão dos analitos na concentração de 100 ng/mL de acetonitrila. As análises foram executadas no modo MRM (*multiple reaction monitoring*). A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

Tabela 1: Compostos analisados e suas transições, energia do cone e energia de colisão

Composto	Transição (m/z)	Energia do cone (V)	Energia de colisão (eV)
atorvastatina	559,2 → 440,2	28	20
p- e o-OH-ATV	575,2 → 440,2	18	22
atorvastatina lactona	541,2 → 448,2	35	15
p- e o-ATV-LAC	557,2 → 448,2	25	15
atorvastatina-D5	564,4 → 445,2	25	20
p- e o-OH-ATV-D5	580 → 445,2	25	20
atorvastatina lactona-D5	546,2 → 453,2	25	15
p- e o-ATV-LAC-D5	562 → 453,2	25	20

p- e o-OH-ATV: para e orto-hidroxi atorvastatina, p- e o-ATV-LAC: para e orto-hidroxi atorvastatina lactona

I.1.3.3 Preparo das amostras para a concentração total da ATV e seus metabólitos

Alíquotas de 50 µL de plasma foram enriquecidas com 25 µL da solução de PI (10 ng/mL acetonitrila) e precipitadas com 125 µL de acetonitrila. Os tubos foram agitados (Phoenix Luferco, modelo AP56, Araraquara, SP, Brasil) durante 30 segundos e centrifugados a 4°C por 15 minutos a 21500 g (centrífuga refrigerada Hitachi, modelo CT 15RE, Hitachinaka - Ibaraki, Japão). A seguir, alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram adicionadas de 100 µL de ácido fórmico 0,1%, agitadas durante 5 segundos e 15 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

I.1.3.4 Preparo das amostras para a concentração livre da ATV

Alíquotas de 50 µL de plasma e de 50 µL de uma solução tampão de fosfato de potássio dibásico 0,1 M pH= 7,4 foram acondicionadas em dispositivo de ultrafiltração Centrifree® (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e centrifugadas a 1875 *g* durante 15 minutos em centrífuga com rotor de eixo fixo (ângulo de 36 graus) (modelo NT 825, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), refrigerado a 20ºC para a obtenção do ultrafiltrado do plasma. O processo de ultrafiltração do plasma humano está descrito na Figura 2. Alíquotas de 100 µL do ultrafiltrado de plasma e tampão fosfato (UF+T) foram enriquecidas com 25 µL da solução de PI (1 ng/mL de acetonitrila), 25 µL de acetonitrila e 150 µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%. Em seguida, as amostras foram agitadas durante 5 segundos e 15 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

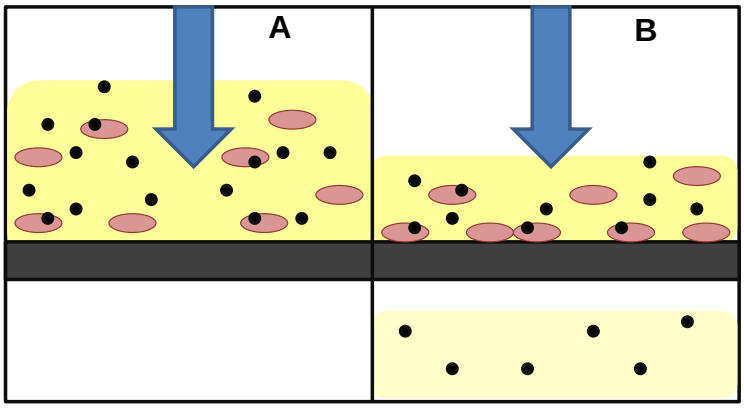


Figura 2: Ultrafiltração do plasma humano. Antes da ultrafiltração, o fármaco encontra-se parcialmente livre no plasma e parcialmente ligado às proteínas plasmáticas (A). Durante a ultrafiltração, o fármaco livre atravessa a membrana junto com o plasma e tampão fosfato. Sua concentração no ultrafiltrado é a mesma da amostra acima da membrana (B) (MILLIPORE CORPORATION, 2018a, 2018b).

I.1.3.5 Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com as recomendações da resolução para métodos bioanalíticos vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, Resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012). As amostras de plasma branco de voluntários sadios não tratados com ATV foram obtidas no Hemocentro do hospital local.

As curvas de calibração, incluindo a amostra branco e a amostra zero, foram preparadas em triplicata, empregando alíquotas de 50 µL de plasma branco para a concentração total e 100 µL de ultrafiltrado de plasma branco e tampão (UFbranco+T)

para a concentração livre, enriquecidas com 25 µL da solução de PI e 25 µL de cada solução padrão de ATV e metabólitos para a concentração total e 25 µL de cada solução padrão de ATV para a concentração livre. As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20; 50; 100 e 200 ng/mL de plasma para a concentração total e 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,1; 1; 10 e 25 ng/mL de UF+T para a concentração livre. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das áreas dos picos plotadas em função das respectivas concentrações utilizando a ponderação $1/x^2$. As curvas de calibração foram consideradas aprovadas quando os desvios de, no mínimo 75% dos padrões de calibração, foram menores ou iguais a 20% para o LIQ e 15% para os demais padrões.

As amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas em plasma branco, de acordo com as concentrações especificadas na Tabela 2, para o LIQ, baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e de diluição (CQD), sendo todas armazenadas a -80 °C.

Tabela 2: Concentrações de ATV e metabólitos nos controles de qualidade utilizados na validação do método analítico

(ng/mL)	ATV e metabólitos **Concentração total**	ATV **Concentração livre**
LIQ	0,025	0,00625
CQB	0,05	0,0125
CQM	100	10
CQA	160	20
CQD*	400	-

***** As replicatas de CQD foram diluídas em plasma branco na proporção de 1:5, imediatamente antes do procedimento de preparo da amostra.
- Não se aplica.

O ensaio de seletividade foi determinado empregando alíquotas de 50 µL de plasma branco para a concentração total e 100 µL UF branco+T para a concentração livre, obtidas de 8 diferentes voluntários, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os cromatogramas obtidos foram comparados com as amostras de LIQ.

Para a avaliação do efeito residual, foram analisadas injeções da amostra branco antes e após a injeção da amostra do limite superior de quantificação (LSQ). O cromatograma da amostra branco obtido após a injeção do LSQ foi comparado com

o cromatograma da amostra do LIQ. O efeito residual foi considerado ausente quando as áreas dos picos interferentes eluídos no tempo de retenção dos analitos foram menores que 20% da área do LIQ da ATV e metabólitos e menores que 5% da área do PI.

O efeito matriz foi avaliado empregando 8 alíquotas de 50 µL de plasma branco para a concentração total e 100 µL de UF branco+T para concentração livre, obtidas de diferentes voluntários, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os extratos de plasma e UF brancos+T obtidos foram enriquecidos com soluções padrão nas concentrações de CQB e CQA. Também foram analisadas as mesmas soluções padrão em acetonitrila adicionadas de PI. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação abaixo. O efeito matriz foi avaliado pelo coeficiente de variação (CV) de todos os FMN obtidos e deve ser inferior a 15%.

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

O teste de ligação inespecífica (nonspecific binding - NSB) da ATV no filtro do dispositivo de ultrafiltração foi realizado empregando soluções de ATV preparadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) nas mesmas concentrações do CQB (0,0125 ng/mL) e CQA (20 ng/mL). Alíquotas de 200 µL (n=5) dessas soluções foram submetidas ao mesmo procedimento de ultrafiltração descrito no item I.1.3.4. Os resultados das soluções ultrafiltradas foram comparados com as soluções não submetidas ao procedimento de ultrafiltração e apresentados como EPR (erro padrão relativo). Os resultados foram considerados adequados para valores de EPR dentro da faixa de ± 15%.

Para a avaliação da precisão e exatidão foram preparadas quintuplicatas do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD analisadas em uma única corrida analítica (intracorrida) e em 3 corridas distintas (intercorridas), em dias consecutivos.

A exatidão intracorrida e intercorrida é expressa pelo EPR obtido pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e o valor nominal (concentração teórica correspondente), sendo representada pela equação abaixo:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{concentração experimental média} - \text{valor nominal})*100}{\text{valor nominal}}$$

O método foi considerado exato para valores de EPR dentro da faixa de ± 20% para as amostras de LIQ e ± 15% para os demais CQ.

Os resultados da precisão intracorrida e intercorrida foram apresentados como CV, calculado segundo a equação a seguir:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \cdot 100$$

O método foi considerado preciso para os valores de CV dentro da faixa de ± 20% para as amostras de LIQ e ± 15% para os demais CQ.

Os estudos de estabilidade (curta duração, pós processamento e ciclos de descongelamento) foram avaliados utilizando amostras de controles de qualidade nas concentrações de CQB e CQA e analisadas em quintuplicatas. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras de plasma e UF+T foram mantidas em temperatura de 4°C por 4 h e, posteriormente, processadas e analisadas. Para a estabilidade pós-processamento, as amostras foram mantidas no autoinjetor a 10°C durante 15 h para a concentração total da ATV e metabólitos e 24 h para a concentração livre, antes de serem injetadas. Para a estabilidade de ciclos de descongelamento, as amostras foram congeladas a -80°C por 24 h e, posteriormente, foram descongeladas a 4°C e novamente congeladas por 24 h. Esse ciclo foi repetido por mais duas vezes antes do procedimento de preparo e análise.

As concentrações obtidas após os ensaios de estabilidade foram comparadas com as obtidas das mesmas amostras recém preparadas e os resultados foram apresentados como CV e EPR. As amostras foram consideradas estáveis para valores de CV e EPR dentro da faixa de ± 15 %.

I.1.3.6 Casuística e protocolo clínico

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP; anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP; anexo B). Foi investigada uma paciente com LES, selecionada nos ambulatórios da Divisão de Imunologia Clínica do HCFMRP/USP. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a paciente foi internada na Unidade

de Pesquisa Clínica do HCFMRP/USP durante o período do estudo e recebeu dose única oral de ATV de 20 mg com 200 mL de água. As amostras seriadas de sangue foram colhidas em tubos contendo fluoreto de sódio (inibidor de esterases), nos tempos 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 22; 24; 30 e 36 h após a administração da ATV.

I.1.3.7 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo, empregando o programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.3 (Certara USA, Inc., Princeton, EUA).

Os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos foram realizados empregando o modelo bicompartimental (modelo 12) para a ATV e modelo não compartimental para os metabólitos (p e o-OH-ATV, ATV-LAC e p e o-OH-ATV-LAC).

A concentração livre da ATV no plasma foi avaliada no tempo de observação da concentração plasmática máxima (C_{max}). A fração livre no plasma (f_u) foi determinada conforme a equação abaixo:

$$f_u = \frac{\text{concentração livre no plasma}}{\text{concentração total no plasma}}$$

I.1.4 RESULTADOS

As Figuras 3 e 4 apresentam os espectros de massas das moléculas protonadas e seus respectivos produtos da ATV, p e o-OH-ATV, ATV-LAC, p e o-OH-ATV-LAC e dos padrões internos deuterados da ATV-D5, p e o-OH-ATV-D5, ATV-LAC-D5 e p e o-OH-ATV-LAC-D5, respectivamente monitorados nas transições de 559,2 > 440,2 *m/z*; 575,2 > 440,2 *m/z*; 541,2 > 448,2 *m/z*; 557,2 > 448,2 *m/z* e 564,4 > 445,2 *m/z*; 580 > 445,2 *m/z*; 546,2 > 453,2 *m/z*; 562 > 453,2 *m/z*. Os íons produtos foram selecionados com base na intensidade do sinal.

A Figura 5 apresenta os cromatogramas referentes à análise de plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração de 0,025 ng/mL de plasma (limite inferior de quantificação) e amostra de paciente com LES coletada 0,5 h após a administração de dose única oral de 20 mg de ATV.

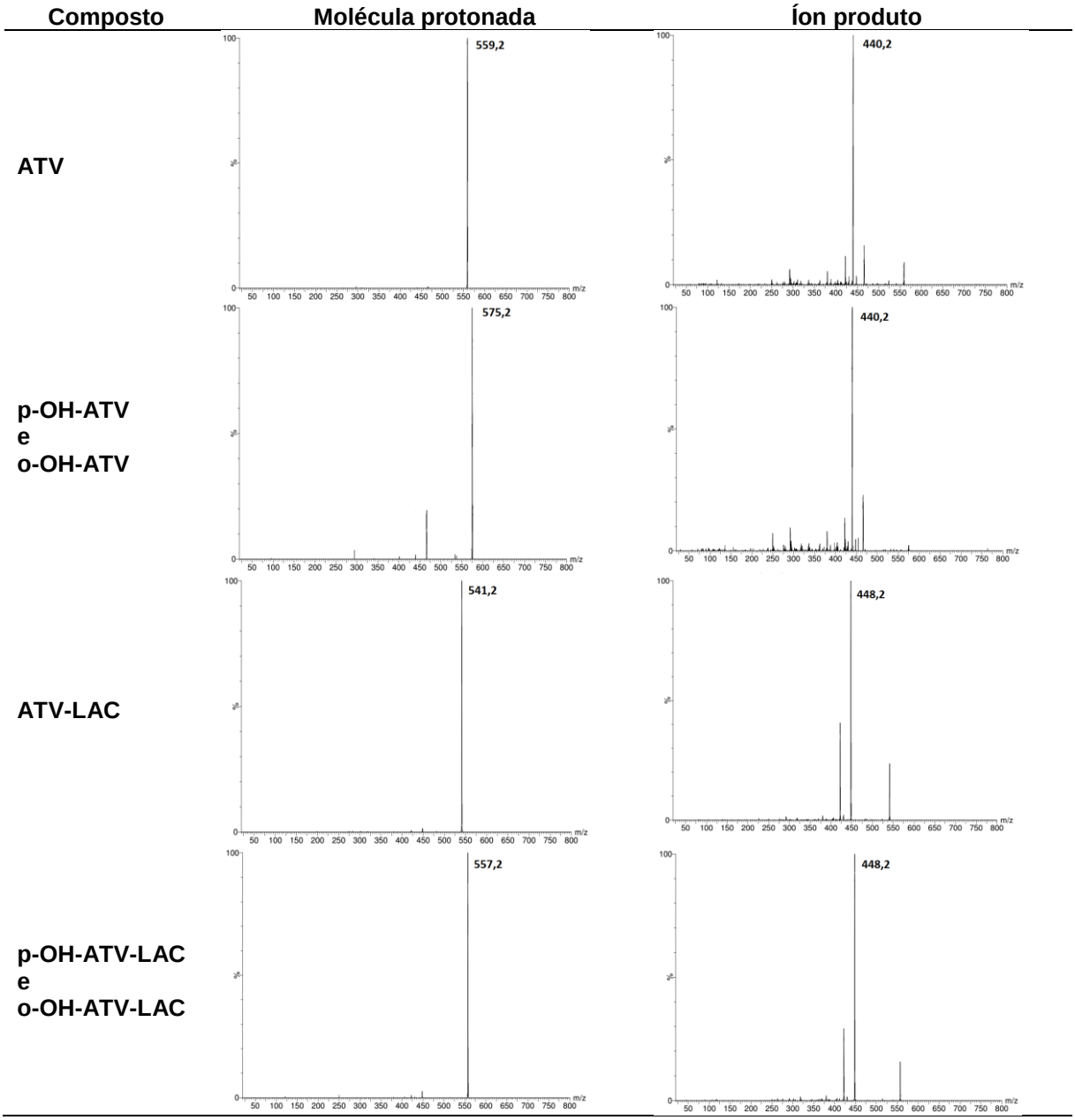


Figura 3: Espectro de massas das moléculas protonadas e seus respectivos íons produtos. ATV-atorvastatina, p- e o-OH-ATV- para- e orto-hidroxi atorvastatina, ATV-LAC-atorvastatina lactona, p- e o-OH-ATV-LAC para- e orto-hidroxi atorvastatina lactona.

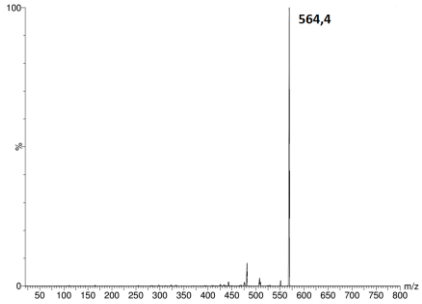
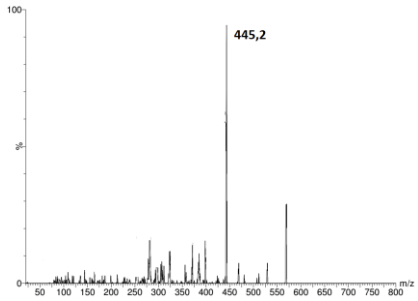
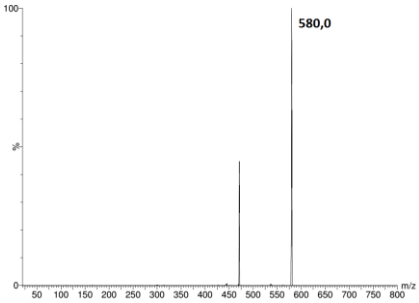
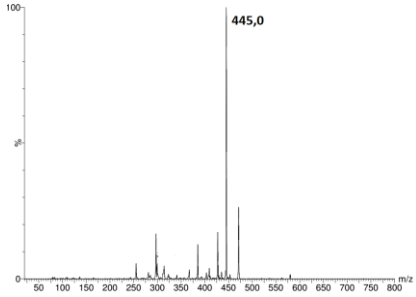
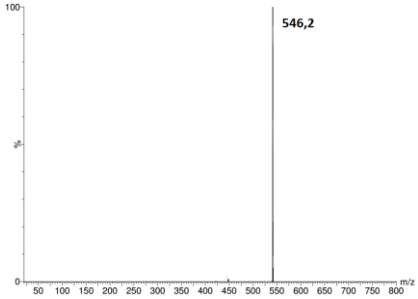
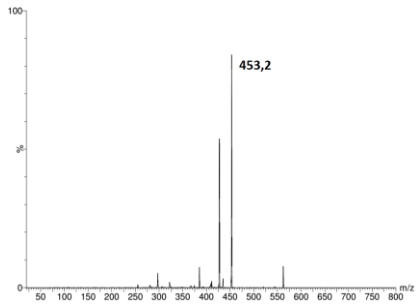
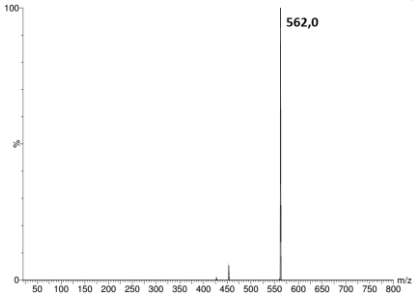
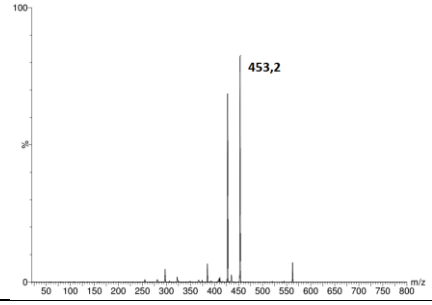
Composto	Molécula protonada	Íon produto
ATV-D5		
p-OH-ATV-D5 e o-OH-ATV-D5		
ATV-LAC-D5		
p-OH-ATV-LAC-D5 e o-OH-ATV-LAC-D5		

Figura 4: Espectro de massas das moléculas protonadas e seus respectivos íons produtos. ATV-D5 atorvastatina-D5, p- e o-OH-ATV-D5 para- e orto-hidroxi atorvastatina-D5, ATV-LAC-D5 atorvastatina lactona-D5, p- e o-OH-ATV-LAC-D5 para- e orto-hidroxi atorvastatina lactona-D5.

Analito	Transição m>z	Tempo retenção (min)	Plasma branco	CQLIQ	Amostra de paciente com LES
ATV	**559,2>440,2**	**2,4**			
ATV-D5	**564,4>445,2**	**2,4**			
p- e o-ATV	**575,2>440,0**	**0,7 e 1,9**			
p- e o-ATV-D5	**580,0>445,0**	**0,7 e 1,9**			
ATV-LAC	**541,2>448,2**	**3,7**			
ATV-LAC-D5	**546,2>453,2**	**3,7**			
p- e o-ATV-LAC	**557,2>448,2**	**1,0 e 2,8**			
p- e o-ATV-LAC-D5	**562,0>453,2**	**1,0 e 2,8**			

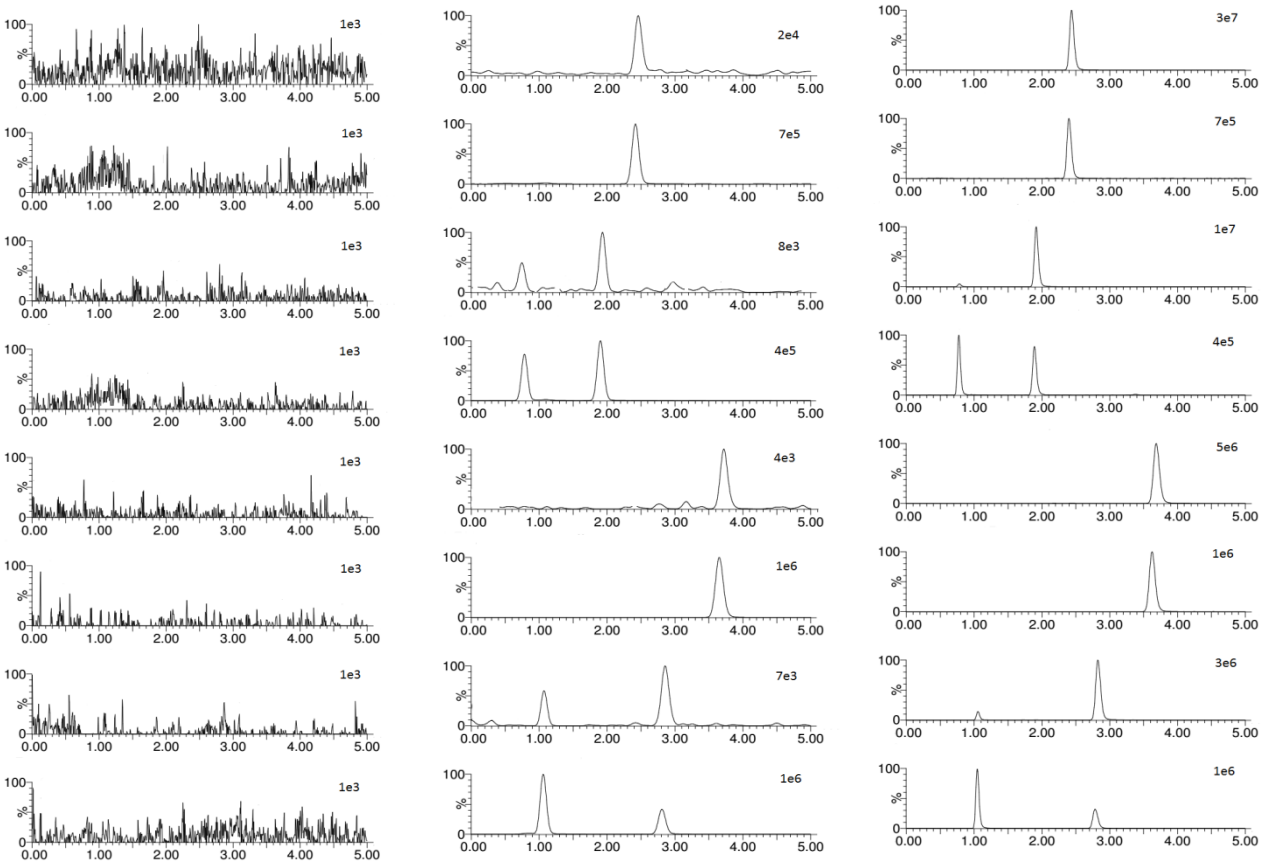


Figura 5: Cromatogramas referentes à análise do plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração de 0,025 ng/mL de plasma (limite inferior de quantificação) e amostra de paciente com LES coletada 0,5 h após a administração de dose oral de 20 mg de atorvastatina. ATV atorvastatina, ATV-D5 atorvastatina D5, p- e o-OH-ATV- para- e orto-hidroxiatorvastatina, p- e o-OH-ATV-D5 para- e orto-hidroxiatorvastatina-D5, ATV-LAC-atorvastatina lactona, ATV-LAC-D5 atorvastatina lactona D5, p- e o-OH-ATV-LAC para- e orto-hidroxiatorvastatina lactona, p- e o-OH-ATV-LAC para- e orto-hidroxiatorvastatina lactona-D5.

A Figura 6 apresenta os cromatogramas referentes à análise do ultrafiltrado de plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração do limite inferior de quantificação (CQLIQ 0,00625 ng/mL de UF+T) e amostra de paciente com LES coletada 4 h após a administração de dose única oral de 80 mg de ATV.

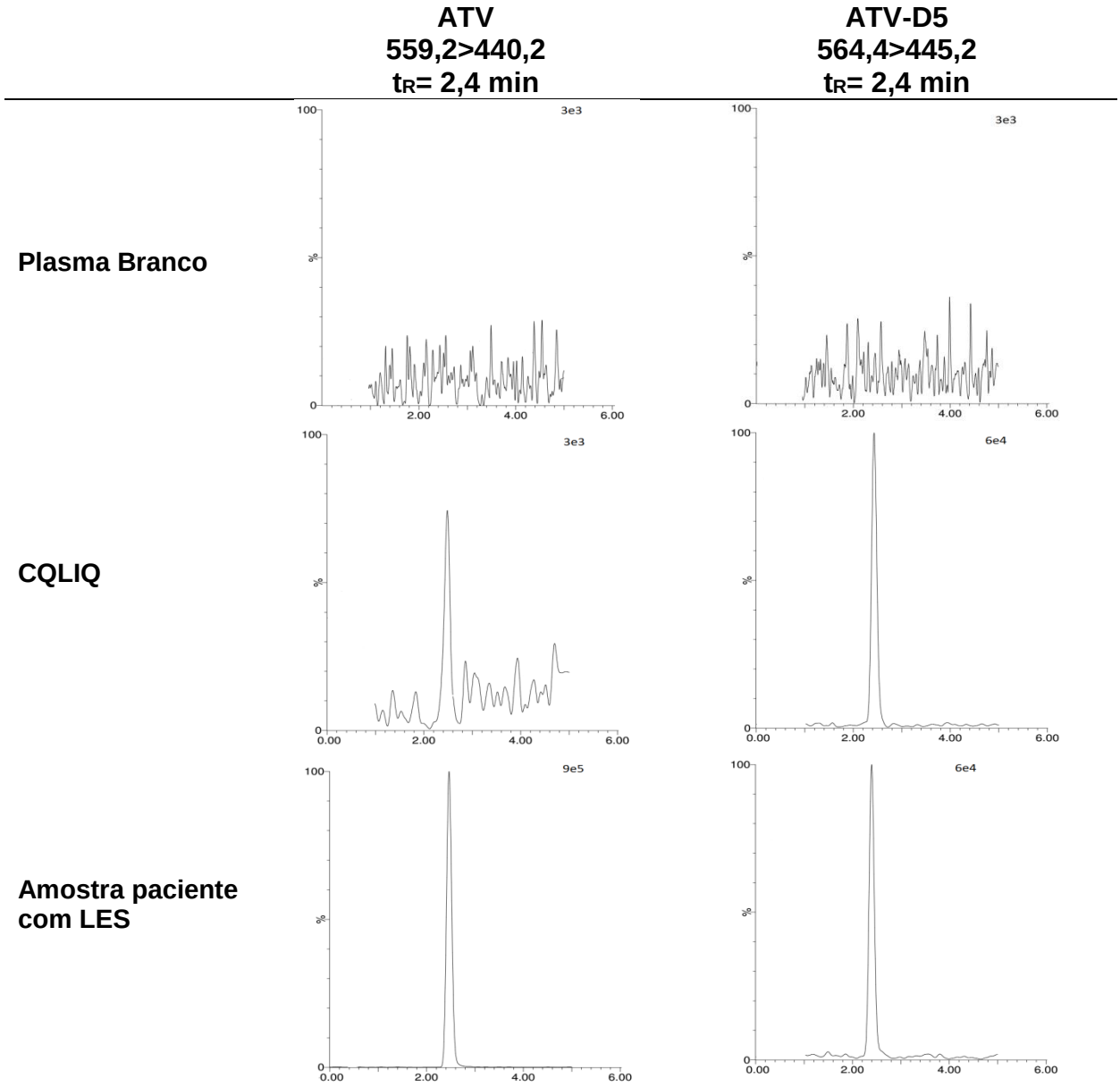


Figura 6: Cromatogramas referentes à análise do ultrafiltrado de plasma branco+tampão fosfato (UF+T), amostra de controle de qualidade na concentração do limite inferior de quantificação (CQLIQ 0,00625 µg/mL de UF+T) e amostra de paciente com LES coletada 4 h após a administração de dose única oral de 20 mg de atorvastatina. ATV atorvastatina, ATV-D5 atorvastatina-D5.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados obtidos na validação do método de análise da concentração total da ATV e metabólitos em plasma.

Tabela 3: Efeito matriz, linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) do método de análise da concentração total da ATV e metabólitos em plasma

	Efeito Matriz FMN médio (CV%)	**Linearidade (ng/mL)**	**Equação da reta**	**r^2**
ATV	10	0,025 – 200	0,2647 x – 0,0044	0,9880
p-OH-ATV	13		0,3395 x – 0,0032	0,9900
o-OH-ATV	13		0,3444 x – 0,0046	0,9871
ATV-LAC	10		0,2817 x – 0,0003	0,9920
p-OH-ATV-LAC	9		0,3199 x – 0,0016	0,9869
o-OH-ATV-LAC	12		0,7764 x – 0,0052	0,9895

ATV: atorvastatina, p-OH-ATV: para-hidroxi atorvastatina, o-OH-ATV: orto-hidroxi atorvastatina, ATV-LAC: atorvastatina lactona, p-OH-ATV-LAC: para-hidroxi atorvastatina lactona, o-OH-ATV-LAC: orto-hidroxi atorvastatina lactona. FMN: fator de matriz normalizado por padrão interno, CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100

Tabela 4: Parâmetros de validação do método de análise da concentração total da ATV e metabólitos em plasma

	ATV		p-OH-ATV		o-OH-ATV		ATV-LAC		p-OH ATV-LAC		o-OH ATV-LAC	
Precisão e Exatidão												
Intra-corrida (n=5)	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
LIQ – 0,025	5,82	4,16	8,78	5,76	6,95	4,24	7,32	2,64	3,36	7,52	3,29	5,28
CQB – 0,05	8,82	-4,12	10,44	-4,32	11,36	-2,16	1,93	0,64	6,25	4,32	7,25	-8,24
CQM – 100	2,09	6,97	1,51	8,15	3,18	10,03	5,15	8,26	3,24	3,06	4,57	9,42
CQA – 160	2,63	11,80	4,35	2,89	3,83	11,27	4,30	7,09	5,46	3,16	1,72	5,80
CQD – 400*	1,82	4,03	1,02	9,44	3,99	8,47	2,17	1,22	2,89	-0,09	4,09	3,28
Intercorridas (n=15)	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
LIQ – 0,025	4,22	6,72	5,43	9,31	6,81	-3,36	2,01	4,08	2,27	10,29	3,11	5,33
CQB – 0,05	4,76	-6,12	8,29	0,72	1,75	-3,57	4,79	-0,12	4,46	4,55	1,18	-7,25
CQM – 100	2,45	9,74	1,25	7,82	1,58	8,95	1,92	5,99	3,37	7,19	4,39	4,95
CQA – 160	1,78	6,10	1,38	4,23	4,97	4,45	3,03	7,91	2,62	6,38	0,80	4,86
CQD – 400*	2,36	13,30	3,11	11,92	3,26	8,53	1,81	2,47	2,93	2,24	1,72	3,50
Estabilidade pós processamento (15 h a 10°C; n= 5)												
	CV (%)	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
CQB – 0,05	10,71	3,44	10,54	1,68	9,35	1,44	5,46	1,68	5,12	1,20	6,76	4,52
CQA – 160	5,24	0,62	8,47	-6,29	12,01	-1,22	7,94	2,45	9,40	-0,75	6,48	-4,94
Estabilidade curta duração (4 h a 4°C; n= 5)												
	CV (%)	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
CQB – 0,05	8,66	10,96	7,36	-1,00	5,30	-8,20	10,37	5,20	8,36	-8,08	10,12	-3,36
CQA – 160	2,92	-1,62	4,84	-6,26	6,28	0,01	5,83	0,83	5,72	-4,38	2,58	-2,72
Estabilidade 3 Ciclos de descongelamento (-80 a 4°C; n= 5)												
	CV (%)	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
CQB – 0,05	9,41	1,32	5,86	-7,56	9,57	3,32	4,60	-12,20	12,40	-7,32	8,32	-8,40
CQA – 160	5,62	10,01	6,84	8,27	5,68	11,22	8,05	-6,25	6,38	-1,56	5,22	-9,18

ATV: atorvastatina, p-OH-ATV: para-hidroxi atorvastatina, o-OH-ATV: orto-hidroxi atorvastatina, ATV-LAC: atorvastatina lactona, p-OH-ATV-LAC: para-hidroxi atorvastatina lactona, o-OH-ATV-LAC: orto-hidroxi atorvastatina lactona. CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal] * 100. CQ: controles de qualidade, LIQ: limite inferior de quantificação do método**,** 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 (*CQ diluído em plasma na proporção de 1:5).

A Figura 7 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo da ATV e metabólitos em uma paciente com LES que recebeu dose única oral de 20 mg de ATV.

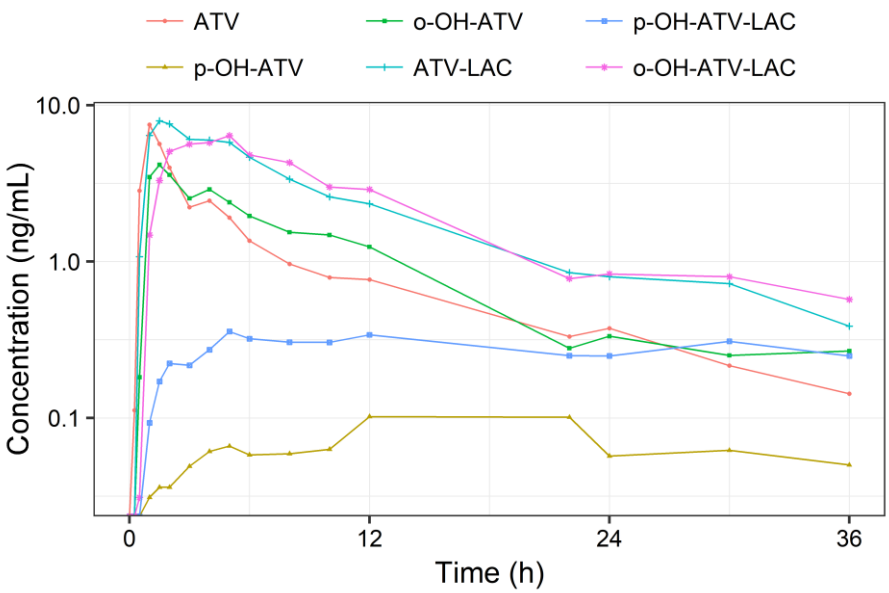


Figura 7: Curvas concentrações plasmáticas *vs* tempo da ATV e metabólitos para uma paciente com LES que recebeu dose única oral de 20 mg de ATV.

A Tabela 5 apresenta a disposição cinética da ATV e dos metabólitos (p e o-OH-ATV, ATV-LAC, p e o-OH-ATV-LAC) para uma paciente com LES após administração de dose única oral de 20 mg de ATV.

Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos da ATV em uma paciente com LES após administração de dose única oral de 20 mg de ATV

Parâmetro	ATV	p-OH-ATV	o-OH-ATV	ATV-LAC	p-OH-ATV-LAC	o-OH-ATV-LAC
C_{max} (ng/mL)	7,51	0,10	4,15	7,95	0,36	6,39
t_{max} (h)	1,00	12,00	1,50	1,50	5,00	5,00
AUC^{0-36h} (ng.h/mL)	32,60	2,54	36,12	77,79	9,98	77,63
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	35,50	-	39,24	82,23	-	85,15
$AUC_{metabólito}/AUC_{inalterado}$	-	0,08	1,19	2,35	0,31	2,57
$t_{1/2}$ (h)	10,42	19,29	8,08	7,98	91,51	9,14
CL/F (L/h)	562,50	-	-	-	-	-
Vd/F (L)	5894,70	-	-	-	-	-
Fração livre (%)	9,66	-	-	-	-	-

AUC: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo, C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, CL/F: clearance total aparente, Vd/F: volume de distribuição aparente, - Não determinado

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na validação do método de análise da concentração livre da ATV em plasma.

Tabela 6: Parâmetros de validação do método de análise da concentração livre da atorvastatina em plasma

	ATV	
Efeito Matriz		
FMN médio (CV%)	12,66	
Linearidade (ng/mL)		
Intervalo (ng/mL)	0,00625 - 25	
Equação da reta	5,5898 x + 0,0084	
r^2	0,9923	
Teste de ligação inespecífica (NSB) (EPR%; n=5)		
CQB – 0,00125 ng/mL	-12,90	
CQA - 20 ng/mL	-14,90	
Precisão e Exatidão		
Intra-corrida (n=5)	**CV (%)**	**EPR (%)**
LIQ – 0,00625 ng/mL	6,56	6,00
CQB – 0,00125 ng/mL	7,53	-4,80
CQM - 10 ng/mL	2,78	0,85
CQA - 20 ng/mL	12,46	4,70
Intercorridas (n=15)	**CV (%)**	**EPR (%)**
LIQ – 0,00625 ng/mL	4,34	2,36
CQB – 0,00125 ng/mL	6,81	-0,38
CQM - 10 ng/mL	1,11	2,13
CQA - 20 ng/mL	3,38	2,71
Estabilidade pós processamento (24 h a 10°C; n= 5)		
	CV (%)	**EPR (%)**
CQB – 0,0125 ng/mL	9,09	-4,27
CQA - 20 ng/mL	5,38	1,96
Estabilidade curta duração (4 h a 4°C; n= 5)		
	CV (%)	**EPR (%)**
CQB – 0,0125 ng/mL	9,83	-6,08
CQA - 20 ng/mL	5,26	1,96

ATV: atorvastatina. FMN: fator de matriz normalizado por padrão interno, CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal] * 100**.** LIQ: limite inferior de quantificação do método**,** CQB: controle de qualidade de baixa concentração**,** CQM: controle de qualidade de média concentração**,** CQA: controle de qualidade de alta concentração.

I.1.5 DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I.2 ANÁLISE DA GFZ EM PLASMA

I.2.1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

I.2.2 OBJETIVOS

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

I.2.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

I.2.3.1 Soluções padrão e reagentes

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

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

I.2.3.2 Análise Cromatográfica

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

forno de coluna TCM/CHM® e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S® equipado com interface por eletronebulização (ESI) Zspray™, todos Waters (Milford, CT, EUA). A separação foi realizada na coluna ACQUITY UPLC®BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm**,** Waters, Irlanda) mantida na temperatura de 45°C, e fase móvel constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,01% e acetonitrila (40:60, v/v) na vazão de 0,4 mL/min. As análises foram executadas no modo ionização negativo. A voltagem do capilar foi de 1,88 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 1200 L/h e o argônio foi utilizado como gás de colisão na vazão de 0,20 mL/min. A Tabela 7 detalha as energias do cone e de colisão do composto de interesse e do PI, bem como a monitorização das suas moléculas protonadas $[M + H]^+$ e seus respectivos produtos. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão dos analitos na concentração de 100 ng/mL de acetonitrila. As análises foram executadas no modo MRM. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

Tabela 7: Compostos analisados e suas transições, energia do cone e energia de colisão

Composto	Transição (m/z)	Energia do cone (V)	Energia de colisão (eV)
Genfibrozila	249,2 → 121,1	25	13
Fuvastatina (PI)	410,2 → 348,2	25	15

I.2.3.3 Preparo das amostras

Alíquotas de 25 µL de plasma foram enriquecidas com 25 µL da solução de PI e precipitadas com 525 µL de acetonitrila. Os tubos foram agitados (Phoenix Luferco, modelo AP56, Araraquara, SP, Brasil) durante 10 segundos e centrifugados a 4°C por 5 minutos a 21500 g (centrífuga refrigerada Hitachi, modelo CT 15RE, Hitachinaka - Ibaraki, Japão). A seguir, alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes foram adicionadas de 200 µL de água, agitadas durante 5 segundos e 3 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

I.2.3.4 Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com as recomendações da resolução para métodos bioanalíticos vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, Resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012). As amostras de plasma branco de voluntários sadios não tratados com GFZ foram obtidas no Hemocentro do hospital local.

As curvas de calibração foram preparadas em triplicata empregando alíquotas de 25 µL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de GFZ e 25 µL da solução de PI, incluindo amostra branco e amostra zero. As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL de plasma. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das áreas dos picos plotadas em função das respectivas concentrações utilizando a ponderação $1/x^2$. As curvas de calibração foram consideradas aprovadas quando os desvios de, no mínimo 75% dos padrões de calibração, foram menores ou iguais a 20% para o limite inferior de quantificação (LIQ) e 15% para os demais padrões.

As amostras de CQ foram preparadas em plasma branco, de acordo com as concentrações especificadas na Tabela 8, para o LIQ, CQB, CQM, CQA e de diluição CQD, sendo todas armazenadas a -80 °C.

Tabela 8: Concentrações plasmáticas de genfibrozila nos controles de qualidade utilizados na validação do método analítico

Controle de qualidade	genfibrozila (µg/mL)
LIQ	0,01
CQB	0,025
CQM	50
CQA	80
CQD*	200

* As replicatas de CQD foram diluídas em plasma branco na proporção de 1:5, imediatamente antes do procedimento de preparo da amostra.

O ensaio de seletividade foi determinado empregando alíquotas de 25 µL de plasma branco de 8 diferentes fontes, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os cromatogramas obtidos foram comparados com as amostras de LIQ.

Para a avaliação do efeito residual, foram analisadas injeções da amostra branco antes e após a injeção da amostra do LSQ. O cromatograma da amostra

branco obtido após a injeção do LSQ foi comparado com o cromatograma da amostra do LIQ. O efeito residual foi considerado ausente quando as áreas dos picos interferentes eluídos no tempo de retenção dos analitos foram menores que 20% da área do LIQ da genfibrozila e menores que 5% da área do PI.

O efeito matriz foi avaliado empregando 8 alíquotas de 25 µL de plasma branco obtidas de diferentes fontes, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os extratos de plasma branco obtidos foram enriquecidos com soluções padrão nas concentrações de CQB e CQA. Também foram analisadas as mesmas soluções padrão em acetonitrila adicionadas de PI. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN). O efeito matriz foi avaliado pelo CV de todos os FMN obtidos e deve ser inferior a 15%.

Para a avaliação da precisão e exatidão foram preparadas quintuplicatas do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD analisadas em uma única corrida analítica (intracorrida) e em 3 corridas distintas (intercorridas), em dias consecutivos.

A exatidão intracorrida e intercorrida é expressa pelo EPR definido pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e o valor nominal (concentração teórica correspondente). O método foi considerado exato para valores de EPR dentro da faixa de ± 20% para as amostras de LIQ e ± 15% para os demais CQ.

Os resultados da precisão intracorrida e intercorrida foram apresentados como CV. O método foi considerado preciso para os valores de CV dentro da faixa de ± 20% para as amostras de LIQ e ± 15% para os demais CQ.

Os estudos de estabilidade (curta duração, pós processamento e ciclos de descongelamento) foram avaliados utilizando amostras de controles de qualidade nas concentrações de CQB e CQA e analisadas em quintuplicatas. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras de plasma foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) por 4 h e, posteriormente, processadas e analisadas. Para a estabilidade pós-processamento, as amostras foram mantidas no autoinjetor a 10°C durante 24 h antes de serem injetadas. Para a estabilidade de ciclos de descongelamento, as amostras foram congeladas a -80°C por 24 h e, posteriormente, foram descongeladas e novamente congeladas por 24 h. Esse ciclo foi repetido por mais duas vezes antes do procedimento de preparo e análise.

As concentrações obtidas após os ensaios de estabilidade foram comparadas com as obtidas das mesmas amostras recém preparadas e os resultados foram

apresentados como CV e EPR. As amostras foram consideradas estáveis para valores de CV e EPR dentro da faixa de ± 15 %.

I.2.3.5 Casuística e protocolo clínico

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP (anexo B). Foi investigada uma voluntária sadia, que após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi tratada com GFZ 600 mg/12h por 6 dias. No sexto dia, a voluntária sadia foi internada na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP/USP durante o período do estudo. As amostras seriadas de sangue foram colhidas em tubos contendo fluoreto de sódio, no intervalo de dose de 0-12 h, nos tempos 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12 h para a análise da GFZ.

I.2.3.6 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos da GFZ foram calculados no intervalo de dose de 12 h com base nas curvas de concentração plasmática total *versus* tempo. Foi empregado o modelo não compartimental utilizando o programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.4 (PharsightCorp., Mountain View, Califórnia, EUA).

I.2.4 RESULTADOS

A Figura 8 apresenta os espectros de massas das moléculas protonadas e seus respectivos produtos da GFZ e do PI Fluvastatina, respectivamente monitorados nas transições de 249,2 > 121,1 *m/z* e 410,2 > 348,2 *m/z*. Os íons produtos foram selecionados com base na intensidade do sinal.

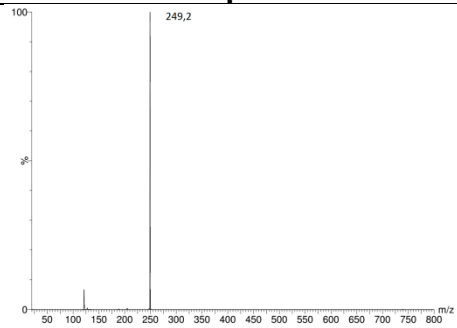
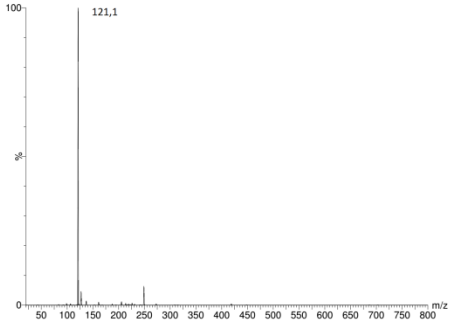
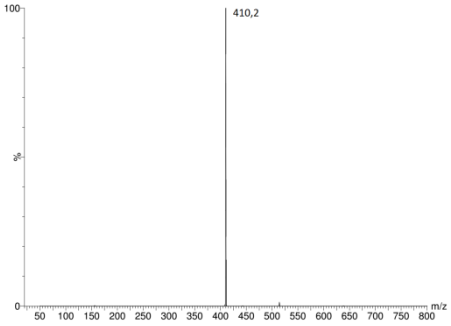
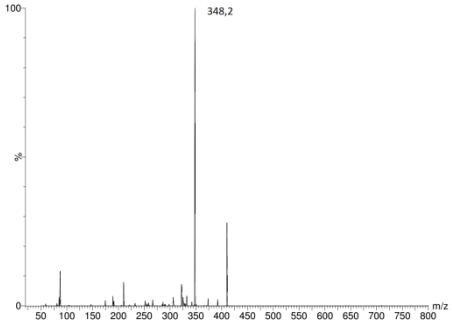
Composto	Molécula protonada	Íons Produto
genfibrozila		
fluvastatina		

Figura 8: Espectro de massas das moléculas protonadas e seus respectivos produtos para a genfibrozila e fluvastatina.

A Figura 9 apresenta os cromatogramas referentes à análise de plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração de 0,01 μg/mL de plasma (limite inferior de quantificação) e amostra de voluntária sadia coletada no estado de equilibrio após administração de doses múltiplas orais de 600 mg de GFZ a cada12 h.

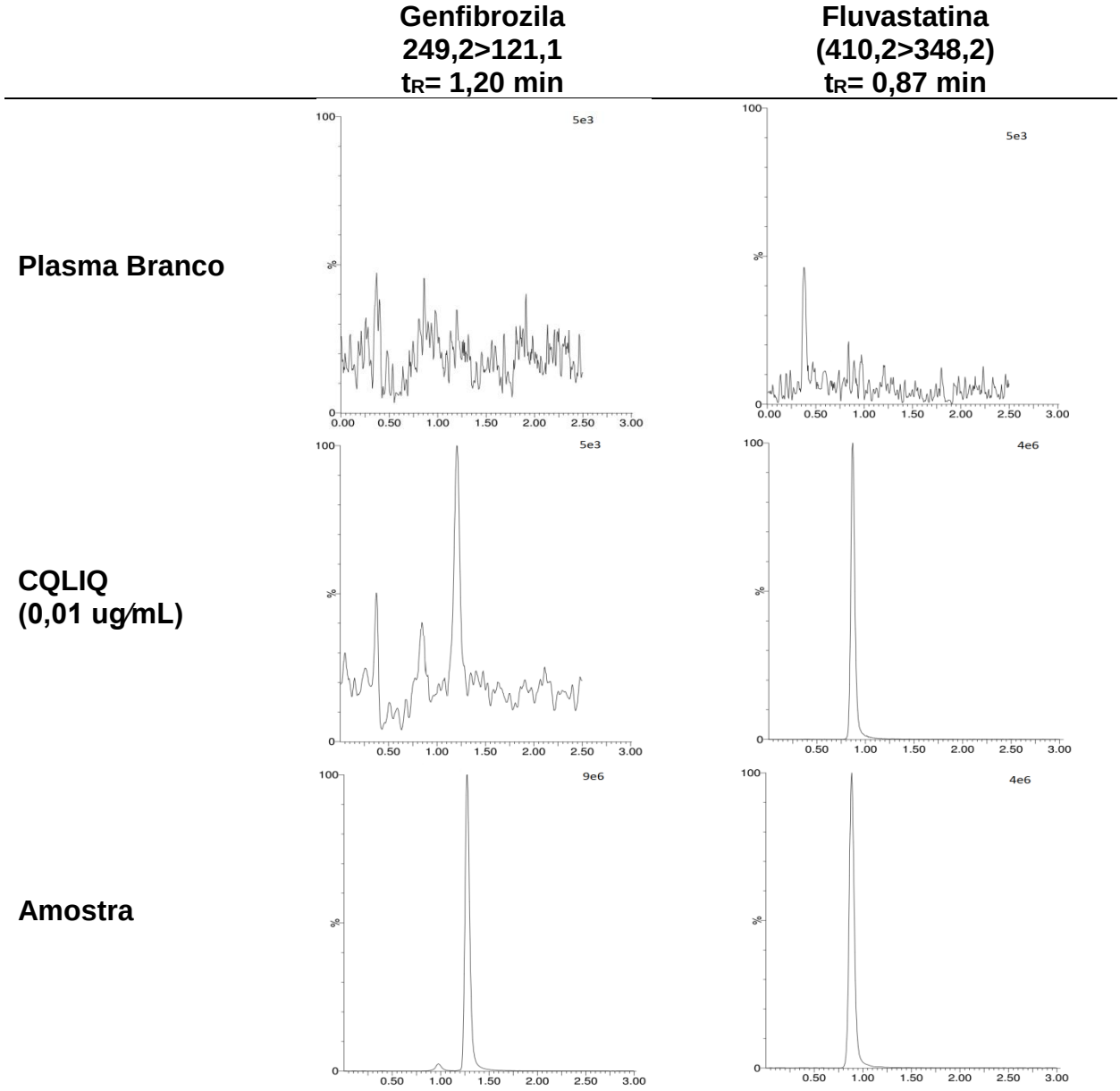


Figura 9: Cromatogramas referentes à análise do plasma branco, amostra de controle de qualidade na concentração de 0,01 μg/mL de plasma (limite inferior de quantificação) e amostra de voluntária sadia coletada no sexto dia após administração de doses múltiplas orais de 600 mg de genfibrozila a cada12 h.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos na validação do método de análise da GFZ em plasma.

Tabela 9: Parâmetros de validação do método de análise da genfibrozila em plasma

Efeito Matriz		
FMN médio (CV%)	13,90	
Linearidade		
Intervalo (μg/mL)	0,01 - 100	
Equação da reta	0,0733 x + 0,0003	
r^2	0,9981	
Precisão e Exatidão		
Intra-corrida (n=5)	**CV (%)**	**EPR (%)**
LIQ – 0,01 μg/mL	5,60	8,67
CQB – 0,025 μg/mL	7,60	-8,86
CQM - 50 μg/mL	3,70	0,60
CQA - 80 μg/mL	4,87	-5,93
CQD - 200 μg/mL (1:5*)	6,11	-3,55
Precisão intercorridas (CV%) (n=15)		
Intercorridas (n=15)	**CV (%)**	**EPR (%)**
LIQ – 0,001 μg/mL	6,30	10,44
CQB – 0,025 μg/mL	4,70	-12,44
CQM - 50 μg/mL	8,72	-8,35
CQA - 80 μg/mL	5,88	-5,56
CQD - 200 μg/mL (1:5*)	5,75	-4,48
Estabilidade pós processamento – (24 h a 10°C; n= 5)		
	CV (%)	**EPR (%)**
CQB – 0,025 μg/mL	2,94	14,64
CQA - 80 μg/mL	4,57	12,62
Estabilidade curta duração – (4 h a 25°C; n= 5)		
	CV (%)	**EPR (%)**
CQB – 0,025 μg/mL	5,92	6,00
CQA - 80 μg/mL	4,11	-13,25
Estabilidade 3 Ciclos de descongelamento (-80 a 25°C) (EPR%) (n= 5)		
	CV (%)	**EPR (%)**
CQB – 0,025 μg/mL	5,95	-6,20
CQA - 80 μg/mL	3,93	-11,67

FMN: fator de matriz normalizado por padrão interno, CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal] * 100**.** LIQ: limite inferior de quantificação do método**,** 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 (*CQ diluído em plasma na proporção de 1:5).

A Figura 10 apresenta as concentrações plasmáticas de GFZ obtidas no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h, após doses múltiplas orais de 600 mg de GFZ a cada12 h.

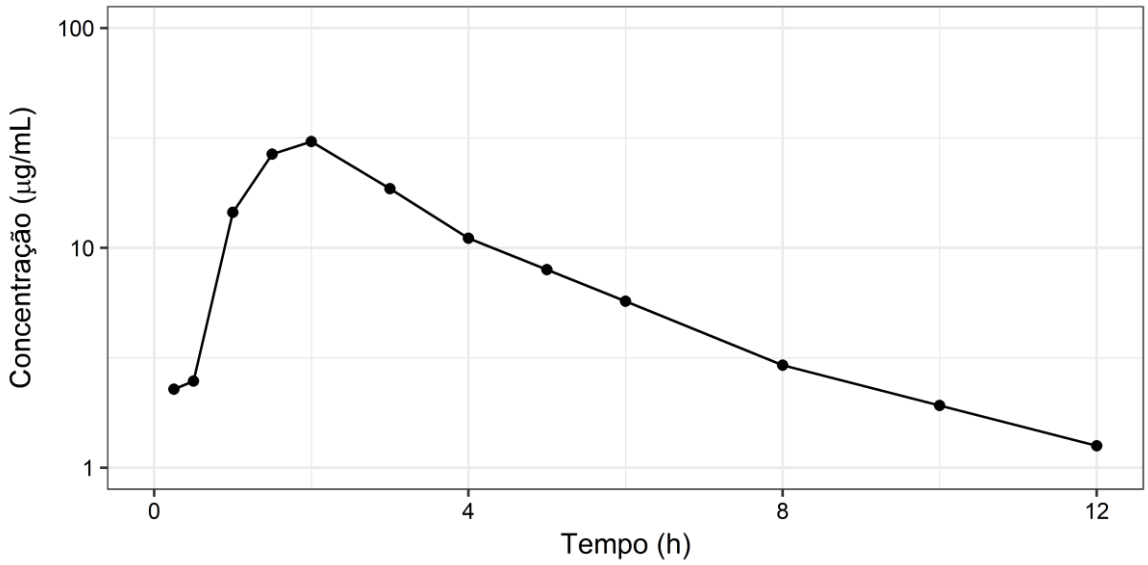


Figura 10: Concentrações plasmáticas de GFZ (genfibrozila), obtidas no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h, após a administração de doses múltiplas orais de GFZ (600 mg/12 h) a uma voluntária sadia.

A Tabela 10 apresenta a disposição cinética da GFZ no estado de equilíbrio para uma voluntária sadia tratada com doses múltiplas orais de 600 mg de GFZ a cada12 h.

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos da genfibrozila para uma voluntária sadia tratada com doses múltiplas orais (600 mg/12 h).

Parâmetro	**genfibrozila**
AUC^{0-12h} (μg.h/mL)	102,41
C^{ss} (μg/mL)	8,53
C_{min} (μg/mL)	1,26
C_{max} (μg/mL)	30,42
t_{max} (h)	2,0
$t_{1/2}$ (h)	3,28
CL/F (L/h)	5,86
Vd/F (L)	27,75

AUC^{0-12h}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo no intervalo de dose de 12 h, C^{ss}: concentração plasmática média no estado de equilíbrio, C_{min} concentração plasmática minima, C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir a C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, CL/F: clearance total aparente, Vd/F: volume de distribuição aparente.

I.2.5 DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

plasma.

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

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

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

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

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

I.3 ANÁLISE DO MVA EM PLASMA

I.3.1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

I.3.2 OBJETIVOS

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

I.3.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

I.3.3.1 Soluções padrão e reagentes

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

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

200; 100; 50; 25; 8; 2; 1 e 0,5 ng/mL. A solução de MVA foi diluída na concentração de 40; 25 e 0,25 ng/mL plasma. A solução de PI foi diluída para 20 ng/mL em água a partir da solução estoque. O metanol (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), o acetato de etila (Mallinckrodt, Paris, KY, EUA) e o formiato de amônio (99%, Sigma-Aldrich) foram grau cromatografia. O ácido fórmico (90,1 %, J. T. Baker), o ácido clorídrico (37,8%, J. T. Baker) e o fosfato de potássio dibásico anidro (98%, Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil) foram grau PA. A água utilizada foi obtida no sistema de purificação Milli Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA). Considerando que o MVA é um composto endógeno, todo o material utilizado para o preparo das soluções foi lavado com água/metanol (80:20, v/v). O armazenamento das soluções padrão e o preparo das amostras foram realizados empregando material descartável.

I.3.3.2 Análise Cromatográfica

A análise do MVA na forma de MVL foi realizada por UPLC-MS/MS constituído por bomba quaternária ACQUITY UPLC® H-Class, injetor automático ACQUITY UPLC® Sample Manager – FTN equipado com organizador de amostras ACQUITY Sample Organizer, forno de coluna TCM/CHM® e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S® equipado com interface por eletronebulização (ESI) Zspray™, todos Waters (Milford, CT, EUA). A separação da MVL e do PI foi realizada na coluna Acquity UPLC® HSS-T3 (1,8 µm, 2,1 x 100 mm, Waters), mantida na temperatura de 35°C, e fase móvel constituída por mistura de formiato de amônio 10 mM em solução aquosa de ácido fórmico 0,2% e ácido fórmico 0,2% em metanol (90:10, v/v) na vazão de 0,2 mL/min. As análises foram executadas no modo ionização positiva. A voltagem do capilar foi de 3,50 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 pressão de 7,0 bar. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na vazão de 0,20 mL/min. A energia de colisão foi de 8 e 9 eV para a MVL e o PI, respectivamente, e a voltagem do cone foi mantida em 20 V para ambos os analitos. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão dos analitos na concentração de 100 ng/mL de água. As análises foram executadas no modo MRM. As moléculas protonadas e seus respectivos produtos foram monitorados nas transições 131,0>69,2 e 134,0>72,0 para a MVL e o PI, respectivamente. A aquisição de dados e a quantificação das amostras

foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

I.3.3.3 Preparo das amostras

Alíquotas de 100 µL de plasma foram acrescidas de 25 µL da solução de PI, 200 µL de ácido clorídrico 0,1 M e agitadas durante 5 seg. Após repouso de 30 min em temperatura ambiente, as amostras foram acrescidas de 1 mL de acetato de etila e submetidas à agitação vigorosa durante 1h e, em seguida, foram centrifugadas a 4°C, 21500 g por 10 minutos (centrífuga Himac CT15RE, Hitachinaka, Ibaraki, Japão). As fases orgânicas (800 µL) obtidas foram evaporadas à secura e retomadas em 150 uL de fase móvel e 15 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

I.3.3.4 Validação do método

O método foi validado de acordo com a Resolução ANVISA RDC n.27 de 17 de maio de 2012 para validação de métodos bioanalíticos. Considerando a indisponibilidade de matrizes biológicas isentas de MVA (Seção IX), os ensaios de curva de calibração, exatidão e efeito residual foram realizados empregando solução aquosa de fosfato de potássio dibásico 0,1 M (SF) e os ensaios de precisão e estabilidade foram realizados em fontes distintas de plasma (contendo um nível basal de MVL).

O ensaio de seletividade foi realizado a partir de curvas de calibração preparadas em seis fontes distintas de plasma e seis curvas de calibração preparadas em SF. As inclinações obtidas nas curvas de calibração foram comparadas empregando o teste t não pareado com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 5.01). O método foi considerado seletivo quando os valores das inclinações das curvas em plasma e em SF não mostraram diferenças significativas ($p \geq 0,05$).

As curvas de calibração foram realizadas em triplicatas utilizando alíquotas de 100 µL de SF enriquecidas com 25 µL da solução padrão de MVL e 25 µL da solução de PI. As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 2; 6,25; 12,5; 25 e 50 ng/mL de SF. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das áreas dos picos plotadas em função das respectivas concentrações utilizando a ponderação $1/x^2$. As curvas de calibração foram consideradas aprovadas quando os desvios de, no mínimo 75% dos padrões

de calibração, foram menores ou iguais a 20% para o LIQ e 15% para os demais padrões.

O efeito residual foi realizado utilizando três amostras processadas de SF branco (não acrescidas de padrão de MVL e de PI) injetadas uma antes e duas após a injeção de uma amostra processada do limite superior de quantificação (LSQ; 50 ng/mL de SF). Os resultados foram comparados com três amostras processadas do LIQ (0,125 ng/mL de SF). O efeito residual foi considerado ausente quando as áreas dos picos interferentes eluídos no tempo de retenção dos analitos foram menores que 20% da área do LIQ da MVL e menores que 5% da área do PI.

A avaliação do efeito matriz foi realizada empregando 8 fontes distintas de plasma, obtidos de voluntários sadios não tratados com medicamentos, sendo 6 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Cada amostra de plasma foi submetida ao procedimento de extração descrito anteriormente (Item I.3.3.3). Alíquotas de solução padrão de MVL (50 ng/mL em SF) foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas (10 μL/min) e os plasmas processados foram injetados no sistema cromatográfico simultaneamente. A intensidade do sinal foi observada ao longo do tempo do ensaio. O efeito matriz foi considerado ausente quando não se observou nenhum aumento ou redução da resposta nos canais de transição de massas monitorados para a MVL e o PI no tempo de retenção de interesse.

Para a avaliação da exatidão foram preparadas amostras de CQ nas concentrações de 0,125; 0,25; 25 e 40 ng/mL de SF (LIQ, CQB, CQM e CQA, respectivamente). O CQD foi preparado em amostra de plasma, com concentração de MVL previamente determinada (1,56 ng/mL), adicionando solução padrão de MVL até atingir a concentração de 100 ng/mL. As replicatas de CQD foram diluídas em SF na proporção de 1:10, imediatamente antes do procedimento de preparo da amostra.

As amostras de CQ foram analisadas em quintuplicatas empregando uma única corrida analítica (exatidão intracorrida) e três corridas diferentes (exatidão intercorridas). Os resultados foram apresentados como EPR. O método foi considerado exato para valores de EPR dentro da faixa de ± 20% para as amostras do LIQ e ± 15% para os demais CQ.

A precisão foi avaliada em amostras de plasma de seis voluntários diferentes analisadas em quintuplicatas, empregando uma única corrida analítica (precisão intracorrida) e três corridas diferentes (precisão intercorridas). Os resultados foram

apresentados como CV. O método foi considerado preciso para os valores de CV dentro da faixa de ± 20% para as amostras do LIQ e ± 15% para os demais CQ.

Os estudos de estabilidade (curta duração, pós processamento e ciclos de descongelamento) foram avaliados utilizando amostras de plasma obtidas de três voluntários diferentes e analisadas em quintuplicatas. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras de plasma foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) por 6 h e, posteriormente, processadas e analisadas. Para a estabilidade pós-processamento, as amostras foram mantidas no autoinjetor a 10°C durante 36 h antes de serem injetadas. Para a estabilidade de ciclos de descongelamento, as amostras foram congeladas a -80°C por 24 h e, posteriormente, foram descongeladas e novamente congeladas por 24 h. Esse ciclo foi repetido por mais duas vezes antes do procedimento de preparo e análise.

As concentrações obtidas após os ensaios de estabilidade foram comparadas com as obtidas das mesmas amostras recém preparadas e os resultados foram apresentados como CV e EPR. As amostras foram consideradas estáveis para valores de CV e EPR dentro da faixa de ± 15%.

A avaliação da porcentagem de formação de MVL a partir do MVA foi realizada através da análise de amostras do padrão de MVA preparadas nas concentrações de 0,25; 25 e 40 ng/mL de SF. Alíquotas (n=8) de 100 μL de cada solução foram submetidas ao mesmo processo de preparo das amostras e foram analisadas em três corridas analíticas distintas. As porcentagens de formação da MVL a partir do MVA foram determinadas a partir da equação:

% MVL = {(Concentração da solução de MVA x 130^a)/148^b} x 100, onde a é o peso molecular da MVL e b é o peso molecular do MVA. Os resultados da porcentagem de formação foram apresentados como CV e EPR e os valores foram considerados adequados dentro da faixa de ± 15%.

I.3.3.5 Casuística e protocolo clínico

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP (anexo B). Foram investigadas uma voluntária sadia e uma paciente com LES, no estado basal e após a administração de dose única oral de 40 mg de ATV. A paciente com LES foi selecionada nos ambulatórios da Divisão de Imunologia Clínica do

HCFMRP/USP, enquanto a voluntária sadia foi selecionada na comunidade USP. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as participantes foram internadas na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP/USP.

As amostras seriadas de sangue durante 24 h foram colhidas nas fases basal (antes da administração de ATV) e após a administração de dose única oral de 40 mg de ATV. As amostras foram colhidas em tubos contendo EDTA, nos tempos 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 22 e 24 h.

I.3.3.6 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos da MVL foram calculados com base nas curvas de concentrações plasmáticas total *versus* tempo. Foi empregado o modelo não compartimental utilizando o programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.4 (PharsightCorp., Mountain View, Califórnia, EUA).

I.3.4 RESULTADOS

As Figuras 11 e 12 apresentam os espectros de massas das moléculas protonadas e seus respectivos produtos obtidos para a MVL e o PI, respectivamente. A Figura 13 apresenta os cromatogramas referentes à análise do branco de solução fosfato de potássio dibásico 0,1 M (SF), padrão de MVL na concentração de 0,25 ng/mL de SF, amostra de controle de qualidade da MVL em plasma na concentração de 1,80 ng/mL plasma (CQ de plasma com valor pré-determinado) e amostra de uma voluntária sadia coletada no primeiro dia de internação, sem a administração de ATV (níveis basais).

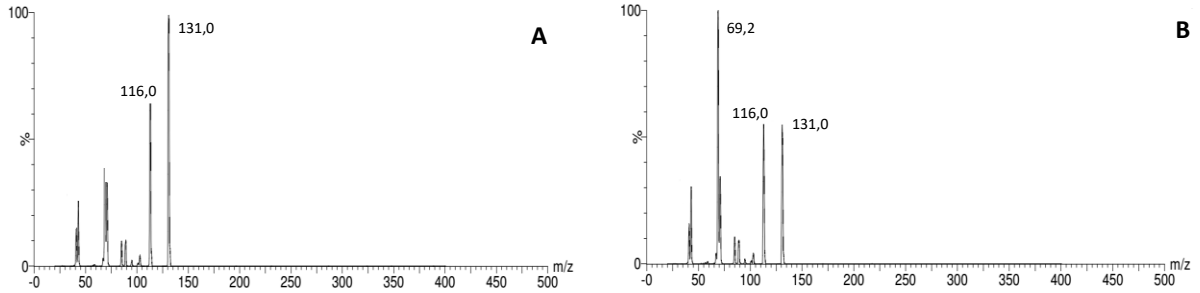


Figura 11: Espectro de massas da molécula protonada (A) e do íon produto (B) da mevalonolactona (transição 131,0 > 69,2).

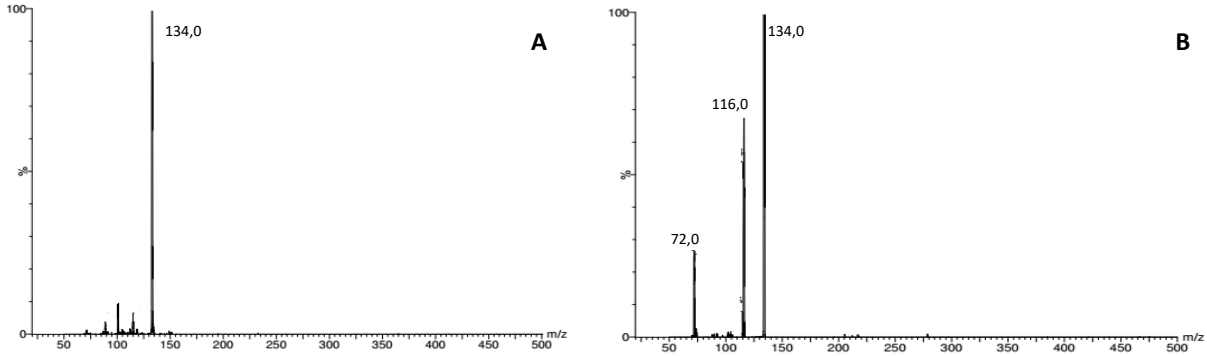


Figura 12: Espectro de massas da molécula protonada (A) e do íon produto (B) da mevalonolactona-D3 (transição 134,0 > 72,0).

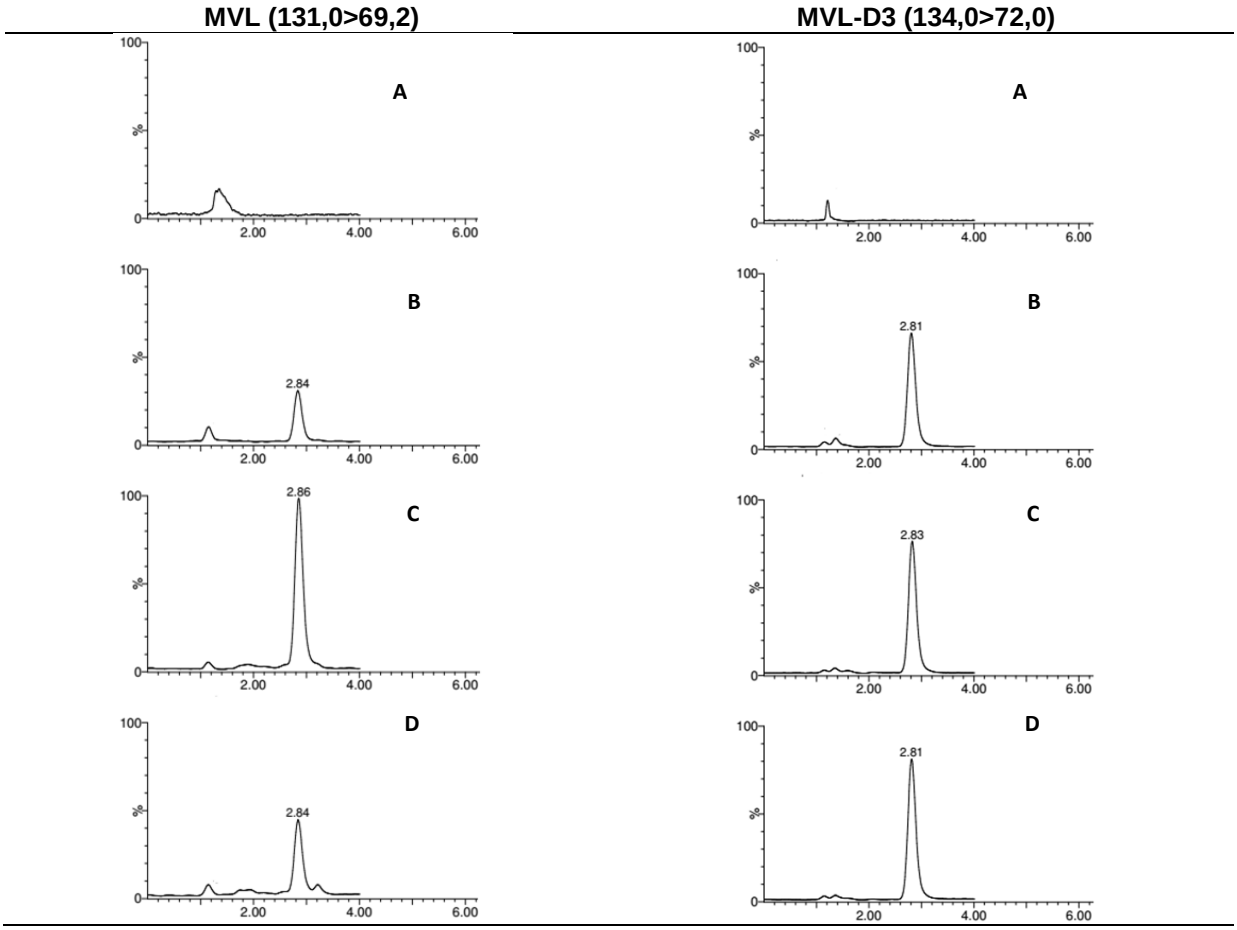


Figura 13: Cromatogramas referentes à análise da mevalonolactona (MVL) e do padrão interno MVL-D3 (20 ng/mL de água). A- Branco de solução fosfato de potássio dibásico 0,1 M (SF); B- Padrão MVL 0,25 ng/mL de SF+PI; C- CQ MVL 1,80 ng/mL de plasma+PI; D-Amostra de voluntária sadia coletada no primeiro dia de internação, sem a administração de ATV (níveis basais) +PI. Escala: MVL $6{,}8 \times 10^4$ e PI $5{,}0 \times 10^5$.

As Tabelas 11 e 12 apresentam a comparação das inclinações das curvas de calibração obtidas em plasma e em SF e os resultados obtidos na validação do método de análise da MVL em plasma, respectivamente.

Tabela 11: Análise estatística das inclinações das curvas de calibração da mevalonolactona obtidas em plasma e em solução de fostato de potássio dibásico 0,1M (SF)

Amostra (SF ou Plasma)	**Inclinação da curva de calibração**	
	SF	**Plasma**
1	0,0988560	0,0974721
2	0,1037620	0,0967013
3	0,0984505	0,1003120
4	0,0932570	0,0951739
5	0,0973834	0,0948167
6	0,0959609	0,0948058
Mediana	**0,09792**	**0,09594**
Média	**0,09794**	**0,09655**
IC 95%	**0,09427 - 0,1016**	**0,09430 - 0,09880**
p*	**0,4233**	

* Teste t não pareado

Tabela 12: Parâmetros de validação do método de análise da mevalonolactona em plasma e em solução fosfato de potássio dibásico 0,1 M (SF)

Linearidade em SF		
Intervalo	**Equação da reta**	**r^2**
0,125 - 50 ng/mL	y = 0,109308 x + 0,019932	0,994929

Precisão e Exatidão em SF				
CQ (ng/mL)	**Precisão (CV%)**		**Exatidão (EPR%)**	
	Intracorrida (n = 6)	**Intercorridas (n = 18)**	**Intracorrida (n = 6)**	**Intercorridas (n = 18)**
0,125	12,84	12,63	-13,20	-3,25
0,25	10,81	8,67	-0,15	0,27
25	4,36	3,97	-2,71	-2,76
40	2,19	2,82	2,68	2,38
100*	4,73	5,16	-8,11	-8,95

Precisão em plasma				
Plasma	**Intracorrida**		**Intercorridas**	
	Média (ng/mL) n = 6	**CV (%)**	**Média (ng/mL) n = 18**	**CV (%)**
1	2,32	2,60	2,61	10,88
2	3,61	4,67	3,98	11,69
3	2,42	3,90	2,58	10,55
4	3,09	3,81	3,22	8,96
5	1,56	2,46	1,68	9,85
6	3,19	0,83	3,28	6,86

Estabilidade em plasma							
Plasma	**Recém preparado**	**Pós processamento (36 h, 10ºC)**		**Curta Duração (6 h, 25ºC)**		**3 Ciclos de descongelamento (-80 a 25ºC)**	
	Média (ng/mL) n = 6	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
1	2,61	1,58	-0,73	1,88	13,65	2,28	5,38
2	3,98	2,52	-3,90	1,84	11,52	0,60	5,30
3	1,68	1,35	-2,92	6,64	10,98	2,64	5,59

*CQ preparado em plasma e diluído em SF na proporção de 1:10

A Figura 14 apresenta a avaliação do efeito matriz. Os cromatogramas referentes à amostra de plasma injetada no sistema cromatográfico foram analisados simultaneamente com as soluções padrão de MVL e MVL-D3 50 ng/mL SF infundidas diretamente no espectrômetro de massas.

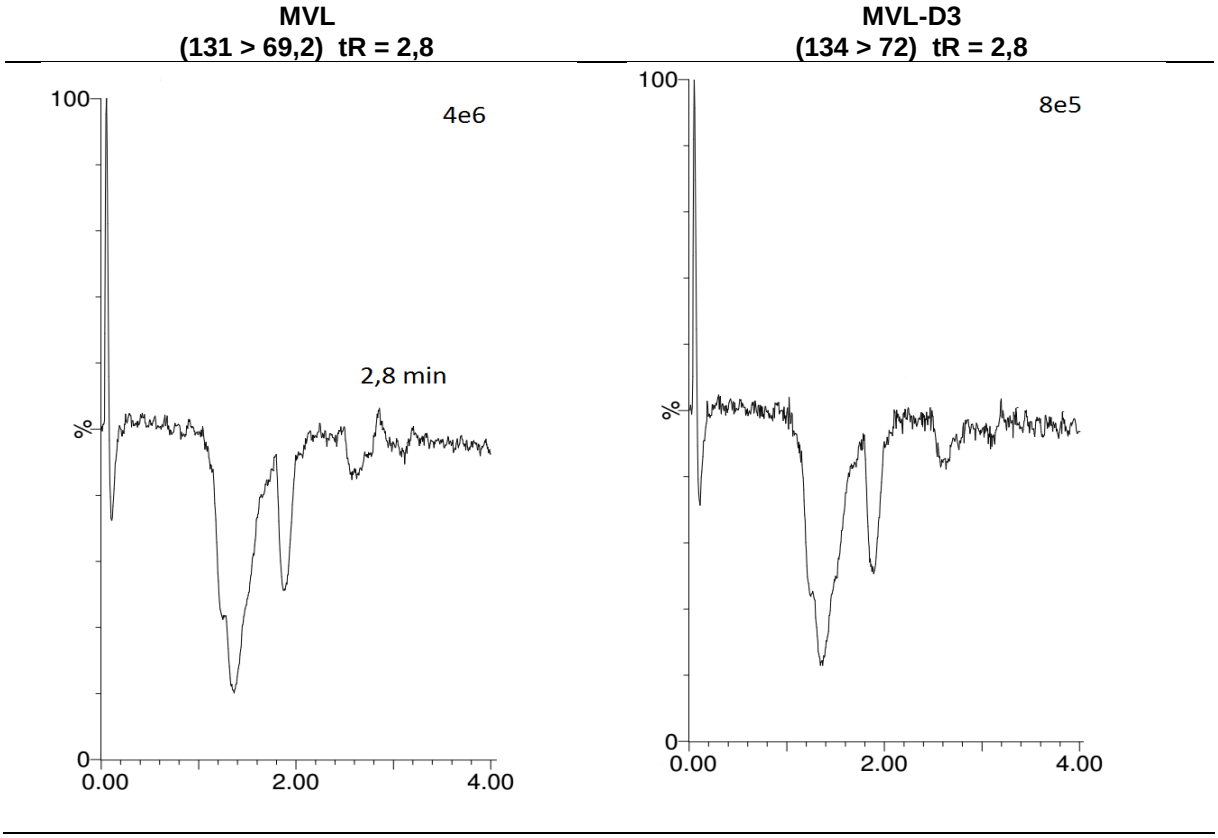


Figura 14: Avaliação do efeito matriz. Os cromatogramas referentes à amostra de plasma injetada no sistema cromatográfico foram analisados simultaneamente com as soluções padrão de mevalonolactona (MVL, 50 ng/mL de tampão fosfato) e mevalonolactona deuterada (MVL-D3 50 ng/mL de metanol) infundidas diretamente no espectrômetro de massas.

A Tabela 13 apresenta a porcentagem de formação da MVL a partir do MVA obtidas em SF.

Tabela 13: Porcentagem de formação da MVL a partir do MVA

MVA (ng/mL)	**0,25**		**25**		**40**	
	CV (%)	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
Precisão e Exatidão Intra-corrida (n=8)	1,24	13,87	4,24	14,15	6,09	12,10
% Formação de MVL	113,87		114,15		112,10	
	CV (%)	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**	**CV (%)**	**EPR (%)**
Precisão e Extatidão Intercorridas (n=24)	5,30	10,57	3,45	14,00	5,25	11,97
% Formação de MVL	110,57		114,00		111,97	

CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/concentração média experimental)]*100, EPR: erro padrão relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal] * 100**.**

A Figura 15 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo da MVL para uma paciente com LES e uma voluntária sadia no primeiro dia de internação, sem a administração de ATV, e no segundo dia de internação, imediatamente antes e até 24 h após a administração de dose única oral de 40 mg de ATV.

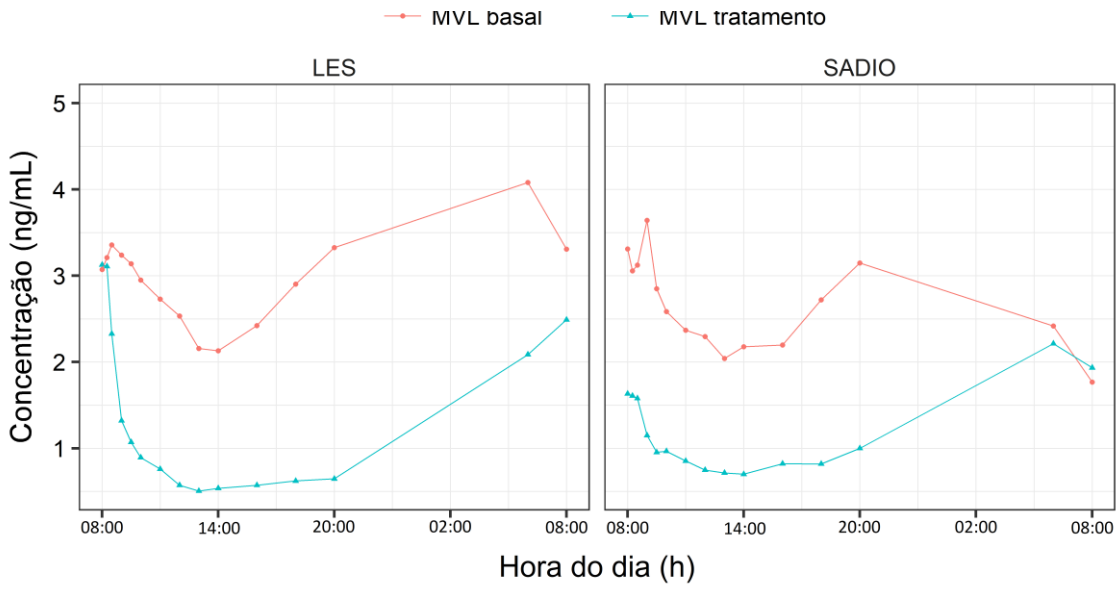


Figura 15: Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo da MVL para uma paciente com LES e uma voluntária sadia no primeiro dia de internação, sem a administração de ATV (MVL basal) e no segundo dia de internação, imediatamente antes e até 24 h após a administração de dose única oral de 40 mg de ATV (MVL tratamento com ATV).

A Tabela 14 apresenta a disposição cinética da MVL para uma paciente com LES e uma voluntária sadia nas fases basal e tratamento com dose única oral de ATV.

Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos da MVL nas fases basal e tratamento com dose única oral de 40 mg de ATV. Dados individuais de uma paciente com LES e uma voluntária sadia

Voluntária sadia	**MVL basal**	**MVL tratamento**
AUC^{0-24h} (ng.h/mL)	62,49	30,83
AUC^{0-6h} (ng.h/mL)	15,33	5,64
C_{min} (ng/mL)	2,04	0,70
Paciente com LES	**MVL basal**	**MVL tratamento**
AUC^{0-24h} (ng.h/mL)	76,87	27,82
AUC^{0-6h} (ng.h/mL)	16,33	6,01
C_{min} (ng/mL)	2,13	0,51

MVL: mevalonolactona. AUC: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo no intervalo de 0-24 h e 0-6 h, C_{min}: concentração plasmática minima.

I.3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta o desenvolvimento e a validação do método de análise do MVA em plasma, na forma de MVL, empregando UPLC-MS/MS, o qual foi aplicado em estudos de exposição sistêmica em uma voluntária sadia e em uma paciente com LES, nas fases basal e após tratamento com dose única oral de 40 mg de ATV.

Poucos estudos da literatura descrevem a análise do MVA em plasma empregando LC-MS/MS com eletronebulização no modo positivo (MVL 131>69 ou MVL ligada ao aduto de amônio 148>70) ou no modo negativo (MVA 147>59) (ABRAR; MARTIN, 2002; DAS; PAL, 2014; JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003; KINDT; SZEKELY-KLEPSER; FOUNTAIN, 2011; SAINI et al., 2006; WALDRON; WEBSTER, 2011). O principal método de preparo de amostra é a extração em fase sólida, pois somente Kindt, Szekely-Klepser e Fountain (2011) utilizam procedimento de extração com acetato de etila em meio ácido.

No método apresentado nesse estudo, a análise do MVA foi realizada no modo eletronebulização positivo, monitorando o íon da MVL e utilizando a MVL-D3 como PI

(Figuras 11 e 12, respectivamente). O uso do padrão interno deuterado é fundamental para a análise da MVL em plasma, visto que o MVA é um composto endógeno e existe em equilíbrio com a sua forma lactona (MVL). A conversão de MVA para MVL é necessária para produzir um composto mais lipofílico, o qual poderia ser extraído do plasma mais facilmente e cromatografado por HPLC. No presente estudo, as amostras de plasma foram acidificadas com ácido clorídrico e mantidas em repouso durante 30 min para converter o MVA em MVL (ABRAR; MARTIN, 2002; JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003; KINDT; SZEKELY-KLEPSER; FOUNTAIN, 2011; RODRIGUES et al., 2014; SAINI et al., 2006; WALDRON; WEBSTER, 2011).

A avaliação da porcentagem de formação de MVL a partir do MVA resultou em 100% de conversão (Tabela 13), indicando que o método apresentado pelo presente estudo foi adequado para a análise de MVL em amostras de plasma humano. Não há dados na literatura que relata um valor de referência para a conversão de MVL a partir de MVA. No entanto, quanto mais próximo de 100%, mais confiável será o método analitico. No estudo realizado por Rodrigues et al. (2014), a porcentagem de conversão foi de apenas 70%.

O preparo das amostras de plasma foi desenvolvido de acordo com o estudo de Kindt, Szekely-Klepser e Fountain (2011), com algumas alterações. A separação cromatográfica foi realizada na coluna HSS-T3 (1,8 µm, 2,1 x 100 mm) com fase móvel constituída por formiato de amônio 10 mM e metanol, contendo ácido fórmico 0,2%, com tempo de análise de 4 minutos (Figura 13). O método foi validado de acordo com a Seção IX da resolução RDC n.27 (ANVISA, 2012), considerando que o MVA é uma molécula endógena.

As inclinações das curvas realizadas em seis fontes distintas de plasma e em solução de fosfato de potássio dibásico (SF) não apresentaram diferenças significantes (p= 0,4233; Tabela 11), assim utilizamos SF para o preparo das curvas de calibração e dos controles de qualidade utilizados nos ensaios de exatidão intra e inter-corridas e efeito residual. Os estudos de precisão intra e inter-corridas e estabilidade foram realizados em amostras de plasma de fontes distintas (Tabela 12). A linearidade obtida foi de 0,125 a 50 ng/mL de SF empregando alíquotas de 100 µL de plama. O LIQ de 0,125 ng de MVL/mL de plasma pode ser considerado o mais sensível da literatura, uma vez que o valor mais próximo de LIQ de 0,25 ng/mL foi apresentado por Kindt, Szekely-Klepser e Fountain (2011), empregando alíquotas de

50 µL de plasma. Os demais estudos apresentaram valores de LIQ entre 0,2 e 50 ng/mL utilizando alíquotas de plasma entre 200 e 500 µL.

Os estudos de exatidão em SF apresentam valores de EPR menores que 14% e os estudos de precisão realizados em plasma apresentam valores de CV menores que 12%, indicando o método como preciso e exato (Tabela 12). Não foram observados aumento ou redução da resposta nos canais de transição de massas monitorados para a MVL e o PI no tempo de retenção de interesse, dessa forma pode-se dizer que o método não apresenta efeito da matriz (Figura 14). Não foi observado efeito residual após a injeção de padrões processados na concentração de 50 ng/mL de SF (cromatogramas não apresentados). A comparação das amostras de plasma recém preparadas com aquelas submetidas a três ciclos de descongelamento (-80 a 25ºC), estocagem à 25ºC durante 6 h e estocagem à 10ºC durante 36 h apresentou valores de EPR abaixo de 14%, garantindo a estabilidade das amostras (Tabela 12).

O método foi aplicado inicialmente na análise de amostras de plasma de uma voluntária sadia e uma paciente com LES com a finalidade de avaliar as concentrações plasmáticas basais de MVL durante 24 h. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que as concentrações plasmáticas de MVL exibem rítmo circadiano, com observação das menores concentrações plasmáticas em torno das 14:00 h. Vários estudos anteriores indicam que a biossíntese do colesterol exibe variação diurna com queda na velocidade de síntese durante o dia e velocidade máxima de síntese durante a noite, com picos de concentração plasmática de MVL ocorrendo entre 24:00 e 04:00 h. Vários fatores dietéticos influenciam as taxas de biossíntese do colesterol em humanos, incluindo o teor de colesterol da dieta e a freqüência das refeições (PAPPU; ILLINGWORTH, 1994; PARKER et al., 1984).

As concentrações plasmáticas de ácido mevalônico estão correlacionadas com a atividade da HMG-CoA redutase hepática, ou seja, a redução na atividade da HMG CoA redutase no fígado, reduz a biossíntese do colesterol (PAPPU; ILLINGWORTH, 1994; PARKER et al., 1984). Assim, a administração de dose única de 40 mg de ATV reduziu a exposição sistêmica da MVL (AUC^{0-24h}) em 50 a 60% (Tabela 14). Waldron e Webster (2011) reportam redução de 49% nas concentrações plasmáticas de MVL (amostras coletadas aleatoriamente em função do tempo) em pacientes com hipercolesterolemia tratados com atorvastatina, rosuvastatina ou sinvastatina durante 3 meses.

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

I.4 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO II

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

II.1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.2 OBJETIVOS

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

Os objetivos específicos são:

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

II.3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

II.3.1 Casuística

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (anexo A) e do HCFMRP/USP (anexo B), respectivamente, nos dias 19 de outubro de 2015 e 11 de janeiro de 2016. A seleção das pacientes com LES foi realizada no HCFMRP/USP, nos ambulatórios da Divisão de Imunologia Clínica. Foram incluídas no estudo pacientes com LES, classificadas de acordo com a atividade da doença (SLEDAI - *Systemic Lúpus Erythematosus Disease Activity*) com escores de 0-105. O primeiro perfil avaliado corresponde a pacientes com LES não controlado, com escores SLEDAI de 6-10 (doença com atividade moderada) e 11-19 (doença com alta atividade) e com evidências clínicas e laboratoriais de inflamação. O segundo perfil avaliado corresponde a pacientes com LES controlado, com escores SLEDAI de 0 (doença sem atividade) e de 1-5 (doença com atividade leve), sem doença renal ativa e sem evidências clínicas e laboratoriais de inflamação (GRIFFITHS; MOSCA; GORDON, 2005; MOSCA; BOMBARDIERI, 2006; PETRI et al., 1991). As pacientes com LES estavam em tratamento com prednisona, cloroquina ou hidroxicloroquina e imunossupressor (azatioprina, micofenolato de mofetila ou ciclofosfamida). Estes medicamentos não são inibidores do transportador OATP1B1 (KARLGREN et al., 2012).

O diagnóstico do LES é realizado com base nos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia (Tabela 15) (TAN et al., 1982), em que a presença de no mínimo 4 critérios, seriadamente ou simultaneamente, durante qualquer intervalo de observação, caracteriza a presença da doença. A atividade da doença é avaliada com base no escore SLEDAI (Tabela 16), o qual integra exames clínicos e laboratoriais (hemograma, urina rotina, dosagem sérica de complemento, título sérico de anticorpo anti-DNA, entre outros).

Tabela 15: Critérios para diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico (LES), propostos em 1982 pelo *American College of Rheumatology* e modificados em 1997.

DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
Eritema malar	Eritema fixo, plano ou elevado sobre as eminências malares, com tendência a poupar os sulcos nasolabiais.
Lesão discoide	Lesão eritematosa infiltrada com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
Fotossensibilidade	Rash cutâneo resultado de uma reação incomum de exposição à luz solar, observada pelo médico ou relatada pelo paciente.
Úlceras orais	Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente indolor, observada pelo médico.
Artrite	Artrite não-erosiva acometendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor e edema ou derrame articular.
Serosite	Pleurite: história convincente de dor pleurítica ou atrito pleural auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural; ou Pericardite: documentada por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico.
Comprometimento renal	Proteinúria persistente (acima de 0,5 g/24 h ou mais de + + + se não houver quantificação nas 24 h) ou cilindúria.
Comprometimento neurológico	Convulsão ou psicose na ausência de medicamentos ou distúrbios metabólicos causadores.
Distúrbios hematológicos	Anemia hemolítica com reticulose; ou Leucopenia <4.000/mm3 em pelo menos duas ocasiões; ou Linfopenia <1.500/mm3 em pelo menos duas ocasiões; ou Trombocitopenia <100.000/mm3 na ausência de medicamentos causadores.
Distúrbios imunológicos	Presença de anti-DNA nativo; ou Presença de anti-SM; ou Presença de anticorpo anti-fosfolípide baseado em a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina, b) teste positivo para anticoagulante lúpico ou c) teste falso-positivo para sífilis por no mínimo 6 meses.
Anticorpos antinucleares	Título anormal de anticorpo antinuclear (FAN) por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Tabela 16: SLEDAI (*Systemic Lúpus Erythematosus Disease Activity*) com escores de 0-105

FATOR DE PONDERAÇÃO	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	Instalação recente excluindo causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8	Psicose	Alteração da função mental normal devido a alterações graves da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, associações livres, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento marcadamente ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluir uremia e causas farmacológicas/drogas
8	Síndrome organo-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo obnubilação da consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de manter a atenção ao ambiente envolvente, mais pelo menos duas das seguintes: distúrbios da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou decréscimo da atividade psicomotora. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológicas/drogas
8	Distúrbios visuais	Alterações da retina ligados ao LES, incluindo corpos coroideus, hemorragias retinianas, exsudado seroso ou hemorragia no coroide ou neurite óptica. Excluir causas como hipertensão, infecções ou farmacológicas/drogas
8	Distúrbios nos pares cranianos	Instalação recente de neuropatia sensitiva ou motora atingindo os pares cranianos
8	Cefaleia lúpica	Cefaleia grave, persistente; pode ser tipo migranoso mas deve ser resistente à terapêutica narcótica
8	AVC	Instalação recente de AVC. Excluir arteriosclerose
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungeal, hemorragias sub-ungueais**,** ou biópsia ou angiograma compativeis com vasculite
4	Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais inflamatórios
4	Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal, associado com elevação da Creatina-quinase/aldolase ou eletromiografia ou biópsia compatível com miosite
4	Cilindros urinários	Cilindros de eritrócitos ou granulosos
4	Hematúria	> 5 células por campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
4	Proteinúria	> 0,5g/24h. Instalação recente ou aumento > 0,5g/24h
4	Piúria	> 5 leucócitos por campo. Excluir infecção
2	Novo *rash*	Instalação recente ou recorrência de *rash* tipo inflamatório.
2	Alopécia	Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo
2	Ulcerações mucosas	Instalação recente ou recorrência de ulcerações nasais ou orais
2	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural, derrame ou espessamento pleural
2	Pericardite	Dor pericárdica mais pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame, ou confirmação eletrocardiográfica ou por ecocardiograma
2	Hipocomplementemia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2	Aumento do DNA	Aumento dos títulos ou positivação
1	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm^3
1	Leucopenia	<3.000 leucócitos/mm^3; excluir causas farmacológicas
1	Febre	>38^0 C; excluir causa infecciosa

Também foram incluídas no estudo voluntárias sadias recrutadas da comunidade do campus da USP de Ribeirão Preto e sem vínculo com os responsáveis pela pesquisa.

As participantes do estudo foram somente do sexo feminino, com idade entre 18 e 59 anos, índice de massa corporal (IMC) menor que 34,9 kg/m^2, foram fenotipadas para o CYP3A4 hepático e intestinal empregando o midazolam oral como fármaco marcador.

Foram excluídas todas as participantes em uso de indutores ou inibidores potentes da BCRP, MDR1, OATP1B1 ou CYP3A4. As pacientes com história de doença pulmonar obstrutiva crônica grave também foram excluídas do estudo devido ao risco de apneia pelo midazolam.

O cálculo do tamanho amostral foi obtido utilizando o programa *Power and Sample Calculation* versão 3.0.43 (DUPONT; PLUMMER, 1990, 1998), empregando os dados de área sob a curva concentração plasmática versus tempo (AUC - média ± desvio padrão: 64,0 ± 21,3 ng.h/mL) da ATV obtidos na investigação de voluntários sadios que receberam dose única de 40 mg de ATV (BACKMAN et al., 2005). O cálculo do tamanho amostral foi obtido considerando uma diferença de pelo menos 40% entre os valores de AUC da ATV entre os grupos investigados, com nível de significância fixado em 5% e poder do teste em 80%. Os dados apresentados na Figura 16 mostram que é necessário a inclusão de pelo menos 12 voluntárias sadias e 12 pacientes com LES.

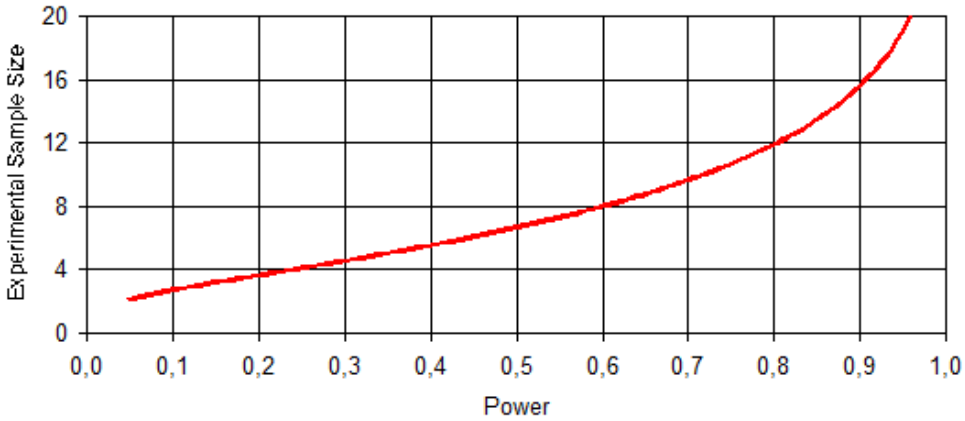


Figura 16: Gráfico ilustrativo do cálculo do tamanho da amostra (n) com nível de significância fixado em 5% e poder do teste em 80%, *Power and Sample Calculation*.

II.3.2 Protocolo clínico

O estudo foi dividido em três grupos, o grupo de voluntárias sadias (n=15), grupo de pacientes com LES controlado (SLEDAI 0-4; n=13) e o grupo de pacientes com LES não controlado (SLEDAI 6-15; n=15). As voluntárias sadias e as pacientes com LES incluídas no estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram internadas na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP.

O estudo foi desenvolvido de acordo com a descrição apresentada nos itens Pré-estudo, Fase I e Fase II (Figura 17). Considerando que a variação da farmacodinâmica é realizada com base na quantificação das concentrações plasmáticas de MVA, as participantes tiveram restrição de dieta com gordura durante o período de internação nas duas fases do estudo.

Na Fase Pré-estudo, todas as participantes foram submetidas a exames clínicos e laboratoriais para a avaliação hepática (TGP/ALT, TGO/AST, γ-GT, bilirrubina total e frações e fosfatase alcalina), renal (uréia e creatinina), metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL e glicemia de jejum), dosagem de proteínas séricas totais, albumina, α-1 glicoproteína ácida e hematológica (hemograma e leucograma). Em seguida, foram coletados 2 mL de sangue, em tubos contendo EDTA, para a realização da avaliação das citocinas plasmáticas.

No primeiro dia da internação, as participantes foram avaliadas quanto a atividade *in vivo* do CYP3A4. No período da manhã, todas as participantes receberam dose única oral de 7,5 mg de midazolam (Dormonid®, Roche) com 200 mL de água. As amostras de 4 mL de sangue foram colhidas em tubos contendo heparina, nos tempos 0; 0,25; 0,5, 1, 2, 3, 4 e 6 h após a administração do fármaco.

Simultaneamente, as participantes foram investigadas quanto aos níveis basais e ritmo circadiano das concentrações plasmáticas de MVA. Amostras seriadas de 3 mL de sangue, colhidas em tubos contendo EDTA, foram coletadas nos tempos zero, 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 22 e 24 h, simulando os mesmos tempos de coleta para a análise das concentrações plasmáticas de ATV. Após a centrifugação das amostras de sangue, os plasmas foram separados e mantidos a -80°C até a realização das análises.

Na FASE I, no segundo dia de internação, as participantes foram separadas em três grupos (Tabela 17), em estudo randomizado, onde receberam dose única de 20, 40 ou 80 mg de atorvastatina cálcica (ATV, Lipitor®, Pfizer) com 200 mL de água.

As amostras seriadas de 5 mL de sangue foram colhidas em tubos contendo fluoreto de sódio (inibidor de esterase) para garantir a estabilidade da ATV e seus metabólitos no armazenamento a longo prazo (MACWAN et al., 2011). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos imediatamente antes e 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 22; 24; 30 e 36 h após a administração de ATV, para a determinação das concentrações plasmáticas da ATV e seus metabólitos e MVA.

Na FASE II, as participantes foram tratadas com genfibrozila (GFZ, Lopid®, Pfizer, cápulas de 600 mg, 12/12h) durante cinco dias. No sexto dia, elas foram internadas para a administração de dose única de ATV (20, 40 ou 80 mg, cada participante recebeu a mesma dose administrada na fase I) e coleta das amostras seriadas de 5 mL de sangue, colhidas em tubos de fluoreto de sódio, nos tempos imediatamente antes e 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 22; 24; 30 e 36 h após a administração da ATV para a determinação das concentrações plasmáticas da ATV e seus metabólitos, MVA e GFZ. A administração de GFZ foi continuada durante as 36 h de coleta das amostras de sangue.

Tabela 17: Número de pacientes com LES controlado, LES não controlado e voluntárias sadias que receberam a dose de 80, 40 ou 20 mg de ATV em estudo randomizado

Dose ATV (mg)	Voluntárias sadias	LES controlado	LES não controlado
80	5	5	4
40	5	5	3
20	5	3	5

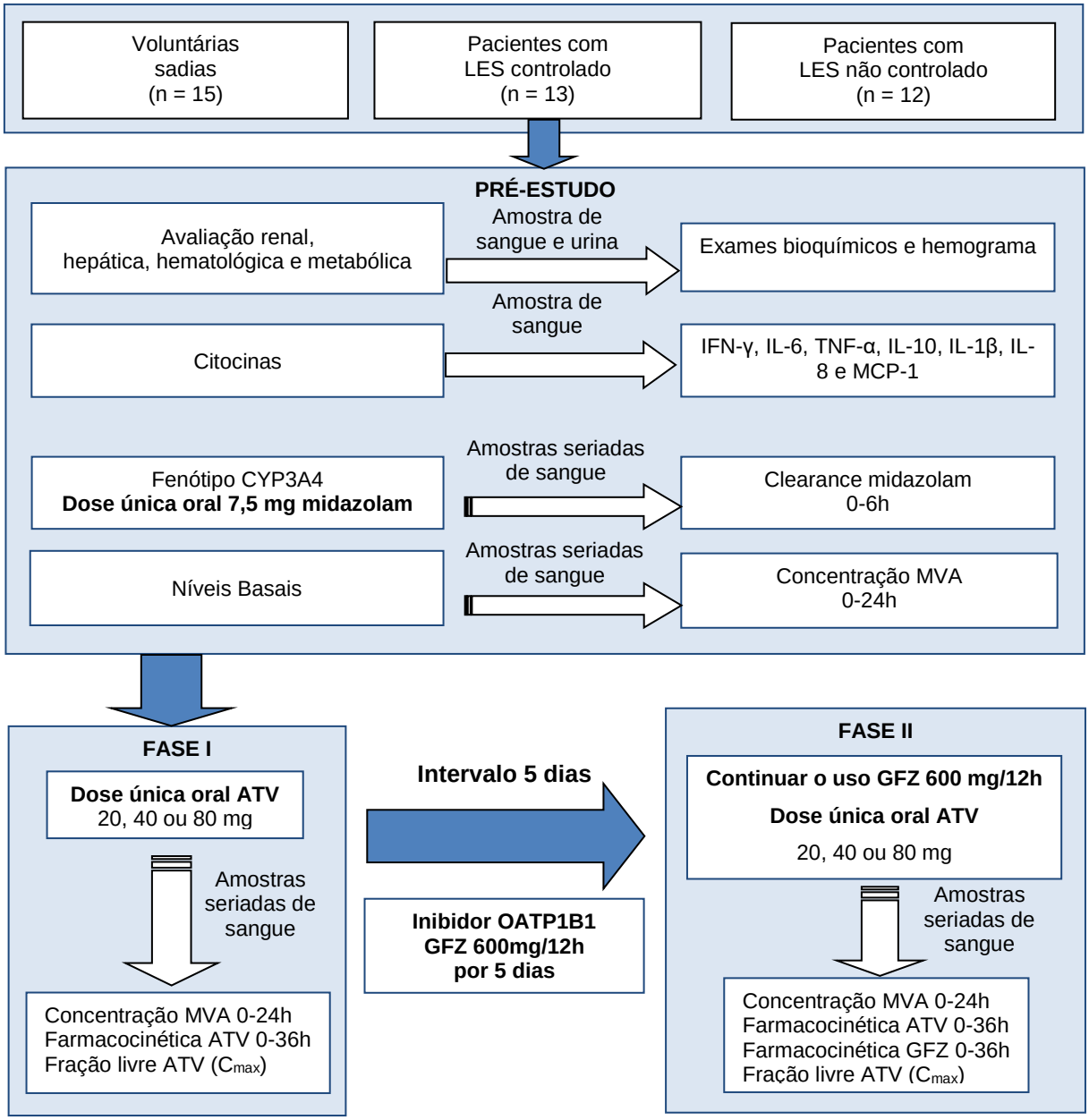


Figura 17: Protocolo clínico com inclusão de 13 pacientes com LES controlado, 12 pacientes com LES não controlado e 15 voluntárias sadias. Ácido mevalônico (MVA), Atorvastatina (ATV) e Genfibrozila (GFZ).

II.3.3 Métodos analíticos

Os métodos de análise da ATV e seus cinco metabólitos em plasma como concentração total, ATV em plasma como concentração livre, GFZ em plasma e MVA em plasma foram desenvolvidos e validados como descritos no Capítulo I.

A analise do midazolam em plasma foi realizada por LC-MS/MS, de acordo com estudo anterior do grupo reportado por Jabor et al. (2005). Alíquotas de 0,5 mL plasma foram acrescidas de 25 μL da solução do padrão interno (clobazam 0,1 μg/mL

metanol), alcalinizadas com 50 μL de solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 M e extraídas com 2 mL de tolueno:álcool isoamílico (100:1 v/v). A extração foi realizada através de agitação horizontal, seguida de centrifugação a 2000 g por 5 minutos, separação da fase orgânica e evaporação até a secura. Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel constituída por mistura de acetonitrila:acetato de amônio 10 mmol/L (50:50 v/v). Os analitos foram resolvidos na coluna de fase reversa Purospher RP 18-e, (5 µm, 150 x 4,6 mm), pré-coluna LiChrospher 100 RP 18-e (5 µm, 4 x 4 mm), ambas da Merck (Darmstadt, Alemanha) e detectadas pelo espectrômetro de massas Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Waters, Milford, Massachusetts, EUA), com interface por eletronebulização, operando no modo ionização positivo. As curvas de calibração foram construídas no intervalo de concentração plasmáticas de 0,2-100 ng/mL plasma. Os coeficientes de variação e os erros padrão relativos foram menores que 15% nos estudos de precisao e exatidão.

As citocinas IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-10, IL-1β, IL-8 e MCP-1 (ASANUMA et al., 2006; MCCARTHY et al., 2014; PERANDINI et al., 2014) foram quantificadas em plasma empregando a citometria de fluxo com o uso do kit Milliplex MAP® Human Cytokine/Chemokine, Magnetic Bead Panel Immunoassay, Luminex Corporation.

II.3.4 Análise farmacocinética

II.3.4.1 Análise farmacocinética da ATV e seus metabólitos

Os parâmetros farmacocinéticos da ATV e metabólitos foram calculados com base nas curvas de concentrações plasmáticas totais *versus* tempo. Foi empregado o modelo bicompartimental (modelo 12) para a ATV e modelo não compartimental para os metabólitos, utilizando o programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.4 (PharsightCorp., Mountain View, Califórnia, EUA).

A concentração plasmatica máxima observada (C_{max}) da ATV e o tempo para atingir a C_{max} (t_{max}) foram obtidos por inspeção visual dos dados experimentais.

A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) da ATV foi calculada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada (36 h) e extrapolada para o infinito, dividindo-se a última concentração quantificada (36 h) pela constante da velocidade de eliminação (β) ($AUC^{0-\infty}$).

O clearance total aparente da ATV (CL/F) foi obtido através da equação abaixo, onde F é a biodisponibilidade.

$$Cl/F = \frac{Dose}{AUC^{0-\infty}}$$

O volume de distribuição aparente (Vd/F) foi calculado pela equação padrão do software e refere-se a soma dos volumes de distribuição dos compartimentos 1 e 2 (GABRIELSSON, 2016).

A concentração livre da ATV no plasma foi avaliada no tempo de observação da concentração plasmática máxima total (C_{max}). A fração livre no plasma (f_u) foi determinada conforme a equação:

$$\mathrm{f_u} = \frac{\text{concentração livre no plasma}}{\text{concentração total no plasma}}$$

A AUC dos metabólitos p-OH-ATV e p-OH-ATV-LAC foram calculadas pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada ($AUC^{0\text{-}36h}$) e para os metabólitos o-OH-ATV, ATV-LAC e o-OH-ATV-LAC foram calculadas do tempo zero e extrapolada ao infinito ($AUC^{0\text{-}\infty}$).

A C_{max} e o t_{max} dos metabólitos foram obtidos por inspeção visual dos dados experimentais.

II.3.4.2 Análise farmacocinética da GFZ

Os parâmetros farmacocinéticos da GFZ foram calculados no intervalo de dose de 12 h com base nas curvas de concentrações plasmáticas totais *versus* tempo. Foi empregado o modelo não compartimental utilizando o programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.4 (PharsightCorp., Mountain View, Califórnia, EUA).

A C_{max}, o t_{max} e a concentração plasmática mínima (C_{min}) foram obtidos por inspeção visual dos dados experimentais. A AUC foi calculada no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h, pelo método linear trapezoidal. A concentração plasmática média no estado de equilíbrio (C_{SS}) foi calculada dividindo a $AUC^{0\text{-}12h}$ por τ, onde τ é o intervalo de dose (12h).

II.3.4.3 Análise farmacocinética do MVA

Os parâmetros farmacocinéticos do MVA foram calculados com base nas curvas de concentrações plasmáticas totais *versus* tempo. Foi empregado o modelo não compartimental utilizando o programa Phoenix® WinNonlin®, versão 6.4 (PharsightCorp., Mountain View, Califórnia, EUA).

A C_{min} foi obtida por inspeção visual dos dados experimentais. A AUC foi calculada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada (24 h, AUC^{0-24h}) e do tempo zero até a amostra coletada após 6 h (AUC^{0-6h}).

II.3.5 Avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A4 empregando midazolam como fármaco marcador

Para a determinação da atividade *in vivo* do CYP3A4 foi calculado o clearance total aparente do midazolam com base nas curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo, empregando o programa WinNonlin. A AUC foi calculada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada (360 minutos) e extrapolada para o infinito, dividindo-se a última concentração quantificada (360 minutos) pela constante da velocidade de eliminação (k_{el}). O clearance total aparente (CL/F) foi obtido através da equação CL/F = Dose/ $AUC^{0-\infty}$.

Os valores de clearance total aparente do midazolam de 10-40 mL/min/Kg designam atividade normal do CYP3A4 (LAMBA et al., 2002).

II.3.6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do programa GraphPadInstat® para obtenção da média e intervalo de confiança 95% (IC 95%). A comparação entre os grupos foi realizada empregando ANOVA com Tukey *Honest Significant Differences* (HSD) com nível de significância de 5%. A comparação entre as fases, dentro do mesmo grupo, foi realizada com teste t de Student e significância de 5%.

II.4 RESULTADOS

II.4.1 Dados clínicos e demográficos

Foram investigadas voluntárias sadias (n=15), recrutadas da comunidade do campus da USP de Ribeirão Preto e pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12), selecionadas nos Ambulatórios da Divisão de Imunologia Clínica do HCFMRP/USP. As características antropométricas de todas as participantes do estudo estão apresentadas na Tabela 18 como média e IC 95%. Os dados individuais estão apresentados no Apêndice A.

Tabela 18: Características antropométricas das voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média e IC 95%

	Voluntárias sadias	**LES controlado**	**LES não controlado**
Idade (anos)	32,87 27,39 – 38,34	36,23 29,54 – 42,92	36,92 30,27 – 43,57
Peso (Kg)	68,98 63,25 – 74,71	72,08 64,73 – 79,42	69,65 60,03 – 79,27
Altura (m)	1,64 1,60 – 1,67	1,62 1,58 – 1,67	1,59 1,54 – 1,65
IMC (Kg/m^2)	25,78 23,91 – 27,66	27,34 24,51 – 30,18	27,21 24,50 – 29,93

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado.

Os escores SLEDAI para as pacientes com LES estão apresentados individualmente, respectivamente nas Tabelas 19 e 20, para as pacientes com LES controlado e LES não controlado. Os escores SLEDAI foram atribuídos de acordo com as características apresentadas pelas pacientes com LES durante o período do estudo.

Tabela 19: Escores SLEDAI para as pacientes com LES controlado (n=13)

PACIENTES	SLEDAI	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
1	1	Leucopenia	<3.000 leucócitos/mm^3
2	4	Piúria	> 5 leucócitos por campo na urina rotina
3	0	Atividade zero	Remissão da doença
4	4	Hematúria	> 5 células por campo na urina rotina
5	4	Proteinúria	> 0,5g/24h na urina de 24 h
6	0	Atividade zero	Remissão da doença
7	0	Atividade zero	Remissão da doença
8	0	Atividade zero	Remissão da doença
9	0	Atividade zero	Remissão da doença
10	2	Complemento Baixo	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
11	0	Atividade zero	Remissão da doença
12	2	Anticorpo anti-DNA reagente e com título alto	Aumento dos títulos ou positivação
13	2	Complemento Baixo	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório

Tabela 20: Escores SLEDAI para as pacientes com LES não controlado (n=12)

PACIENTES	SLEDAI	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
1	8	**a.** Hematúria **b.** Complemento Baixo **c.** Anticorpo anti-DNA reagente e com título alto	**a.** 5 células por campo **b.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório **c.** Aumento dos títulos ou positivação
2	6	**a.** Proteinúria **b.** Anticorpo anti-DNA reagente e com título alto	**a.** 0,5g/24h na urina de 24h **b.** 25 % no ligando pelo ensaio de Farr ou acima dos valores de referência do laboratório
3	15	**a.** Hematúria **b.** Proteinúria **c.** Novo rash **d.** Alopécia **e.** Complemento Baixo **f.** Leucopenia	**a.** 5 células por campo **b.** 0,5g/24h na urina de 24h **c.** Instalação recente ou recorrência de rash tipo inflamatório **d.** Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo **e.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório **f.** <3.000 leucócitos/mm^3
4	6	**a.** Proteinúria **b.** Anticorpo anti-DNA reagente e com título alto	**a.** 0,5g/24h na urina de 24h **b.** Aumento dos títulos ou positivação
5	9	**a.** Proteinúria **b.** Hematúria **c.** Leucopenia	**a.** 0,5g/24h na urina de 24h **b.** 5 células por campo **c.** <3.000 leucócitos/mm^3
6	6	**a.** Proteinúria **b.** Complemento Baixo	**a.** 0,5g/24h na urina de 24h **b.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
7	10	**a.** Cilindros urinários **b.** Piúria **c.** Complemento Baixo	**a.** Cilindros de eritrócitos ou de granulosos **b.** 5 leucócitos por campo na urina rotina **c.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
8	6	**a.** Artrite **b.** Complemento Baixo	**a.** Duas articulações ou mais com dor e sinais inflamatórios **b.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
9	12	**a.** Vasculite cutânea **b.** Complemento Baixo **c.** Anticorpo anti-DNA reagente e com título alto	**a.** Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungeal, hemorragias sub-ungueais**,** ou biópsia ou angiograma compativeis com vasculite **b.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório **c.** Aumento dos títulos ou positivação
10	8	**a.** Proteinúria **b.** Complemento Baixo **c.** Anticorpo anti-DNA reagente e com título alto	**a.** 0,5g/24h na urina de 24h **b.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório **c.** Aumento dos títulos ou positivação
11	12	**a.** Artrite **b.** Novo Rash **c.** Alopécia **d.** Trombocitopenia **e.** Leucopenia **f.** Complemento Baixo	**a.** Duas articulações ou mais com dor e sinais inflamatórios **b.** Instalação recente ou recorrência de rash tipo inflamatório **c.** Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo **d.** <100.000 plaquetas/mm^3 **e.** <3.000 leucocitos/mm^3 **f.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
12	10	**a.** Proteinúria **b.** Hematúria **c.** Complemento Baixo	**a.** 0,5g/24h na urina de 24h **b.** 5 células por campo **c.** C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório

Todas as participantes realizaram exames clínicos e laboratoriais para a avaliação hepática, renal, metabólica e hematológica. Os valores dos referidos exames estão apresentados na Tabela 21, como média e IC 95%. Os dados individuais estão apresentados no Apêndice A.

Tabela 21: Exames laboratoriais das voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n= 12), apresentados como media e IC 95%

Parâmetros	Valor de Referência (Unidade)	Voluntárias sadias	LES controlado	LES não controlado
Proteínas totais	6,0 – 8,5 g/dL	7,08 6,62 – 7,54	7,16 6,84 – 7,48	6,43 5,65 – 7,22
Albumina	3,5 – 4,8 g/dL	4,13 4,01 – 4,24	4,16 3,97 – 4,36	3,56 3,23 – 3,88
α1-glicoproteína ácida	50 – 120 mg/dL	73,95 65,42 – 82,47	107,48 86,32 – 128,65	111,45 83,50 – 139,41
γ-GT	11 – 50 U/L	26,72 17,66 – 35,77	26,99 19,66 – 34,32	45,76 24,53 – 66,99
TGP/ALT	≤ 31,0 U/L	14,72 11,49 – 17,95	12,93 11,32 – 14,53	23,79 16,81 – 30,77
TGO/AST	≤ 32,0 U/L	17,48 15,25 – 19,72	18,67 15,80 – 21,55	27,76 20,90 – 34,62
Bilirrubina total	0,2 – 1,2 mg/dL	0,47 0,36 – 0,58	0,63 0,41 – 0,85	0,33 0,26 – 0,40
Bilirrubina direta	≤ 0,3 mg/dL	0,12 0,10 – 0,14	0,15 0,09 – 0,20	0,09 0,06 – 0,12
Bilirrubina indireta	≤ 0,9 mg/dL	0,35 0,26 – 0,44	0,48 0,31 – 0,65	0,24 0,18 – 0,30
Fosfatase Alcalina	65 – 300 U/L	147,67 116,40 – 178,94	178,84 137,31 – 220,36	173,91 86,06 – 261, 76
Creatinina	0,7 – 1,5 mg/dL	0,77 0,71 – 0,83	0,81 0,74 – 0,87	0,74 0,63 – 0,84
Ureia	10 - 50 mg/dL	26,12 22,38 – 29,86	26,21 23,18 – 29,23	31,51 24,07 – 38,95
Glicemia	70 – 100 mg/dL	78,68 73,80 – 83,57	75,55 71,14 – 79,95	92,60 78,57 – 106,64
Colesterol	< 200 mg/dL	185,91 162,90 – 208,92	163,34 143,20 – 183,49	201,86 163,29 – 240,43
Triglicérides	< 150 mg/dL	97,73 73,89 – 121,57	82,73 55,08 – 110,39	122,74 63,44 – 182,04
HDL	> 35 mg/dL	55,79 49,02 – 62,55	44,21 39,09 – 49,32	46,48 36,98 – 55,99
LDL	< 130 mg/dL	110,73 92,66 – 128,81	102,61 87,50 – 117,73	124,92 95,26 – 154,57
Glóbulos vermelhos	3,9 – 5,0 10*6/μL	4,43 4,26 – 4,61	4,34 4,03 – 4,65	4,01 3,76 – 4,25
Hemoglobina	12,0 – 15,5 g/dL	12,91 12,47 – 13,36	12,65 11,75 – 13,54	11,77 11,04 – 12,51
Hematócrito	35 – 45%	38,40 37,05 – 39,75	38,15 35,49 – 40,82	32,25 33,18 – 37,31
Glóbulos brancos	3,5 – 10,5 10*6/μL	7,24 6,11 – 8,37	4,82 3,86 – 5,79	4,18 2,98 – 5,39
Plaquetas	150 – 450 10*3/μL	313,27 275,01 – 351,52	279,54 233,60 – 325,48	266,00 207,99 – 324,01

II.4.2 Dados das citocinas plasmáticas

As concentrações plasmáticas de citocinas, avaliadas no primeiro dia do estudo, estão apresentadas na Tabela 22 como média e IC 95%. As concentrações plasmáticas de IL-10, MCP-1 e TNF-α estão aumentadas nas pacientes com LES não controlado quando comparadas com as voluntárias sadias, enquanto as concentrações plasmáticas de MCP-1 e TNF-α também estão aumentadas nas pacientes com LES controlado quando comparadas com as voluntárias sadias (Figura 18).

Tabela 22: Concentrações das citocinas em plasma para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Dados apresentados como média e IC 95%

Citocinas pg/mL	Voluntárias sadias	LES controlado	LES não controlado
IFN-γ	19,97 (14,41 - 25,53)	28,13 (21,60 - 34,65)	24,44 (16,28 - 32,59)
IL-10	32,68 (23,29 - 42,08)	50,84 (39,46 - 62,22)	47,82* (33,03 - 62,62)
IL-1β	6,44 (4,14 - 8,74)	8,75 (6,65 - 10,84)	6,71 (3,56 - 9,86)
IL-6	13,74 (0 - 30,48)	12,35 (6,74 - 17,96)	9,35 (5,78 - 12,92)
IL-8	5,91 (0,30 - 11,51)	6,48 (4,26 - 8,71)	9,24 (5,30 - 13,18)
MCP-1	239,16 (203,37 - 274,95)	416,97** (310,14 - 523,81)	510,67* (367,33 - 654,02)
TNF-α	23,56 (17,89 - 29,23)	38,95** (30,17 - 47,74)	40,03* (28,39 - 51,66)

IFN-γ: interferon gama; IL-1β: interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; IL-10: interleucina 10; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa. $p<0,05$ ANOVA * (voluntária sadia *vs* LES não controlado); ** (voluntária sadia *vs* LES controlado).

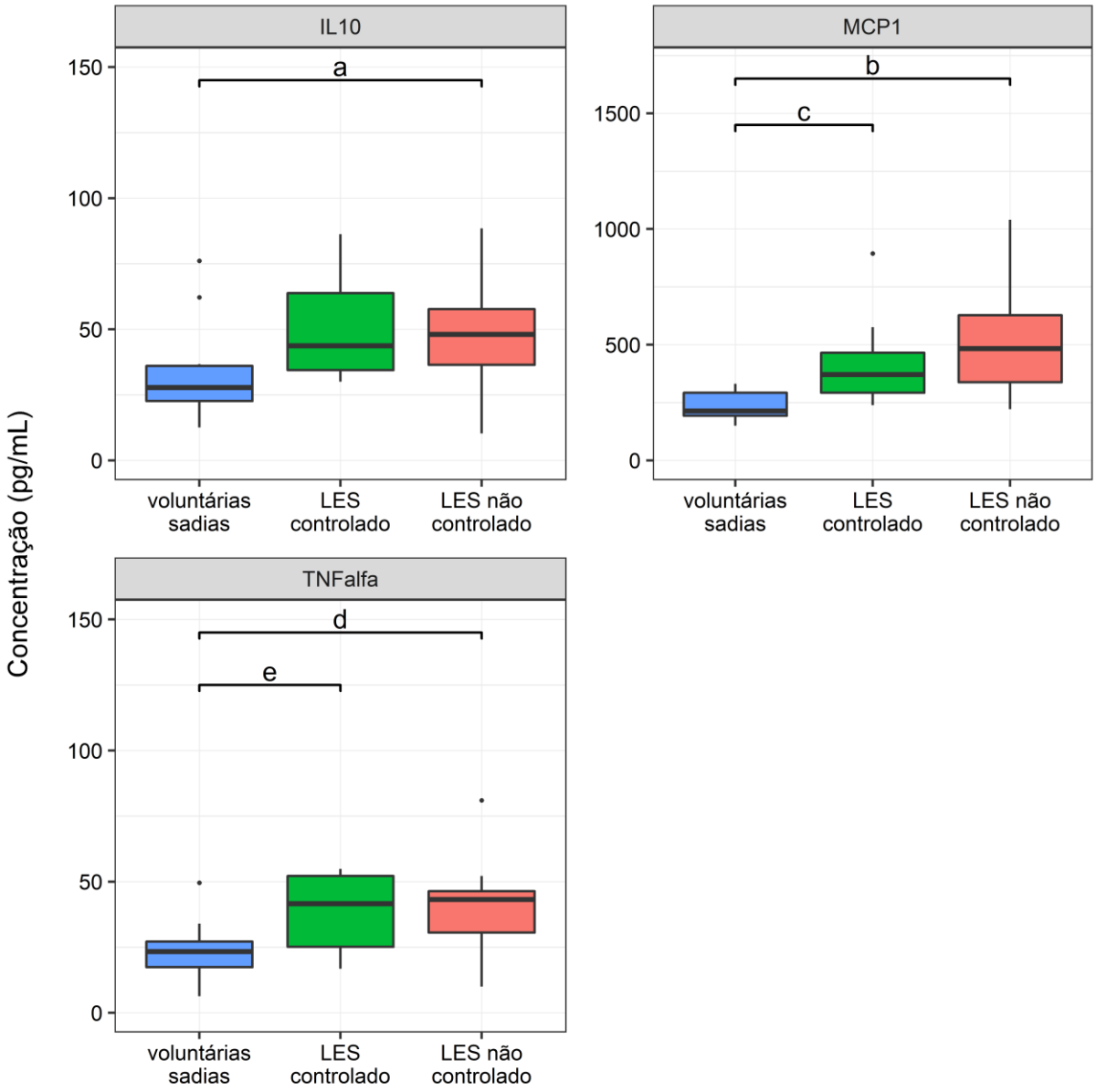


Figura 18: Boxplot das concentrações das citocinas em plasma para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Dados apresentados como medianas e interquartis.

II.4.3 Efeito da atividade in vivo do CYP3A4 na disposição da ATV e seus metabólitos

A atividade *in vivo* do CYP3A4 para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado foi avaliada empregando o midazolam oral como fármaco marcador. Os valores de clearance total aparente estão apresentados na Tabela 23 como dados individuais, média e IC 95%. De acordo com a faixa de referência de 10-40 mL/min/kg, reportada por Lamba et al. (2002), observa-se que

nenhuma das participantes apresentaram valores de clearance total aparente do midazolam inferiores a 10 mL/min/kg, no entanto, 40% das voluntárias sadias, 23% das pacientes com LES controlado e 58% das pacientes com LES não controlado, apresentaram valores de clearance total aparente do midazolam maiores que 40 mL/min/kg. Os dados de clearance total aparente do midazolam indicam ausência de inibição do CYP3A4 intestinal e hepático nas pacientes com LES controlado e não controlado. Ressalta-se ainda que os valores de clearance total aparente do midazolam não diferiram (p> 0,05, ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos investigados.

Tabela 23: Clearance total aparente do midazolam (mL/min/kg) para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12).

Pacientes	Voluntárias Sadias	LES controlado	LES não controlado
1	26,22	23,59	21,71
2	14,97	19,68	18,13
3	25,97	56,61	44,53
4	39,85	27,99	20,67
5	24,55	12,04	-
6	46,60	24,96	42,37
7	26,92	31,39	46,05
8	42,84	19,85	49,16
9	47,78	33,91	29,51
10	45,10	49,13	66,02
11	29,23	23,33	44,62
12	60,44	50,49	61,03
13	31,46	19,49	
14	34,60		
15	42,02		
Média (IC 95%)	**35,90 29,37-42,44**	**30,19 21,88-38,50**	**40,35 29,55-51,14**

- Não determinado
p> 0,05, ANOVA com pós teste de Tuckey

II.4.4 Farmacocinética da genfibrozila administrada em dose múltipla

Os parâmetros farmacocinéticos da GFZ foram avaliados no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h do sexto dia de administração de doses múltiplas orais de 600 mg/12h. A Tabela 24 apresenta os parâmetros farmacocinéticos da GFZ para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e pacientes com LES não controlado (n=12). Os parâmetros farmacocinéticos da GFZ, apresentados como média e IC 95%, não diferiram (p> 0,05, ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos investigados.

Tabela 24: Parâmetros farmacocinéticos da GFZ administrada em doses múltiplas orais de 600 mg/12 h para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Dados apresentados como média e IC 95%

Parâmetro	Voluntárias sadias	LES controlado	LES não controlado
AUC^{0-12h} (μg.h/mL)	88,84 (72,72-104,96)	96,36 (74,05-118,68)	67,33 (45,87-88,78)
C^{ss} (μg/mL)	7,40 (6,06-8,75)	8,03 (6,17-9,89)	5,61 (3,82-7,40)
C_{min} (μg/mL)	1,24 (0,87-1,61)	1,15 (0,83-1,47)	0,93 (0,40-1,45)
C_{max} (μg/mL)	26,73 (21,31-32,15)	24,69 (19,61-29,78)	20,69 (14,38-27,00)
t_{max} (h)	2,28 (1,42-3,13)	2,73 (2,00-3,46)	2,14 (0,83-3,46)
$t_{1/2}$ (h)	2,81 (2,22-3,40)	2,37 (2,02-2,73)	2,70 (1,97-3,43)
CL/f (L/h)	7,72 (5,85-9,58)	7,55 (5,04-10,05)	11,60 (6,96-16,25)
Vd/f (L)	33,97 (18,41-49,53)	27,46 (14,28-40,64)	43,97 (25,77-62,18)

AUC: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo no interval de dose de 12 h, C^{ss}: concentração plasmática média no estado de equilíbrio, C_{min}: concentração plasmática minima, C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, CL/f: *clearance* total aparente, Vd/f: volume de distribuição aparente.
p>0,05, ANOVA com pós teste de Tuckey

II.4.5 Efeito do LES na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 avaliado com base na farmacocinética e farmacodinâmica da ATV, administrada como monoterapia ou associada a GFZ

A disposição cinética da ATV e metabólitos foi avaliada em 40 participantes (15 voluntárias sadias, 13 pacientes com LES controlado e 12 pacientes com LES não controlado).

As curvas concentrações plasmáticas da ATV e seus metabólitos ativos p-OH-ATV e o-OH-ATV *versus* tempo (0-36 h) estão apresentadas na Figura 19 nas duas ocasiões de administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV): Fase 1 monoterapia e Fase II no sexto dia do tratamento com GFZ (600 mg/12h). Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

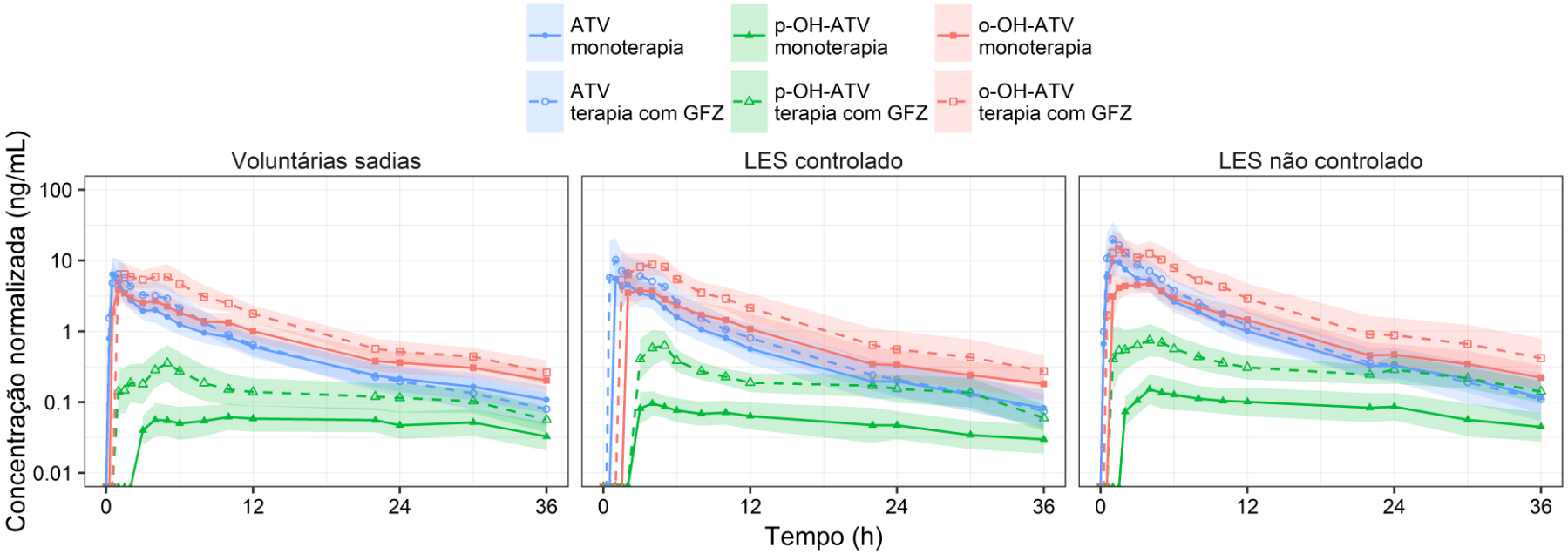


Figura 19: Curvas de concentrações plasmáticas da ATV e seus metabólitos ativos p-OH-ATV e o-OH-ATV versus tempo (zero a 36 h) nas duas ocasiões de administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV): Fase I monoterapia e Fase II no sexto dia do tratamento com GFZ 600 mg/12h. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

A Figura 20 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas dos metabólitos inativos da ATV: ATV-LAC, p-OH-ATV-LAC e o-OH-ATV-LAC *versus* tempo (zero a 36 h) na Fase I monoterapia (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV) e na Fase II no sexto dia do tratamento com GFZ (600 mg/12h). Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

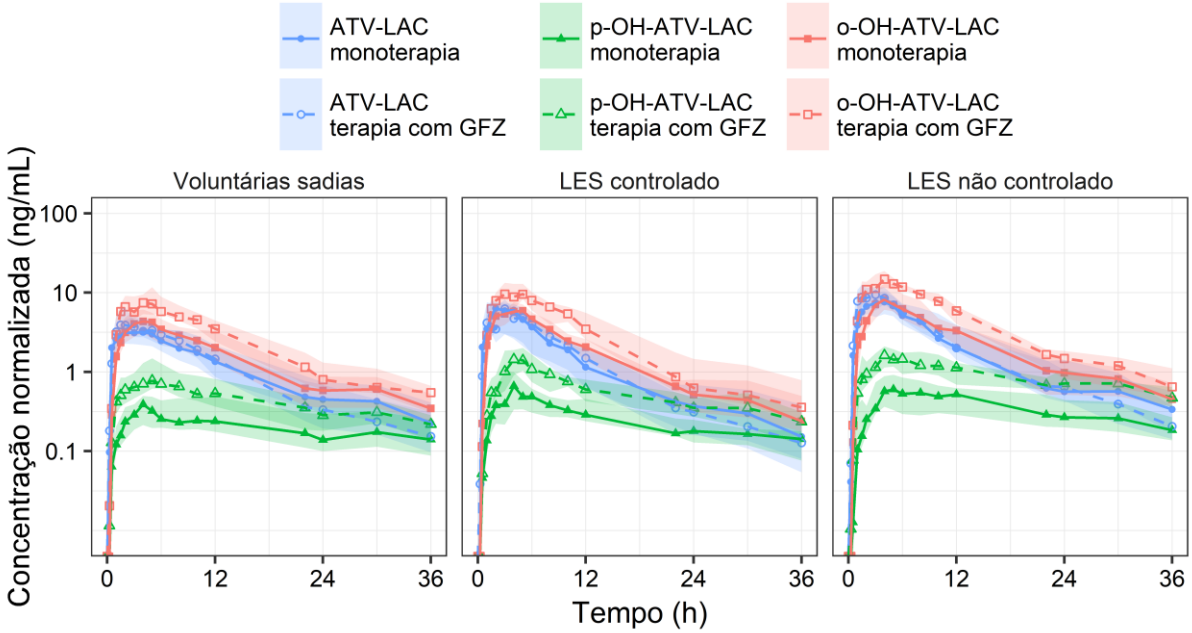


Figura 20: Curvas de concentrações plasmáticas da ATV-LAC, p-OH-ATV-LAC e o-OH-ATV-LAC versus tempo no intervalo de zero a 36 h, após administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV) como monoterapia ou em associação com GFZ. Os dados estão apresentados como média e IC95%.

A Tabela 25 apresenta os principais parâmetros farmacocinéticos da ATV normalizados para dose de 20 mg de ATV, nas Fases monoterapia e associação com GFZ, para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

Tabela 25: Parâmetros farmacocinéticos da ATV para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%

	Voluntárias sadias		**LES controlado**		**LES não controlado**	
Parâmetros	**ATV**	**ATV + GFZ**	**ATV**	**ATV + GFZ**	**ATV**	**ATV + GFZ**
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	35,04 (24,24-45,84)	44,78 (30,92-58,64)	43,35 (25,00-61,70)	62,93* (39,45-86,40)	67,27$^{\nabla}$ (47,99-86,55)	96,17*$^{\nabla\blacklozenge}$ (76,03-116,30)
C_{max} (ng/mL)	9,52 (7,28-11,75)	14,89* (9,29-20,50)	11,96 (8,39-15,53)	22,24* (10,44-34,05)	21,68$^{\nabla}$ (7,60-35,76)	34,13*$^{\nabla}$ (18,66-49,60)
t_{max} (h)	0,98 (0,44-1,52)	0,92 (0,41-1,42)	0,92 (0,52-1,33)	1,54 (0,62-2,46)	1,04 (0,70-1,39)	1,12 (0,82-1,43)
$t_{1/2}$ (h)	16,57 (6,60-26,54)	8,71 (7,42-10,01)	9,65 (7,99-11,32)	9,40 (6,78-12,02)	12,72 (7,13-18,31)	11,44 (5,16-17,72)
CL/f (L/h)	742,90 (536,60-949,20)	638,80 (391,1-886,4)	659,60 (431,60-887,50)	456,80* (281,90-631,60)	377,40$^{\nabla}$ (227,50-527,30)	238,30*$^{\nabla}$ (169,60-307,00)
Vd/f (L)	9005 (5174-12836)	4596* (2382-6811)	4751 (2685-6818)	2627* (1716-3539)	3398$^{\nabla}$ (1662-5134)	1939*$^{\nabla}$ (823,90-3054)

AUC: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero extrapolada ao infinito, C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, CL/f: *clearance* total aparente, Vd/f: volume de distribuição aparente.
p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey $^{\#}$(voluntárias sadias *versus* LES controlado); $^{\nabla}$(voluntárias sadias *versus* LES não controlado);$^{\blacklozenge}$(LES não controlado *versus* LES controlado).
p<0,05; teste t *(ATV *versus* ATV + GFZ)

A Figura 21 exibe os parâmetros farmacocinéticos da ATV com significância estatística (p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias (n=15) e pacientes com LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como medianas e interquartis.

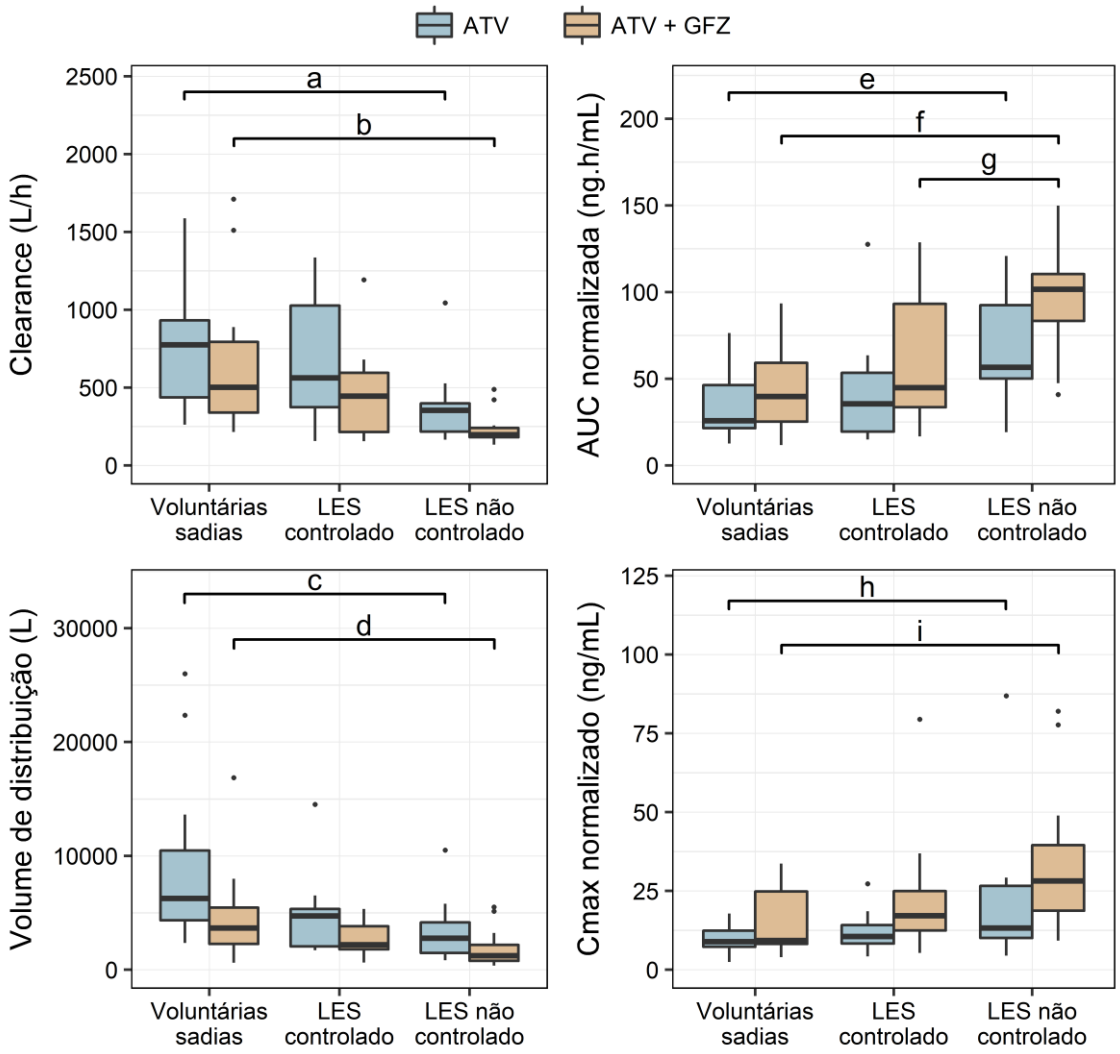


Figura 21: Parâmetros farmacocinéticos da ATV com significância estatística (p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias e pacientes com LES não controlado. Os dados estão apresentados como medianas e interquartis.

A Tabela 26 apresenta o estudo da fração livre da ATV, avaliada na Fase I monoterapia e na Fase II associação com GFZ, para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. A fração livre da ATV não diferiu (p> 0,05, ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos investigados. A fração livre da ATV está apresentada na Tabela 26 como dados individuais e como média e IC 95%.

Tabela 26: Fração livre da ATV nas fases monoterapia e associação com GFZ para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como valores individuais, média e IC 95%

	Voluntárias sadias		**LES controlado**		**LES não controlado**	
ID	**ATV**	**ATV + GFZ**	**ATV**	**ATV + GFZ**	**ATV**	**ATV + GFZ**
1	5,56	11,50	8,00	9,23	7,48	6,72
2	5,73	8,85	7,21	8,37	7,33	6,32
3	9,14	9,78	6,32	7,28	7,92	10,02
4	4,28	5,34	8,78	7,66	4,91	6,77
5	7,27	7,96	9,66	11,16	8,24	12,92
6	8,08	6,17	9,84	8,54	5,91	5,53
7	9,13	7,03	7,48	8,44	11,44	13,43
8	10,99	10,35	15,01	10,45	15,59	16,04
9	11,31	6,52	7,69	6,29	7,34	7,60
10	6,35	4,43	6,96	10,05	8,00	7,48
11	7,77	8,54	9,90	8,65	15,46	17,26
12	11,21	12,69	8,57	7,81	4,20	6,60
13	12,96	17,18	9,09	9,44		
14	21,80	22,06				
15	9,13	7,70				
Média IC95%	9,38 (7,05-11,72)	9,74 (7,15-12,33)	8,81 (7,49-10,13)	8,72 (7,91-9,53)	8,65 (6,31-10,99)	9,72 (7,10-12,34)

ID: Identificação do participante
p>0,05; teste t
p>0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey

A Figura 22 apresenta a correlação entre o clearance total aparente da ATV e as concentrações plasmáticas da citocina MCP-1 para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES não controlado (n=12) e pacientes com LES controlado (n=13).

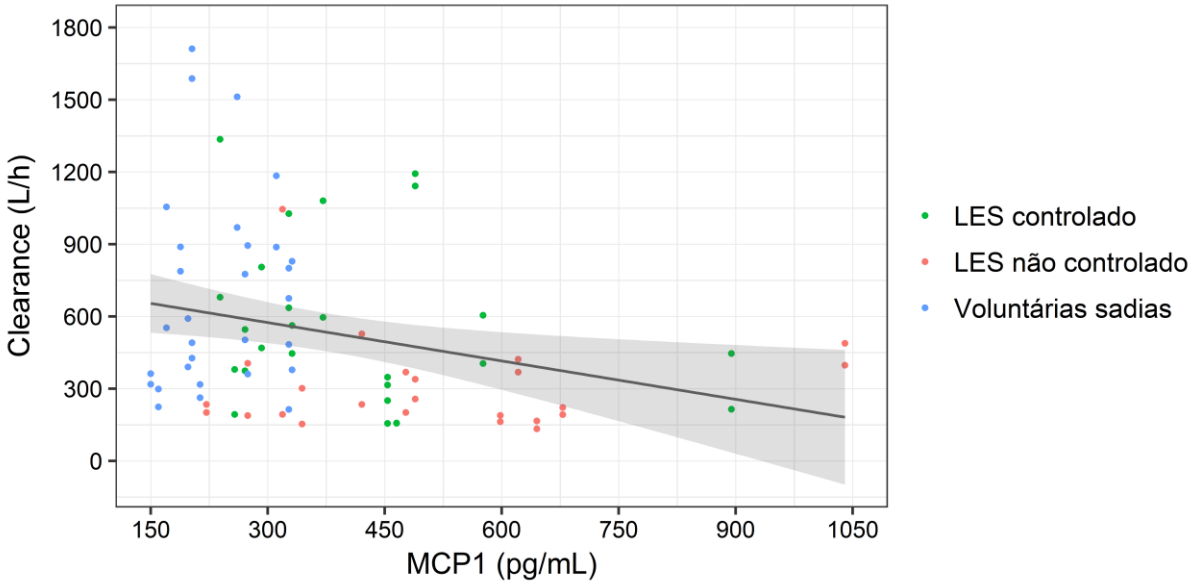


Figura 22: Correlação entre o clearance total aparente da ATV e as concentrações plasmáticas da citocina MCP-1 (P=0,01088) para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES não controlado (n=12) e pacientes com LES controlado (n=13).

As Tabelas 27, 28 e 29 apresentam os principais parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV, normalizados para dose de 20 mg de ATV, nas Fases monoterapia e associação com GFZ, para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. Os dados estão apresentados como média e IC95%.

Tabela 27: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV para as voluntárias sadias. Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.

		Voluntárias sadias (n=15)				
Parâmetros		**p-OH ATV**	**o-OH ATV**	**ATV-LAC**	**p-OH ATV-LAC**	**o-OH ATV-LAC**
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	**ATV**	-	46,29 (30,79-61,80)	59,12 (37,39-80,85)	-	75,65 (48,91-102,40)
	ATV +GFZ	-	85,96* (60,81-111,10)	53,58 (39,25-67,91)	-	114,40* (89,67-139,20)
AUC^{0-36h} (ng.h/mL)	**ATV**	2,33 (1,27-3,38)	41,90 (28,30-55,42)	54,43 (34,85-74,00)	10,18 (5,98-14,38)	69,18 (45,09-93,26)
	ATV +GFZ	7,46* (4,19-10,73)	81,49* (56,83-106,20)	49,72 (37,00-62,44)	18,98* (13,16-24,79)	105,40* (82,66-128,20)
C_{max} (ng/mL)	**ATV**	0,13 (0,07-0,19)	6,38 (4,46-8,31)	5,21 (3,05-7,36)	0,60 (0,22-0,98)	6,19 (3,68-8,70)
	ATV +GFZ	0,72* (0,29-1,14)	12,24* (7,56-16,92)	5,69 (3,95-7,44)	1,54* (0,70-2,39)	9,50* (6,78-12,23)
t_{max} (h)	**ATV**	9,87 (4,33-15,4)	1,60 (0,77-2,42)	2,87 (2,05-3,68)	3,90 (2,11-5,69)	3,90 (3,32-4,47)
	ATV +GFZ	4,33 (2,85-5,81)	1,8 (0,98-2,62)	2,07 (1,37-2,77)	4,03 (3,29-4,78)	3,87 (3,28-4,45)
$t_{1/2}$ (h)	**ATV**	20,95 (12,68-29,21)	11,33 (9,04-13,62)	9,54 (8,40-10,68)	67,17 (0-160,70)	9,02 (7,79-10,25)
	ATV +GFZ	19,47 (8,60-30,33)	8,31* (6,75-9,87)	9,74 (8,14-11,34)	20,30 (13,08-27,52)	9,81 (7,34-12,28)

$AUC^{0-\infty}$: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero extrapolada ao infinito, AUC^{0-36h}: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero até a última amostra coletada (36 h), C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação.
$p<0,05$; teste t *(ATV *versus* ATV + GFZ)
-Não se aplica

Tabela 28: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV para as pacientes com LES controlado. Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.

		LES controlado (n=13)				
Parâmetros		**p-OH ATV**	**o-OH ATV**	**ATV-LAC**	**p-OH ATV-LAC**	**o-OH ATV-LAC**
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	**ATV**	-	54,28 (35,74-72,81)	59,47 (39,36-79,58)	-	73,80 (54,77-92,82)
	ATV + GFZ	-	108,00* (77,14-138,90)	62,67 (42,27-83,07)	-	127,70* (97,43-158,00)
AUC^{0-36h} (ng.h/mL)	**ATV**	2,56 (1,38-3,74)	50,17 (33,42-66,92)	56,41 (37,6-75,23)	10,49 (7,31-13,68)	68,58 (52,03-85,13)
	ATV + GFZ	9,59* (6,25-12,93)	103,70* (74,39-133,10)	60,56 (41,07-80,06)	22,93* (16,54-29,33)	120,90* (92,86-148,90)
C_{max} (ng/mL)	**ATV**	0,16 (0,09-0,23)	7,46 (5,67-9,25)	8,05 (4,35-11,76)	0,76 (0,49-1,02)	7,48 (5,26-9,70)
	ATV + GFZ	1,02* (0,54-1,49)	15,95* (10,07-21,82)	8,61 (5,22-12,01)	1,68* (1,11-2,25)	12,81* (9,16-16,45)
t_{max} (h)	**ATV**	9,31 (3,44-15,18)	1,92 (0,75-3,09)	2,23 (1,63-2,83)	4,19 (2,90-5,48)	3,69 (2,94-4,45)
	ATV + GFZ	5,731 (2,23-9,23)	2,61 (1,67-3,56)	2,77 (1,43-4,11)	4,08 (3,50-4,65)	3,96 (2,80-5,12)
$t_{1/2}$ (h)	**ATV**	18,75 (12,57-24,92)	11,37 (5,50-17,24)	8,33 (6,53-10,14)	25,30 (12,03-38,57)	8,84 (7,35-10,32)
	ATV + GFZ	14,56 (8,18-20,94)	7,85 (6,38-9,33)	7,61 (6,30-8,93)	17,73* (11,14-24,32)	8,75 (6,04-11,45)

$AUC^{0-\infty}$: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero extrapolada ao infinito, AUC^{0-36h}: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero até a última amostra coletada (36 h), C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação
$p<0,05$; teste t *(ATV *versus* ATV + GFZ)
-Não se aplica

Tabela 29: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV para as pacientes com LES não controlado. Os parâmetros farmacocinéticos, normalizados para dose de 20 mg de ATV, estão apresentados como média e IC 95%.

		LES não controlado (n=12)				
Parâmetros		**p-OH ATV**	**o-OH ATV**	**ATV-LAC**	**p-OH ATV-LAC**	**o-OH ATV-LAC**
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	**ATV**	-	60,69 (43,85-77,54)	100,70$^{\nabla\blacklozenge}$ (63,27-138,10)	-	113,00 (77,11-148,90)
	ATV +GFZ	-	183,20*$^{\nabla}$ (73,02-293,30)	111,50$^{\nabla\blacklozenge}$ (71,23-151,80)	-	194,20*$^{\nabla\blacklozenge}$ (161,20-227,20)
AUC^{0-36h} (ng.h/mL)	**ATV**	4,08 (1,95-6,2)	57,06 (40,49-73,64)	94,03$^{\nabla\blacklozenge}$ (57,58-130,50)	16,09 (9,24-22,93)	105,80 (70,40-141,20)
	ATV +GFZ	15,12*$^{\nabla}$ (9,40-20,85)	115,90*$^{\nabla}$ (15,44-216,30)	103,20$^{\nabla\blacklozenge}$ (69,48-136,90)	34,27*$^{\nabla\blacklozenge}$ (25,85-42,69)	173,90*$^{\nabla\blacklozenge}$ (145,80-202,10)
C_{max} (ng/mL)	**ATV**	0,37 (0,03-0,72)	7,64 (4,52-10,76)	10,78$^{\nabla}$ (6,50-15,05)	0,85 (0,49-1,22)	10,40 (6,59-14,20)
	ATV +GFZ	1,93*$^{\nabla}$ (0,77-3,084)	28,11*$^{\nabla}$ (15,82-40,39)	12,06$^{\nabla\blacklozenge}$ (9,35-14,76)	2,06* (1,38-2,75)	17,46*$^{\nabla\blacklozenge}$ (13,15-21,77)
t_{max} (h)	**ATV**	5,67 (2,06-9,27)	2,37 (1,39-3,36)	2,92 (1,92-3,91)	7,17 (3,30-11,03)	4,00 (3,46-4,54)
	ATV +GFZ	5,08 (0-10,20)	1,96 (1,01-2,91)	2,37 (1,40-3,35)	4,58 (2,91-6,26)	3,50 (2,82-4,18)
$t_{1/2}$ (h)	**ATV**	20,68 (10,23-31,13)	9,54 (7,44-11,64)	8,59 (5,40-11,79)	27,30 (10,18-44,43)	8,79 (7,04-10,54)
	ATV +GFZ	15,38 (8,11-22,64)	11,24 (6,44-16,05)	9,15 (6,68-11,62)	20,73 (9,51-31,95)	13,50* (8,87-18,12)

*ANOVA com pós teste de Tuckey

$AUC^{0-\infty}$: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero extrapolada ao infinito, AUC^{0-36h}: área sob a curva concentração plasmática *vs* tempo do tempo zero até a última amostra coletada (36 h), C_{max}: concentração plasmática maxima, t_{max}: tempo para atingir C_{max}, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação.
p<0,05; teste t *(ATV *versus* ATV + GFZ)
p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey $^{\nabla}$(voluntárias sadias *versus* LES não controlado);$^{\blacklozenge}$(LES controlado *versus* LES não controlado).
-Não se aplica

A Figura 23 apresenta o boxplot referente aos parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV com significância estatística (p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias (n=15) e pacientes com LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como medianas e interquartis.

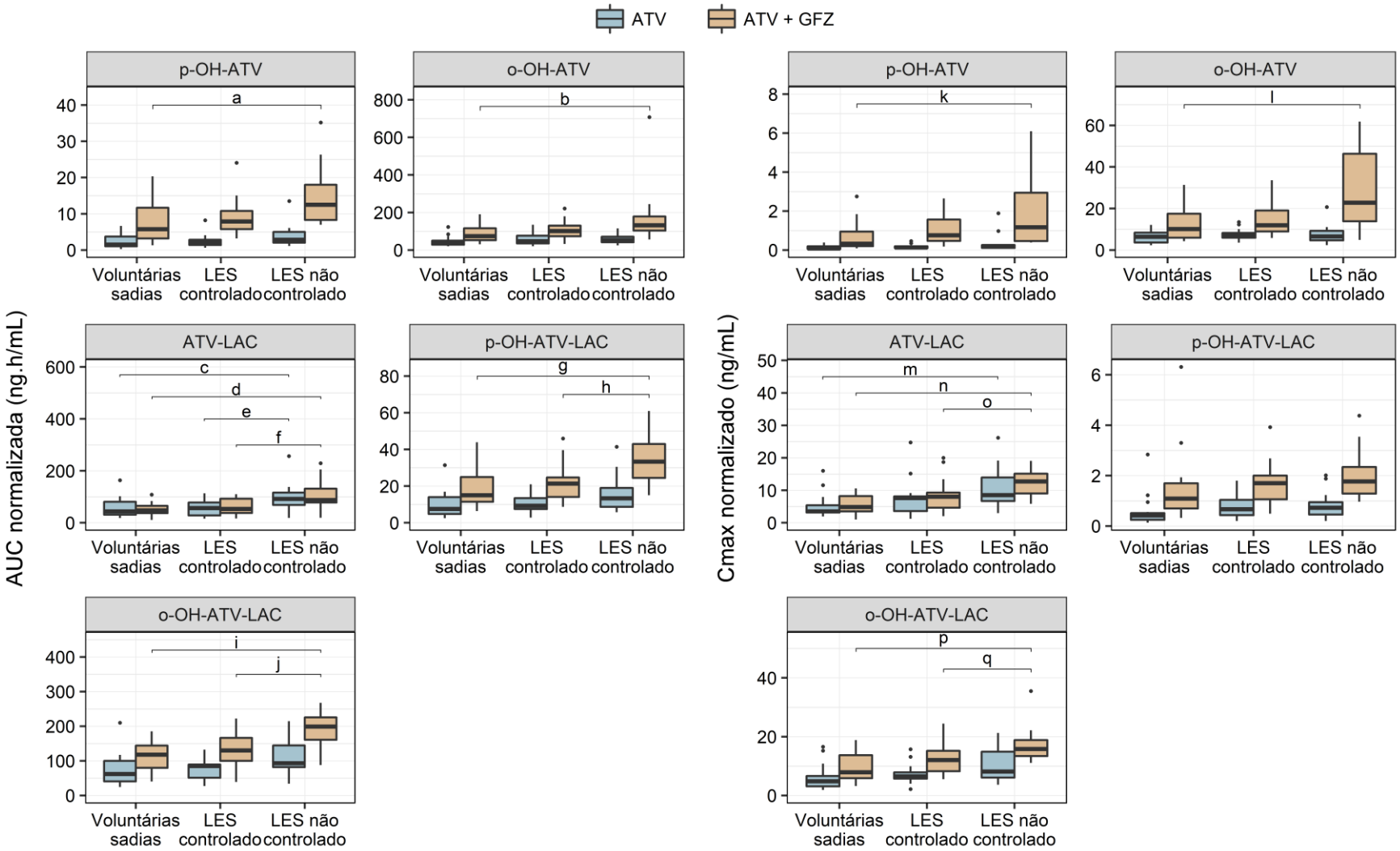


Figura 23: Parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos da ATV com significância estatística (p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias (n=15) e pacientes com LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como medianas e interquartis.

A Tabela 30 apresenta as razões metabólicas de $AUC^{0-\infty}$ o-OH-ATV/ATV, ATV-LAC/ATV e o-OH-ATV-LAC/ATV, referentes a monoterapia e associação com GFZ, para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. A Tabela 30 também mostra as razões metabólicas de AUC^{0-36h} p-OH-ATV/ATV e p-OH-ATV-LAC/ATV referentes a monoterapia e associação com GFZ, para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. As razões metabólicas estão apresentadas como médias e IC 95%.

Tabela 30: Razões metabólicas de $AUC^{0-\infty}$ ou AUC^{0-36h} referentes a monoterapia e associação com GFZ, para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

		p-OH ATV	o-OH ATV	ATV-LAC	p-OH ATV-LAC	o-OH ATV-LAC
Voluntárias sadias	**ATV**	0,06 (0,04-0,07)	0,94 (0,81-1,07)	1,43 (1,06-1,80)	0,25 (0,18-0,31)	1,75 (1,35-2,14)
	ATV +GFZ	0,15* (0,11-0,18)	1,90* (0,89-2,91)	1,25* (0,75-1,76)	0,36* (0,28-0,44)	2,13* (1,73-2,53)
LES controlado	**ATV**	0,06 (0,05-0,07)	1,40 (1,10-1,70)	1,58 (1,29-1,88)	0,30 (0,22-0,38)	2,30 (1,72-2,88)
	ATV +GFZ	0,14* (0,11-0,16)	2,06* (1,77-2,34)	1,31* (1,05-1,57)	0,44* (0,34-0,54)	2,97* (2,40-3,55)
LES não controlado	**ATV**	0,06 (0,05-0,07)	1,41▽♦ (1,12-1,71)	1,41 (1,07-1,75)	0,27 (0,21-0,32)	1,99 (1,56-2,42)
	ATV +GFZ	0,15* (0,12-0,18)	1,97 (1,50-2,45)	1,06 (0,82-1,30)	0,39* (0,29-0,49)	2,38*▽ (1,87-2,90)

p<0,05; teste t *(ATV *versus* ATV + GFZ)
p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey ▽(voluntárias sadias *versus* LES não controlado);♦(LES controlado *versus* LES não controlado).

A Tabela 31 apresenta os parâmetros farmacocinéticos do MVA nas fases basal (sem administração de ATV), administração de dose única oral de ATV como monoterapia e administração de dose única oral de ATV associada com GFZ, para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

Tabela 31: Parâmetros farmacocinéticos do MVA para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

Parâmetros		Voluntárias sadias	LES controlado	LES não controlado
AUC^{0-24h} ng.h/mL	**basal**	78,35 (67,25 - 89,45)	80,73 (63,19 - 98,27)	110,33♦ (79,54 - 141,12)
	ATV	34,74* (28,36 - 41,12)	29,90* (25,00 - 34,79)	41,10* (35,35 - 46,86)
	ATV + GFZ	45,70** (38,18 - 53,22)	47,11**Δ (38,03 - 56,19)	60,60**Δ♦ (49,06 - 72,14)
AUC^{0-6h} ng.h/mL	**basal**	18,25 (14,24 - 22,25)	17,84 (13,11 - 22,56)	25,39 (18,22 - 32,56)
	ATV	7,28* (6,16 - 8,40)	7,54* (5,97 - 9,11)	10,26* (8,33 - 12,18)
	ATV + GFZ	11,07** (8,87 - 13,28)	11,29▽ (7,83 - 14,75)	17,67Δ♦ (14,35 - 20,98)
C_{min} ng/mL	**basal**	2,25 (1,91 - 2,60)	2,36 (1,73 - 3,00)	3,40 (2,28 - 4,53)
	ATV	0,77* (0,64 - 0,90)	0,63* (0,53 - 0,74)	0,87* (0,71 - 1,03)
	ATV + GFZ	0,95** (0,79 - 1,10)	0,88**▽ (0,60 - 1,17)	1,25**Δ (1,00 - 1,51)

p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey *(basal *versus* ATV); **(basal *versus* ATV + GFZ); Δ (ATV *versus* ATV + GFZ).
p<0,05; ANOVA com pós teste de Tuckey #(voluntárias sadias *versus* LES controlado); ♦(voluntárias sadias *versus* LES não controlado); ▽(LES não controlado *versus* LES controlado).

A Figura 24 apresenta o boxplot referente aos valores de AUC^{0-24h} do MVA nas fases basal (sem administração de ATV), administração de dose única oral de ATV como monoterapia e administração de dose única oral de ATV associada com GFZ, para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentaos como mediana e interquartis.

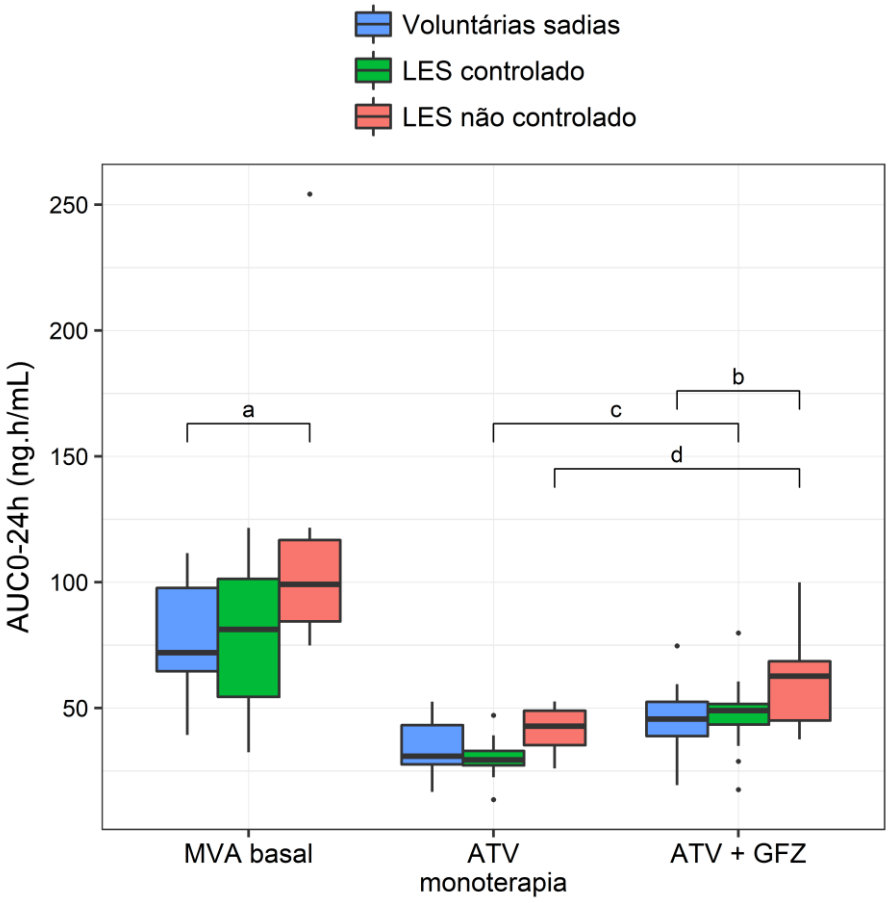


Figura 24: Boxplot referente aos valores de AUC0-24h do MVA nas fases basal (sem administração de ATV), administração de dose única oral de ATV como monoterapia (ATV) e administração de dose única oral de ATV associada com GFZ (ATV + GFZ), para as voluntárias sadias (n=15), pacientes com LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como mediana e interquartis.

A Figura 25 mostra as curvas de concentrações plasmáticas de MVA *versus* tempo (0-24 h) nas fases basal (sem administração de ATV), monoterapia (após administração de dose única de ATV) e associação com GFZ (dose única de ATV no sexto dia do tratamento com GFZ 600 mg/12h) para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. A Figura 19 também mostra as concentrações plasmáticas de ATV e metabólitos ativos obtidas nos mesmos tempos de coleta do MVA. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

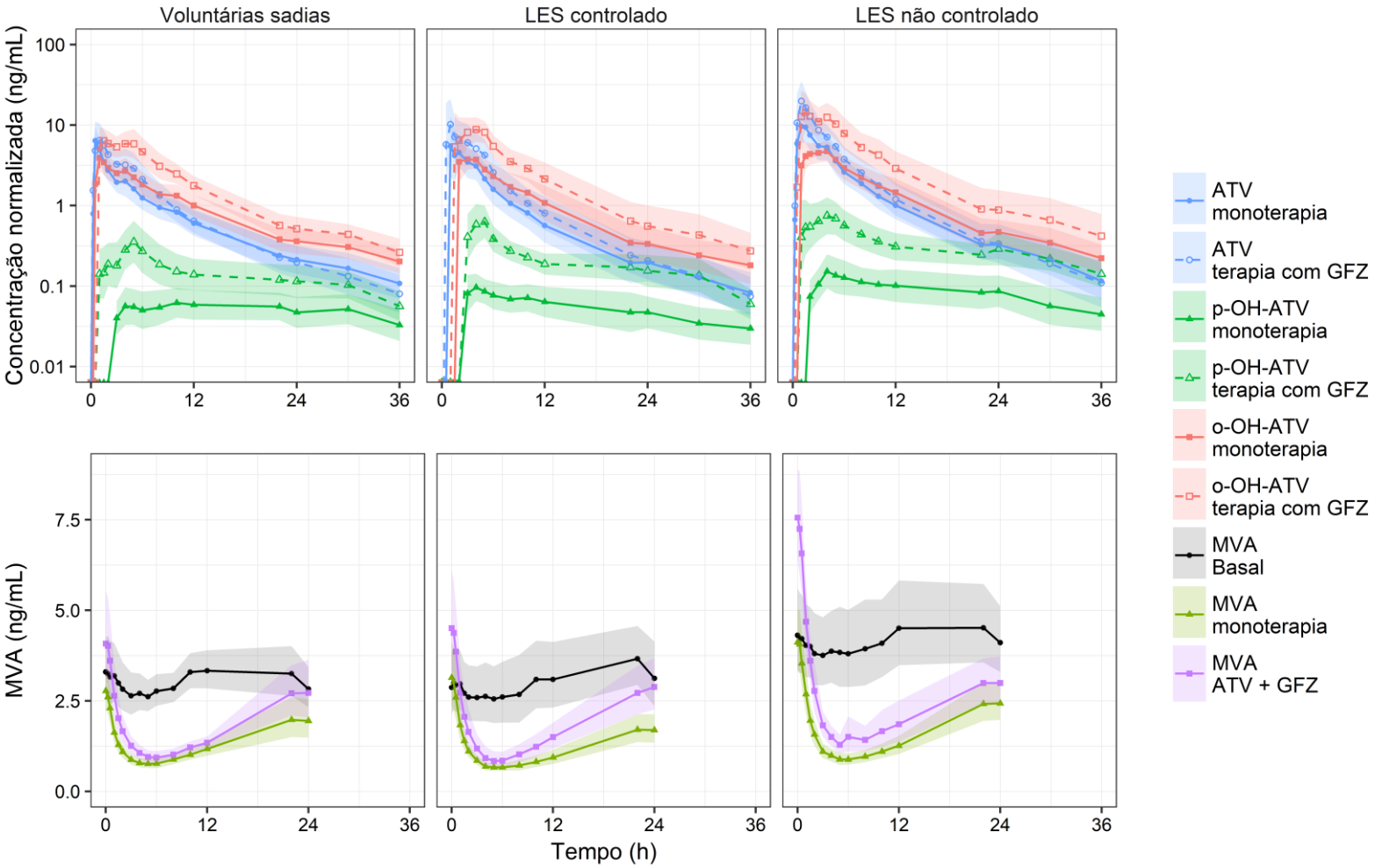


Figura 25: Curvas de concentração plasmática da ATV e seus metabólitos ativos p-OH-ATV e o-OH-ATV versus tempo (zero a 36 h) nas duas ocasiões de administração de dose única oral de ATV (concentrações plasmáticas normalizadas para dose de 20 mg de ATV): Fase I monoterapia e Fase II no sexto dia do tratamento com GFZ 600 mg/12h (painel superior). Curvas de concentração plasmática versus tempo do MVA (0- 24 h) nas fases basal (sem administração de ATV), monoterapia e associação com GFZ (painel inferior) para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e LES não controlado. Os dados estão apresentados como média e IC 95%.

A Figura 26 mostra as áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de ATV somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (o-OH-ATV e p-OH-ATV) e as concentrações plasmáticas de MVA, nas Fases monoterapia e associação com GFZ, obtidas para os grupos de voluntárias sadias (n=15), LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média.

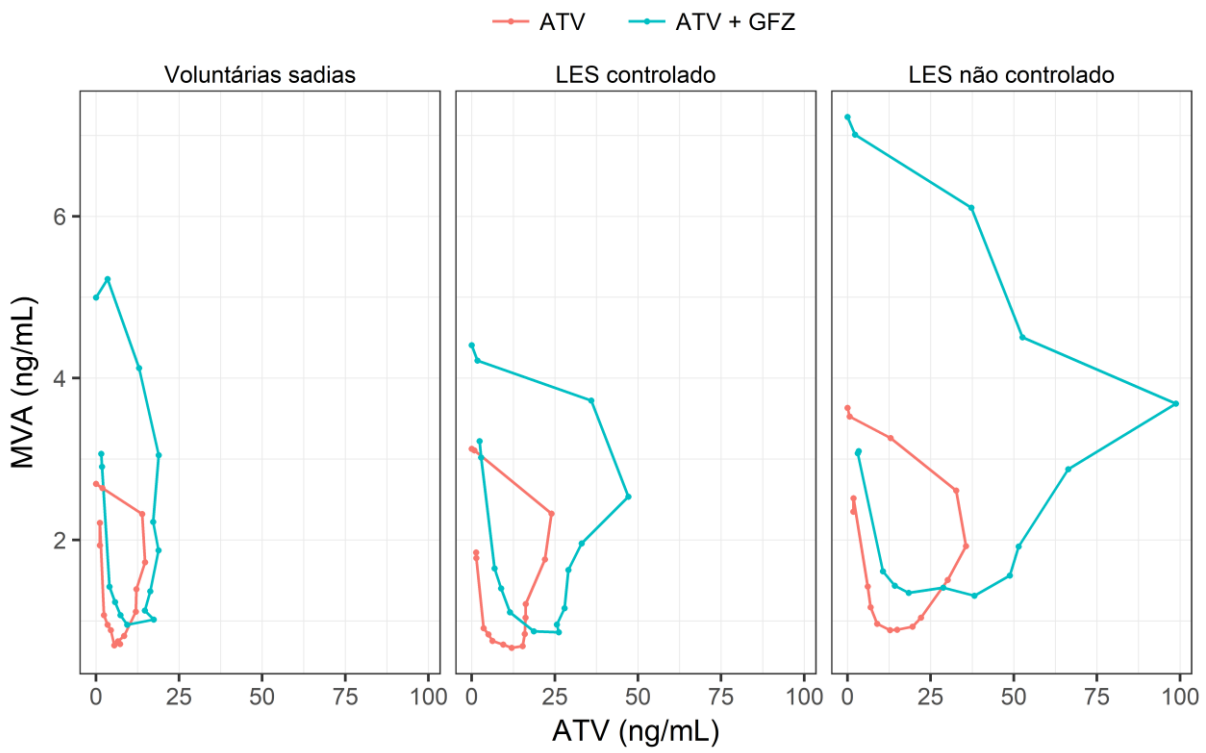


Figura 26: Áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de ATV somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (o-OH-ATV e p-OH-ATV) e as concentrações plasmáticas de MVA, nas Fases monoterapia e associação com GFZ, obtidas para os grupos de voluntárias sadias (n=15), LES controlado (n=13) e LES não controlado (n=12). Os dados estão apresentados como média.

II.5 DISCUSSÃO

O presente estudo visa avaliar o efeito da doença inflamatória, LES, na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, avaliada com base na farmacocinética e farmacodinâmica da ATV associada ou não a GFZ, um fármaco inibidor da atividade do transportador OATP1B1. Foram investigadas 13 pacientes com LES controlado com SLEDAI variando de 0 a 4, idade de 20 a 55 anos e IMC médio de 27,34 Kg/m^2, 12 pacientes com LES não controlado com SLEDAI variando de 6 a 15, idade de 22 a 57 anos e IMC médio de 27,21 Kg/m^2 e 15 voluntárias sadias

com idade entre 18 e 50 anos e IMC médio de 25,78 Kg/m^2 (Tabelas 18-20). Todas as voluntárias sadias e as pacientes com LES controlado exibiram exames bioquímicos dentro da normalidade. No entanto, algumas pacientes com LES não controlado apresentaram aumento de alfa 1 glicoproteína ácida, TGO/AST, glicemia, colesterol total, triglicérides e LDL, assim como discreta redução nos valores de hemoglobina e hematócrito (Tabela 21). As alterações nos exames bioquímicos e hematológicos apresentadas pelas pacientes com LES não controlado são comuns na doença, podendo ser ou não imunomediados (LANNA; FERREIRA; TELLES, 2014). Os estados de doenças associados com inflamação e produção desregulada de citocinas, tais como o LES, resultam em alterações nas concentrações de proteínas plasmáticas, como a diminuição de albumina e o aumento de alfa-1 glicoproteína ácida. A concentração sérica de alfa-1 glicoproteína ácida aumenta de duas a cinco vezes durante uma resposta de fase aguda e, como tal, é definida como uma proteína de fase aguda positiva (SEIFERT et al., 2017).

No presente estudo, as concentrações plasmáticas de MCP-1 e TNF-α estão aumentadas nos grupos LES controlado e LES não controlado, quando comparadas ao grupo de voluntárias sadias. As concentrações plasmáticas de IL-10 também estão aumentadas no grupo LES não controlado quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias (Tabela 22, Figura 18). No estudo realizado por Asanuma et al. (2006), também foi observado aumento das concentrações plasmáticas de MCP-1 em pacientes com LES, uma citocina que exibe correlação com fatores de risco coronarianos. As altas concentrações plasmáticas de MCP-1 estão relacionadas com a redução da atividade da LPL (lipoproteína lipase, enzima responsável pelo proceso de lipólise) e aumento dos níveis de triglicérides (ASANUMA et al., 2006; DE CARVALHO; BONFÁ; BORBA, 2008; SZABÓ; SZODORAY; KISS, 2017). Segundo McCarthy et al. (2014), o aumento das concentrações plasmáticas de TNF-α está relacionado com a atividade da doença, enquanto o aumento das concentrações plasmáticas de IL-10 está relacionado com efeito protetor da progressão da doença, ou seja, a IL-10 promove a proliferação de linfócitos B no ínicio do curso da doença.

Embora o clearance total da ATV seja determinado pelo clearance de influxo sinusoidal OATP1B1 e não pelo clearance metabólico dependente do CYP3A4, a inibição do CYP3A4 poderia resultar em aumento da exposição hepática da ATV e consequentemente em reduções mais acentuadas das concentrações plasmáticas de MVA, o biomarcador da atividade da HMG-CoA redutase (PATILEA-VRANA;

UNADKAT, 2016). Assim, no presente estudo a atividade *in vivo* do CYP3A4 foi avaliada usando o fármaco marcador midazolam, administrado por via oral, com a finalidade de avaliar tanto o CYP3A4 intestinal quanto o hepático (LAMBA et al., 2002). Os valores do clearance oral do midazolam variaram 4,7 vezes entre as pacientes com LES controlado (12,04-56,61 mL/min/Kg), 3,64 vezes entre as pacientes com LES não controlado (18,13-66,02 mL/min/Kg) e 4,04 vezes entre as voluntárias sadias (14,97-60,44 mL/min/kg) (Tabela 23). De acordo com a faixa de referência de 10-40 mL/min/kg, reportada por Lamba et al. (2002), observa-se que nenhuma das participantes apresentaram valores de clearance total aparente do midazolam inferiores a 10 mL/min/kg, no entanto, 40% das voluntárias sadias, 23% das pacientes com LES controlado e 58% das pacientes com LES não controlado, apresentaram valores de clearance total aparente do midazolam maiores que 40 mL/min/kg. Os dados de clearance total aparente do midazolam indicam ausência de inibição do CYP3A4 intestinal e hepático nas pacientes com LES controlado e LES não controlado. Ressalta-se que a inibição do CYP3A4 poderia ter ocorrido principalmente nas pacientes com LES não controlado em função da atividade inflamatória e produção desregulada de citocinas, podendo resultar em infra-regulação de enzimas metabolizadoras. Observa-se ainda que os valores de clearance total aparente do MDZ não diferiram ($p > 0,05$, ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos investigados, um dado que permite sugerir que o metabolismo da ATV não variou entre os grupos investigados.

A administração de dose única oral de ATV (20, 40 ou 80 mg) ao grupo de voluntárias sadias (n=15) resultou em clearance aparente de 742,90 L/h, volume aparente de distribuição de 9005 L e meia-vida de eliminação de 16,57 h (Tabela 25). Os parâmetros farmacocinéticos estão próximos aos relatados por Huang et al. (2017) na investigação de voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg de ATV. Os autores reportaram clearance aparente de 720,0 L/h, volume aparente de distribuição de 11300 L e meia-vida de eliminação de 13,4 h. As razões metabólicas de AUC metabólito ativo/fármaco inalterado observadas no presente estudo para o grupo de voluntárias sadias (Tabela 30) foram de 0,06 para o p-OH-ATV e 0,94 para o o-OH-ATV, enquanto para os metabólitos inativos foram de 1,43 para a ATV-LAC, 0,25 para a p-OH-ATV-LAC e 1,75 para a o-OH-ATV-LAC. Pouco estudos relatam os parâmetros farmacocinéticos dos metabólitos ativos e inativos da ATV. O estudo de Hermann et al. (2006) em voluntários sadios tratados com doses de 10 mg de ATV

durante uma semana mostra razões metabólicas de AUC próximas ao do presente estudo para os metabólitos ativos, sendo 0,16 para o p-OH-ATV e 0,86 para o o-OH-ATV. Em relação aos metabólitos inativos, os valores relatados por Hermann et al. (2006) de 3,5 para a ATV-LAC, 1,82 para a p-OH-ATV-LAC e 29,41 para a o-OH-ATV-LAC estão discrepantes em relação ao presente estudo de dose única provavelmente em função do acúmulo de metabólitos com meias-vidas de eliminação prolongadas no estudo de doses múltiplas. Outros estudos de administração de dose única oral de ATV reportaram apenas as razões metabólicas de AUC para o metabólito ativo o-OH-ATV com valores de 1,25 (HUANG et al., 2017), 1,19 (LIU et al., 2010) ou 0,77 (PARTANI et al., 2014) e, portanto, próximos ao encontrado no presente estudo de 0,94.

A GFZ é um fármaco inibidor do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, mas não do CYP3A4 e dos transportadores MDR1 e BCRP, envolvidos no metabolismo e na secreção biliar da ATV e seus metabólitos (DUAN; ZHAO; ZHANG, 2017; GOOSEN et al., 2007).

No presente estudo, os parâmetros farmacocinéticos da GFZ foram avaliados no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12 h do sexto dia de administração de doses múltiplas orais de 600 mg/12h. Os valores de AUC^{0-12h} (88,84 µg.h/mL), C_{max} (26,73 µg/mL), C_{min} (1,24 µg/mL) e t_{max} (2,28 h) (Tabela 24) estão de acordo com os dados encontrados na literatura para voluntários sadios (ROWER et al., 2010; TORNIO et al., 2008). Os parâmetros farmacocinéticos da GFZ não diferiram ($p > 0,05$, ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos voluntárias sadias, LES controlado e LES não controlado, com valores de concentração plasmática média no estado de equilíbrio variando entre 5,6 a 8,0 µg/mL (Tabela 24).

A administração de doses múltiplas orais de 600 mg/12h de GFZ ao grupo de voluntárias sadias aumentou as concentrações plasmáticas da ATV inalterada (Figura 19). A administração de GFZ aumentou o C_{max} (9,52 *vs* 14,89 ng/mL) e reduziu o volume aparente de distribuição (9005 *vs* 4596 L) da ATV inalterada (Tabela 25 e Figura 21), evidenciando que a inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 pela GFZ impede a distribuição da ATV para o fígado. Os dados observados estão de acordo com estudos anteriores em voluntários sadios que mostram que a administração de GFZ durante 7 dias (600 mg/12 h) aumenta os valores de AUC da ATV inalterada (BACKMAN et al., 2005; WHITFIELD et al., 2011). Em relação aos metabólitos da ATV, a GFZ administrada ao grupo de voluntárias

sadias, aumentou os valores de AUC e C_{max} dos metabólitos hidroxilados ácidos e lactonas da ATV (Figuras 19 e 23 e Tabela 27), metabólitos formados por eliminação pré-sistêmica. No entanto, a exposição sistêmica do metabólito ATV-LAC, metabólito mais lipofílico e provavelmente com distribuição para o fígado menos dependente do transportador OATP1B1, não foi alterada pela GFZ. (Figuras 20 e 23 e Tabela 27) (BACKMAN et al., 2005; WHITFIELD et al., 2011). Ressalta-se que as formas ácidas da ATV e metabólitos hidroxilados são mais hidrossolúveis e mais dependentes do transportador OATP1B1 quando comparadas com as formas lactonas dos metabólitos hidroxilados (BUCHER et al., 2011; NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006).

Os parâmetros farmacocinéticos da ATV inalterada, administrada como monoterapia, foram alterados nas pacientes com LES não controlado quando comparados com o grupo de voluntárias sadias (Tabela 25). As pacientes do grupo LES não controlado mostraram maiores valores de AUC (67,27 *vs* 35,04 ng.h/mL) e C_{max} (21,68 *vs* 9,52 ng/mL) e menores valores de clearance aparente (377,4 *vs* 742,9 L/h) e volume aparente de distribuição (3398 *vs* 9005 L) quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias. Considerando que o LES não controlado é uma doença inflamatória associada com aumento de citocinas plasmáticas (IL-10, MCP-1 e TNF-α; Tabela 22) envolvidas na infra-regulação de transportadores de membranas (SEIFERT et al., 2017), os dados permitem inferir que o LES não controlado reduz a atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 com consequente redução do volume aparente de distribuição e aumento da exposição sistêmica da ATV. Os dados apresentados na Tabela 25 também mostram que as alterações na farmacocinética da ATV dependem da progressão da doença, uma vez que não foram encontradas alterações nas pacientes com LES controlado quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias.

A correlação do clearance aparente da ATV com as citocinas plasmáticas avaliadas no presente estudo (INF-γ, IL-10, IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-α; Tabela 22) foi significativamente relevante somente para a MCP-1, como pode ser observado na Figura 22. Os valores de clearance aparente da ATV são maiores em pacientes com baixas concentrações plasmáticas de MCP-1, tais como aquelas observadas no grupo de voluntárias sadias, enquanto os menores valores de clearance aparente da ATV foram observados nas pacientes com maiores valores de concentrações plasmáticas de MCP-1, tais como aqueles observados no grupo LES não controlado.

A fração livre da ATV foi avaliada na fase monoterapia para as voluntárias sadias, pacientes com LES controlado e pacientes com LES não controlado (Tabela 26). Os valores da fração livre da ATV encontrados para as voluntárias sadias (9,38 %), pacientes com LES controlado (8,81 %) e pacientes com LES não controlado (8,65 %) estão de acordo com os dados da literatura relativos a ligação da ATV às proteínas plasmáticas (>90%) (LENNERNÄS, 2003). Os dados permitem observar que os valores de fração livre da ATV não diferiram ($p > 0,05$, ANOVA com pós teste de Tuckey) entre os grupos investigados (Tabela 26), evidenciando que o LES controlado ou LES não controlado não altera a fração livre da ATV.

A comparação da exposição sistêmica dos metabólitos da ATV entre os grupos LES não controlado e voluntárias sadias (Tabelas 27e 29) permite observar que o LES não controlado aumenta os valores de AUC (100,70 *vs* 59,12 ng.h/mL) e C_{max} (10,78 *vs* 5,21 ng/mL) somente do metabólito inativo ATV-LAC. Considerando os dados apresentados na Tabela 23 relativos ao clearance oral do fármaco marcador do CYP3A4 (midazolam), a capacidade de eliminação pré-sistêmica da ATV-LAC dependente do CYP3A4 não difere entre as pacientes com LES não controlado e as voluntárias sadias. Logo, as maiores concentrações plasmáticas do metabólito ATV-LAC observadas nas pacientes com LES não controlado não podem ser explicadas pelo metabolismo, mas podem ser explicadas pela redução na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, considerando que a ATV-LAC é um metabólito mais lipossolúvel que as formas ácidas, mas também provavelmente dependente do transportador OATP1B1.

De maneira semelhante a monoterapia, os parâmetros farmacocinéticos da ATV inalterada, administrada em associação com a GFZ, foram alterados nas pacientes com LES não controlado quando comparados com o grupo de voluntárias sadias. As pacientes do grupo LES não controlado mostraram maiores valores de AUC (96,16 *vs* 44,78 ng.h/mL) e C_{max} (34,13 *vs* 14,89 ng/mL) e menores valores de clearance aparente (238,30 *vs* 638,80 L/h) e volume aparente de distribuição (1939 *vs* 4596 L) quando comparadas com o grupo de voluntárias sadias. Os dados estão de acordo com o conhecimento de que a GFZ (600 mg/12 h durante 6 dias) reduz a atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 (GOOSEN et al., 2007; WHITFIELD et al., 2011) com consequente redução do volume aparente de distribuição e aumento da exposição sistêmica da ATV.

A comparação dos parâmetros farmacocinéticos da ATV inalterada entre os grupos LES não controlado tratado com GFZ e voluntárias sadias monoterapia (AUC 96,17 *vs* 35,04 ng.h/mL; clearance total aparente 238,30 *vs* 742,90 L/h e volume aparente de distribuição 1939 *vs* 9005 L; Tabela 25 e Figura 21) permite inferir efeito aditivo do processo inflamatório relacionado ao LES não controlado e da associação de GFZ na inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1. Vale ressaltar que as pacientes com LES não controlado (SLEDAI 6-15) apresentaram redução parcial na atividade do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, uma vez que a administração de GFZ também reduziu o volume aparente de distribuição da ATV, inferindo efeito aditivo na inibição da OATP1B1.

Em relação aos metabólitos ativos hidroxilados, metabólitos mais hidrossolúveis e dependentes do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, foi obervado aumento da exposição sistêmica para ambos os metabólitos no grupo de pacientes com LES não controlado tratados com GFZ quando comparados com o grupo de voluntárias sadias monoterapia ($AUC^{0-\infty}$ 183,20 *vs* 46,29 ng.h/mL para o o-OH-ATV e AUC^{0-36h} 15,12 *vs* 2,33 ng.h/mL para o p-OH-ATV; Tabelas 27 e 29). Em relação aos metabólitos inativos hidroxilados lactonas, também foi obervado aumento da exposição sistêmica para todos os metabólitos lactonas no grupo de pacientes com LES não controlado tratados com GFZ quando comparados com o grupo de voluntárias sadias monoterapia ($AUC^{0-\infty}$ 111,50 *vs* 59,12 ng.h/mL para a ATV-LAC; $AUC^{0-\infty}$ 194,20 *vs* 75,65 ng.h/mL para o o-OH-ATV-LAC e AUC^{0-36h} 34,27 *vs* 10,18 ng.h/mL para o p-OH-ATV-LAC; Tabelas 27 e 29).

A farmacocinética da ATV e seus metabólitos não difere entre os grupos LES controlado e voluntárias sadias (Tabelas 25, 27-29), inferindo que a inflamação, e não a doença, é responsável pelas alterações descritas no grupo LES não controlado como consequência da inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1.

No presente estudo, as concentrações plasmáticas do MVA, um precursor do colesterol, foram usadas como parâmetro farmacodinâmico na administração de dose única oral de ATV, considerando que as concentrações plasmáticas do MVA representam a velocidade instantânea da biossíntese do colesterol dependente da atividade da HMG-CoA redutase no fígado (KIM et al., 2011). As concentrações plasmáticas de MVA no presente estudo foram mensuradas como MVL em função da

maior estabilidade e facilidade de extração da forma lactona MVL considerada mais lipossolúvel.

As concentrações plasmáticas de MVA foram avaliadas durante 24 h devido a demonstração de rítmo circadiano, com menores concentrações plasmáticas observadas durante o dia e maiores concentrações plasmáticas observadas durante a noite (PAPPU; ILLINGWORTH, 1994; PARKER et al., 1984). As concentrações plasmáticas de MVA, basais e após a administração de ATV, observadas durante 24 h mostraram ritmo circadiano em todos os grupos investigados, com as menores concentrações observadas em torno das 14:00 h (Figura 25). Assim, a administração de dose única oral de ATV ocorreu sempre no período da manhã, em torno das 8:00 h.

Os valores de AUC^{0-24h}, AUC^{0-6h} e C_{min} do MVA (Tabela 31; Figura 24) reduziram significativamente ($p<0,05$) após a administração de dose única oral de ATV como monoterapia quando comparados com os valores basais em todos os grupos investigados. Os dados permitem observar que a administração de dose única oral de ATV reduziu os valores de AUC^{0-24h} do MVA em aproximadamente 55,66% nas voluntárias sadias, 62,96% nas pacientes com LES controlado e 62,75% nas pacientes com LES não controlado, mas sem significância estatística entre os grupos. A exposição sistêmica do MVA após a administração de ATV mostra sensibilidade como biomarcador da exposição a dose única oral da ATV.

Na fase ATV + GFZ (dose única de ATV no sexto dia após o tratamento com GFZ 600 mg/12h), os valores de AUC^{0-24h} do MVA quando comparados aos valores basais (Tabela 31; Figura 24) reduziram significativamente ($p<0,05$) nos três grupos estudados. A redução na AUC^{0-24h} foi de 41,67% nas voluntárias sadias, 41,65% nas pacientes com LES controlado e 45,07% nas pacientes com LES não controlado. Os valores de MVA obtidos após a administração de ATV em associação com GFZ, não reduziram tanto quanto os valores de MVA obtidos após a administração de ATV como monoterapia. Isso pode ser explicado devido a redução da exposição hepática a ATV em função da GFZ inibir o transportador sinusoidal OATP1B1.

As curvas de concentrações plasmáticas do MVA em função dos tempos de coleta, obtidas no grupo de voluntárias sadias, LES controlado e LES não controlado nas fases basal (sem administração de ATV) e monoterapia (após administração de dose única de ATV) (Figura 25), mostram correlação com as curvas de concentrações plasmáticas de ATV e metabólitos hidroxilados ativos *versus* tempo, ou seja, as

concentrações plasmáticas de MVA diminuem, enquanto as concentrações plasmáticas de ATV e metabólitos hidroxilados ativos aumentam, até aproximadamente 6 h após a administração de ATV. Após essas 6 h, as concentrações plasmáticas de MVA tendem a retornar aos níveis basais (Figuras 25 e 26).

A administração de GFZ (600 mg/12 h durante 6 dias) praticamente não altera as áreas de histerese entre as concentrações plasmáticas de MVA e as concentrações plasmáticas de ATV somadas com as concentrações plasmáticas dos metabólitos ativos hidroxilados (o-OH-ATV e p-OH-ATV) (Figura 26) no grupo de voluntárias sadias. No entanto, a administração de GFZ aumenta discretamente a área de histerese nas pacientes do grupo LES controlado e acentuadamente nas pacientes do grupo LES não controlado. Os dados permitem inferir que o efeito aditivo do LES não controlado e da GFZ na inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1 resulta no aumento das concentrações da ATV e metabólitos ativos hidroxilados no plasma com consequente redução da exposição hepática da ATV e metabólitos ativos hidroxilados. Assim, as concentrações no plasma da ATV e metabólitos ativos não representam suas concentrações no fígado, particularmente no grupo de pacientes LES não controlado.

Concluindo, o LES não controlado (SLEDAI 6-15) aumenta a exposição sistêmica e reduz a exposição hepática da ATV e metabólitos, inferindo inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, uma vez que a atividade *in vivo* do CYP3A4, de acordo com o clearance oral do midazolam, não foi alterada. A inflamação, e não a doença, é responsável pelas alterações descritas no grupo LES não controlado como consequência da inibição do transportador de influxo sinusoidal OATP1B1, uma vez que a exposição sistêmica da ATV e seus metabólitos não foi alterada nas pacientes com LES controlado.

II.6 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP – USP

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

Of. CEP/FCFRP nº. 002/2016
kms

Ribeirão Preto, 25 de janeiro de 2016.

À pós-graduanda
Roberta Natália Cestari
Orientadora: Profª. Drª. Vera Lúcia Lanchote
FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NA ATIVIDADE DO TRANSPORTADOR OATP1B1 EMPREGANDO PK-PD DA ATORVASTATINA**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 392 - CAAE nº 48713615.5.0000.5403,** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 147ª Reunião Ordinária realizada em 16/10/2015.

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

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

Atenciosamente,

Profª. Drª. Elisa Maria de Sousa Russo
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO B – Ofício de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP – USP

2005

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

Ribeirão Preto, 01 de Fevereiro de 2016

Projeto de pesquisa: "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NA ATIVIDADE DO TRANSPORTADOR OATP1B1 EMPREGANDO PK-PD DA ARTOVASTATINA"

Pesquisador responsável: Roberta Natália Cestari e Profª Drª Vera Lúcia Lanchote

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

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

Ciente e de acordo:

Drª Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - HCFMRP-USP

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

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12)

Título do estudo:	Avaliação da influência do lúpus eritematoso sistêmico na atividade do transportador OATP1B1 empregando PK-PD da atorvastatina
Nome da Instituição:	Projeto integrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Nome completo da participante do estudo: _____

Registro da participante do estudo na instituição: _____

Pesquisadores:	Responsável Clínico: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi (HCFMRP/USP) – CPF: 747.593.378-49 – telefone: (16) 3602-2566 Pós-graduanda: Ms. Roberta Natália Cestari CPF: 367.073.208-07 – telefone: (16) 98176-5447 Orientadora: Prof.ª Dra Vera Lucia Lanchote CPF: 033.163.688-33 – telefone: (16) 3315-4699

Data do documento: Versão Final de 04 de dezembro de 2015

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A Senhora está sendo convidada a participar do estudo **"Avaliação da influência do lúpus eritematoso sistêmico na atividade do transportador OATP1B1 empregando PK-PD da atorvastatina"** como participante portador de lúpus. Antes da Senhora decidir se quer ou não participar, é importante que a Senhora entenda porque este estudo está sendo feito e o que ele envolve. Por favor, leia com atenção as informações descritas neste documento e discuta-as, se desejar, com sua família ou amigos. Pergunte ao pesquisador do estudo qualquer coisa que não tenha ficado clara ou que você necessite de mais informações. Use o tempo necessário para a Senhora decidir se deseja ou não participar deste estudo.

A atorvastatina é um remédio seguro e utilizado há muito tempo para tratar o colesterol alto e prevenir as doenças do coração. Pessoas com lúpus eritematoso sistêmico possuem maior chance de desenvolver doenças do coração, sendo necessário, em alguns casos, o uso deste tipo de remédio. A atorvastatina precisa entrar no fígado para fazer o efeito. No entanto, nas pessoas que tem lúpus, o remédio pode não conseguir entrar no fígado fazendo com que o colesterol não abaixe. Então, o objetivo deste estudo é comparar a resposta da atorvastatina em participantes portadores de lúpus e em participantes sadios, nos quais o remédio consegue entrar no fígado e abaixar o colesterol.

Serão convidadas a participar do estudo 45 mulheres com idade entre 18 e 40 anos de idade, que serão divididas em três grupos. O primeiro grupo será composto por 15 participantes portadores de lúpus eritematoso sistêmico com atividade moderada, 15 participantes portadores de lúpus eritematoso sistêmico com atividade leve e 15 participantes sadios.

Caso a Senhora concorde em participar desta pesquisa, a Senhora deverá comparecer em jejum de 8 h na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, localizada no 12º andar para a realização de exames laboratoriais. Será coletada uma amostra de 10 mL de sangue (equivalente a duas colheres de sopa), a qual será encaminhada ao Laboratório Central de Análises Clínicas do HCFMRP/USP para as dosagens de: hemograma para saber a composição do seu sangue; uréia e creatinina para saber a função do seu rim; bilirrubinas, TGP/ALT, TGO/AST, gama-GT e fosfatase alcalina para saber a função do seu fígado; glicemia para saber a quantidade de açúcar no seu sangue; albumina, α1 glicoproteína ácida e proteínas séricas totais para saber a quantidade de proteínas no seu sangue e lipidograma para saber a quantidade de gordura no seu sangue. Também será coletada uma amostra de urina para realizar o exame urina rotina para saber a função do seu rim.

A Senhora precisará ficar internada conforme detalhado a seguir. Cabe esclarecer que essa internação será realizada em local adequado e a Senhora será acompanhada por equipe qualificada. A internação acontecerá na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC). Essa Unidade oferece toda a infraestrutura necessária e equipe de enfermagem altamente qualificada e treinada para a realização de pesquisa clínica. Durante todo o período de internação, a Senhora será monitorada pelo pesquisador responsável pelo estudo e será assistida pela equipe qualificada (enfermagem e médica) em caso de qualquer necessidade. Todo cuidado será tomado pela equipe do estudo para que não aconteçam intercorrências durante a sua participação neste estudo, porém, em caso de qualquer intercorrência a equipe do estudo tomará os cuidados médicos necessários de acordo com o julgamento médico. Durante o estudo haverá coleta de sangue, essa será realizada por equipe treinada e qualificada, no entanto, em toda coleta de sangue pode haver desconforto ou sangramento no local de retirada da amostra de sangue.

O estudo será realizado em duas etapas, sendo que existirá um intervalo de uma semana entre elas.

Na primeira etapa, a Senhora precisará ficar internada durante dois dias e meio (60 h) para a coleta de sangue e terá uma dieta livre de gordura. Nas primeiras 24 h, nós iremos colher 15 (quinze) amostras de sangue da veia do seu braço. Primeiro, nós iremos coletar uma amostra de sangue, através de uma veia do seu braço. Nessa primeira coleta, colocaremos um tubo pequeno de plástico na sua veia, para que a senhora não precise ser mais picada durante as próximas coletas. Depois disso, nós iremos administrar um remédio: um comprimido de 7,5 mg de midazolam via oral (pela boca), um remédio usado para dormir mas no estudo será utilizado para avaliarmos a capacidade do seu fígado de eliminar medicamentos. Os possíveis efeitos adversos do midazolam são sonolência, perda da lembrança recente, dificuldades de expressar emoções e sentimentos, redução da atenção, confusão mental, cansaço, dor de cabeça, tontura, fraqueza muscular, falta de coordenação dos movimentos e visão dupla. Outros efeitos menos comuns são náuseas, dores na barriga, prisão de ventre, má digestão, alteração do desejo sexual e reação alérgica na pele. Este remédio é rapidamente eliminado do corpo da Senhora, em menos de 2 h metade da quantidade deste remédio é eliminada.

Teremos ainda que coletar seu sangue de tempo em tempo, totalizando 15 coletas nesse primeiro dia. Em cada uma delas será coletado 10 mL, equivalente a duas colheres de sopa. Esse sangue coletado será utilizado para saber a quantidade de gorduras no seu sangue e também algumas características genéticas relacionadas com a velocidade de eliminação do midazolam do seu sangue.

Posteriormente, na manhã seguinte, também em jejum nós iremos administrar outro remédio: para um grupo de participantes do estudo nós iremos administrar um comprimido de 20 mg de atorvastatina (um remédio usado para tratar o colesterol alto) via oral, em outro grupo nós iremos administrar um comprimido de 40 mg de atorvastatina via oral e no terceiro grupo nós iremos administrar um comprimido de 80 mg de atorvastatina via oral. A Senhora poderá estar em qualquer um desses grupos, pois a escolha será aleatória. Para a atorvastatina, os possíveis efeitos adversos mais frequentes são dor muscular (28%), aumento das enzimas do fígado 12%) (alterações do seu exame de sangue como aumento na dosagem de substâncias produzidas por seu fígado ou por seus músculos. ,visão embaçada (2%), mas esses efeitos ocorrem com o uso por longo tempo do remédio (geralmente de 1-6 meses após uso diário da atorvastatina) e é mais comum em participantes do estudo com outras doenças pré-existentes e/ou em terapia com outros remédios associados.

Outros efeitos adversos frequentes descritos com uso da atorvastatina são: infecção nas vias respiratórias superiores (nariz, garganta), excesso de açúcar no sangue, sangramento do nariz, enjoo, diarreia, indigestão, dor ou inchaço articular (nas juntas). Outros efeitos menos frequentes incluem pesadelo, barulho no ouvido, hepatite (inflamação no fígado), coceira na pele, mal estar e febre.

Também realizaremos 17 coletas de sangue de tempos em tempos no segundo dia, em cada uma delas será coletado 10 mL, equivalente a duas colheres de sopa. Esse sangue coletado será utilizado para saber a quantidade da atorvastatina e de gorduras no seu sangue. Após 36 h, a senhora receberá alta da enfermaria da UPC e levará para casa um remédio chamado genfibrozila (um remédio usado para tratar o colesterol alto), o qual será doado pelo pesquisador. A Senhora deverá tomar um comprimido de 600 mg a cada doze h (totalizando dois comprimidos ao dia) por cinco dias.

Os efeitos adversos mais frequentes descritos com o uso do genfibrozila incluem náuseas, dores na barriga, prisão de ventre, má digestão, alteração dos batimentos do coração. As reações adversas menos comuns incluem dor de cabeça, vermelhidão na pele. As reações adversas mais raras incluem alterações do seu exame de sangue como aumento na dosagem de substâncias produzidas por seu fígado ou alterações na dosagem de células do seu sangue, inflamação do pâncreas, tonturas, sonolência, sensações de frio ou calor, formigamento ou pressão na pele, depressão, diminuição do desejo sexual, alteração da visão, fraqueza, dor ou cansaço muscular, coceira.

Depois de ter usado a genfibrozila durante uma semana na sua casa, a senhora retornará no sexto dia para a segunda internação, com duração de um dia e meio (36 h). No dia da segunda internação, a Senhora continuará tomando a genfibrozila e receberá também um comprimido de atorvastatina na mesma dosagem que a Senhora tomou na primeira etapa do estudo. Realizaremos novamente 17 coletas de sangue de tempos em tempos, novamente na primeira coleta colocaremos um pequeno tubo de plástico na sua veia, para que a Senhora não precise ser mais picada durante as próximas coletas. Em cada uma delas será coletado 10 mL, equivalente a duas colheres de sopa. Esse sangue coletado será utilizado para medir a quantidade de atorvastatina no seu sangue após a administração de genfibrozila e também a quantidade de gorduras no seu sangue. Após 36 h a Senhora receberá alta da enfermaria da UPC.

Além de coletar o seu sangue, nós também iremos dar a Senhora um frasco para que colete toda a sua urina durante o tempo em que a Senhora ficar internada no hospital.

Os inconvenientes desta pesquisa são as duas internações de 60 h na primeira etapa e 36 h na segunda etapa e a picada da agulha para coleta de sangue, durante a qual a Senhora poderá sentir um pouco de dor e o seu braço poderá ficar roxo no local da picada da agulha. A coleta das amostras será realizada por um profissional treinado que poderá esclarecer qualquer dúvida.

A Senhora tomará apenas 1 comprimido de atorvastatina na primeira etapa, depois a Senhora tomará por 5 dias a genfibrozila em casa e voltará na Unidade de Pesquisa Clínica para a segunda etapa, onde a Senhora tomará mais 1 comprimido de atorvastatina. Portanto, por ser apenas dose única (atorvastatina) e doses repetidas por apenas 5 dias de genfibrozila em casa e 2 dias na Unidade de Pesquisa Clínica, o risco de efeitos adversos é pequeno e a Senhora terá garantia de atendimento médico durante todo o período de internação para qualquer intercorrência que possa acontecer. Caso ocorra algum efeito adverso com a administração dos remédios usados no estudo, esses são normalmente reversíveis e desaparecem em algumas h. É garantida a Senhora assistência integral e gratuita pelo tempo que se fizer necessário para o tratamento de qualquer dano direto ou indireto, imediato ou tardio sofrido no decorrer de sua participação neste estudo.

É necessário que a Senhora forneça todas as informações sobre o seu histórico médico, incluindo medicamentos em uso e doenças pré-existentes. Caso haja dano sofrido no decorrer do estudo, a Senhora terá direito a indenização, conforme resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/12. A pesquisa não será realizada se houver, relacionados à mesma, algum risco proibitivo (ex. conhecida alergia a estatinas ou um dos outros remédios usados no estudo) que venha a se revelar no decorrer do estudo. O pesquisador do estudo se compromete a alertar a Senhora sobre o fato e a suspender, de imediato, sua participação como participante do estudo.

A sua participação no estudo em questão não lhe trará nenhum benefício. Os riscos envolvidos neste estudo são pequenos e sua participação contribuirá muito para entender a ação da atorvastatina no organismo de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

As amostras de urina e algumas amostras de plasma coletadas da Senhora serão enviadas para um laboratório localizado em Orléans na França, para a realização de testes genéticos com o objetivo de identificar componentes do plasma ou da urina que poderão contribuir na individualização da dose da atorvastatina. Ao aceitar participar deste estudo e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a Senhora está concordando que sejam coletadas amostras do seu sangue, que estas amostras sejam enviadas para o exterior, e que lá fiquem armazenadas por um período correspondente ao prazo de duração do estudo, e em seguida destruídas sem comprometer a confidencialidade e respeitando a proteção da privacidade de seus dados. Suas amostras enviadas para a França serão identificadas apenas por um número para que a identidade (nome) da Senhora não seja revelada. O nome do laboratório que receberá suas amostras é "Centre of Excellence in Pharmacokinetics da Servier Tecnology" e o endereço é 5 rue Bel Air, 45000 Orléans, França. O contato com a equipe deste laboratório na França pode ser feito através da sua médica do estudo.

Informamos também que os testes genéticos previstos a serem realizados neste estudo não são diretamente relacionados com outras condições de saúde, sendo assim, os achados do referido estudo não são indicativos de outras características pessoais.

Em relação ao material biológico (amostras de urina e sangue) coletado durante o estudo, respeitando a regulamentação Brasileira, incluindo a Resolução 441 de 12 de Maio de 2011, informamos que os resultados gerais dos testes genéticos serão transmitidos ao pesquisador no final do estudo. A Senhora tem a opção de escolher entre ser informada ou não sobre os resultados de seus testes pelo pesquisador.

O pesquisador a identificará através de um código. Seu nome nunca será mencionado em qualquer relatório ou publicação que possam resultar deste estudo, ou seja, sua identidade será mantida em confidencialidade e sigilo pelo pesquisador e sua equipe de acordo com as leis, resoluções e códigos de conduta profissionais aplicáveis no Brasil se comprometendo a manter em segredo os dados individuais, resultados de exames e testes, bem como informações de seu prontuário médico. Não será permitido o acesso a terceiros.

A decisão de participar ou não do estudo é inteiramente da Senhora, assim como a decisão de permitir que utilizem para análises as suas amostras de sangue coletadas. A Senhora poderá retirar sua permissão de armazenamento de suas amostras de sangue e dos seus dados genéticos a qualquer momento, comunicando sua decisão por escrito e assinada à sua médica do estudo. Mesmo depois de ter concordado em participar, a Senhora ainda tem a liberdade de sair do estudo a qualquer momento. Sua saída não afetará o padrão de tratamento que a Senhora recebe neste serviço de saúde e não lhe trará nenhum dano.

A Senhora receberá informação atualizada durante o estudo e acesso total aos resultados do estudo.

A Senhora e seu acompanhante, quando pertinente, terão direito ao ressarcimento de todas as despesas geradas por sua participação no estudo, incluindo refeições e transporte.

Este estudo foi aprovado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). O CEP/CONEP é um órgão criado para defender os seus interesses de participante do estudo e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa de forma ética.

Para qualquer informação antes, durante ou após a realização do estudo, a Senhora poderá entrar com o pesquisador do estudo ou o CEP nos telefones e endereços descritos em CONTATOS.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será assinado e rubricado em duas vias pela senhora e pelo pesquisador do estudo, sendo que uma das vias ficará com a senhora.

Caso por algum motivo o estudo venha a ser terminado ou interrompido antes do tempo previsto, as razões para esta decisão serão analisadas pelo CEP da instituição onde a Senhora estará sendo acompanhada. O estudo poderá ser terminado somente após a apreciação pelo CEP, levando em consideração o seu bem estar como participante da pesquisa. Em caráter de urgência para garantir a segurança dos participantes, a interrupção poderá ocorrer antes mesmo da avaliação do CEP. Ainda assim, este será comunicado o mais breve possível a respeito das razões do término do estudo.

Certificado de Consentimento

Eu,_____, Prontuário:_____, morador na _____, nº _____, bairro _____, cidade _____, telefone _____, abaixo assinado, declaro que os objetivos e detalhes deste estudo foram explicados a mim. Eu entendo que não sou obrigada a participar do estudo e que posso desistir de continuar nele a qualquer momento, sem que isso prejudique meu atendimento médico. Meu nome não será utilizado nos documentos deste estudo e a confidencialidade dos meus registros médicos garantida.

Tendo recebido as informações acima, concordo em participar do estudo e estou ciente da liberdade de me expressar durante o mesmo, favorável ou contrariamente aos procedimentos e de desistir do estudo em qualquer fase do mesmo.

Ribeirão Preto, _____de _____de _____.

_____ _____

Assinatura da participante do estudo Assinatura do pesquisador responsável

CONTATOS

Pesquisador: Ms. Roberta Natália Cestari (CPF: 367.073.208-07)
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Local: Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo, sala 75A
Endereço: Avenida do Café, s/nº, Monte Alegre Ribeirão Preto/SP, CEP 14040-903
Telefones: (16) 3315-4699
(16) 98176-5447
e-mail: rcestari@fcfrp.usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa
Endereço: Avenida do Café, s/nº, Monte Alegre Ribeirão Preto/SP, CEP 14040-903
Telefone: (16) 3315-4213
(16) 3315-4216
e-mail: cep@fcfrp.usp.br

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados individuais das características antropométricas, escore SLEDAI e exames bioquímicos das pacientes com LES controlado, LES não controlado e voluntárias sadias

Tabela 32: Dados individuais das características antropométricas e escore SLEDAI das pacientes com LES controlado (n=13)

		Escore SLEDAI	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m^2)
LES CONTROLADO	**1**	1	38	75,45	1,57	30,67
	2	4	21	60,35	1,64	22,43
	3	0	34	86,55	1,64	32,00
	4	4	55	75,55	1,52	32,69
	5	4	28	85,00	1,72	28,62
	6	0	39	85,00	1,63	32,07
	7	0	37	64,35	1,75	21,02
	8	0	20	84,30	1,71	28,87
	9	0	29	75,15	1,53	32,11
	10	2	33	47,80	1,60	18,67
	11	0	53	73,10	1,66	26,58
	12	2	50	56,50	1,53	24,14
	13	2	34	67,90	1,63	25,62

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado.

Tabela 33: Dados individuais das características antropométricas e escore SLEDAI das pacientes com LES não controlado (n=12)

		Escore SLEDAI	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m^2)
LES NÃO CONTROLADO	**1**	8	30	52,30	1,50	23,24
	2	6	48	82,50	1,54	34,81
	3	15	22	71,30	1,68	25,26
	4	6	35	68,95	1,49	31,05
	5	9	47	68,75	1,60	26,85
	6	6	57	101,35	1,77	32,38
	7	10	38	53,50	1,58	21,48
	8	6	23	78,80	1,70	27,27
	9	12	34	80,10	1,61	30,90
	10	8	37	70,25	1,63	26,51
	11	12	43	46,80	1,47	21,66
	12	10	29	61,20	1,56	25,18

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como razão entre o peso e a altura ao quadrado.

Tabela 34: Dados individuais das características antropométricas das voluntárias sadias (n=15)

		Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m^2)
VOLUNTÁRIAS SADIAS	**1**	22	69,70	1,58	27,99
	2	42	80,00	1,74	26,60
	3	32	79,85	1,70	27,60
	4	49	80,00	1,62	30,50
	5	33	79,80	1,68	28,29
	6	21	64,75	1,63	24,43
	7	25	61,75	1,62	23,56
	8	35	53,45	1,58	21,46
	9	28	63,20	1,70	21,86
	10	50	62,90	1,67	22,62
	11	33	63,25	1,47	29,28
	12	18	81,95	1,68	29,00
	13	36	57,90	1,65	21,28
	14	26	80,65	1,64	29,98
	15	43	55,60	1,58	22,31

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado.

Tabela 35: Dados individuais dos exames laboratoriais das pacientes com LES controlado (n=13)

		Grupo LES controlado												
	VR	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
Albumina g/dL	3,5 – 4,8	3,90	4,40	3,30	3,90	4,00	4,70	3,90	4,30	3,70	4,70	4,30	3,80	4,25
α-1-GPA mg/dL	50 – 120	170,50	66,10	120,30	133,00	75,50	81,50	129,50	123,10	109,90	79,00	63,10	158,51	87,30
ALT (TGP) U/L	≤ 31,0	9,90	14,50	12,40	16,00	15,70	13,10	9,90	16,20	11,80	10,00	10,20	16,94	11,40
AST (TGO) U/L	≤ 32,0	16,50	16,70	15,30	21,00	23,20	18,60	13,20	21,40	16,40	16,00	17,30	31,50	15,67
Bilirrubina total mg/dL	0,2 – 1,2	0,20	1,13	0,45	0,79	1,45	0,84	0,20	0,62	0,30	0,38	0,59	0,59	0,70
Bilirrubina direta mg/dL	≤ 0,3	0,07	0,23	0,12	0,19	0,36	0,19	0,05	0,17	0,07	0,10	0,10	0,12	0,19
Bilirrubina indireta mg/dL	≤ 0,9	0,14	0,89	0,32	0,59	1,10	0,65	0,14	0,44	0,23	0,28	0,49	0,47	0,51
Creatinina mg/dL	0,7 – 1,5	0,83	0,71	0,85	0,84	0,99	0,85	0,92	0,66	0,93	0,77	0,75	0,59	0,80
Fosfatase Alcalina U/L	65 – 300	311,00	153,00	131,00	247,00	132,00	154,00	159,00	198,00	232,00	116,00	82,00	277,43	132,49
Gama GT U/L	11 – 50	28,00	13,00	38,00	47,00	26,00	30,00	21,00	33,00	49,00	14,00	14,00	16,40	21,47
Glicemia mg/dL	70 – 100	87,00	72,00	82,00	65,00	61,00	76,00	70,00	78,00	77,00	74,00	76,00	83,23	80,90
Colesterol mg/dL	< 200	143,00	112,00	187,00	210,00	163,00	173,00	203,00	117,00	159,00	138,00	213,00	166,59	138,86
Triglicérides mg/dL	< 150	79,00	41,00	110,00	109,00	50,00	187,00	67,00	60,00	91,00	46,00	149,00	30,80	55,76
HDL mg/dL	> 35	31,10	42,30	35,50	58,00	41,70	47,60	59,20	40,50	33,90	48,00	48,10	47,99	40,82
LDL mg/dL	< 130	96,00	62,00	130,00	130,00	111,00	88,00	130,00	65,00	107,00	81,00	135,00	112,00	87,00
Proteínas totais g/dL	6,0 – 8,5	7,00	7,00	7,70	6,50	7,10	7,20	5,90	7,40	7,50	7,50	7,10	7,22	8,01
Ureia mg/dL	10 - 50	27,00	28,00	28,00	33,00	34,00	24,00	22,00	17,00	20,00	32,00	27,00	24,86	23,89

VR: valores de referência; **α-1-GPA: α-1**-glicoproteína ácida; **ALT:** alanina aminotransferase; **TGP:** transaminase glutâmico pirúvica; **AST:** aspartato aminotransferase; **TGO:** transaminase glutâmico-oxalacética; **Gama GT:** gamaglutamiltransferase.

Tabela 36: Dados individuais dos exames laboratoriais das pacientes com LES não controlado (n=12)

		Grupo LES não controlado											
	VR	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Albumina g/dL	3,5 – 4,8	3,70	4,00	3,90	3,14	4,14	2,98	3,99	3,45	3,80	2,81	4,00	2,77
α-1-GPA mg/dL	50 – 120	169,00	136,10	69,00	84,67	84,47	61,26	145,18	195,83	136,81	96,14	94,18	64,80
ALT (TGP) U/L	≤ 31,0	21,00	21,10	16,00	16,03	29,22	47,15	11,89	22,57	15,32	13,70	33,27	38,25
AST (TGO) U/L	≤ 32,0	18,00	17,90	22,00	22,36	21,55	28,95	18,02	43,30	38,74	22,03	30,36	49,91
Bilirrubina total mg/dL	0,2 – 1,2	0,23	0,06	0,22	0,38	0,50	0,26	0,47	0,26	0,34	0,22	0,46	0,20
Bilirrubina direta mg/dL	≤ 0,3	0,41	0,09	0,05	-	0,14	0,08	0,13	0,15	0,05	0,06	0,15	0,10
Bilirrubina indireta mg/dL	≤ 0,9	0,17	0,32	0,17	0,37	0,36	0,18	0,34	0,11	0,30	0,16	0,31	0,11
Creatinina mg/dL	0,7 – 1,5	0,61	0,82	0,56	0,98	0,58	0,75	0,95	0,64	0,63	1,00	0,58	0,78
Fosfatase Alcalina U/L	65 – 300	112,00	200,00	128,00	165,07	243,63	190,49	166,70	516,81	95,03	-	89,03	6,28
Gama GT U/L	11 – 50	50,00	35,00	16,00	11,37	46,67	85,04	29,23	97,71	20,75	21,20	27,26	108,92
Glicemia mg/dL	70 – 100	148,00	91,00	76,00	93,48	74,14	119,40	102,76	83,14	89,81	78,81	70,10	84,62
Colesterol mg/dL	< 200	168,00	170,00	175,00	190,64	131,84	249,75	231,15	125,71	132,50	282,64	196,18	299,55
Triglicérides mg/dL	< 150	81,00	53,00	68,00	388,18	36,93	104,55	162,46	139,57	53,29	120,87	108,14	156,90
HDL mg/dL	> 35	53,00	50,50	47,00	34,21	47,98	61,83	29,63	21,45	41,94	59,08	36,10	75,07
LDL mg/dL	< 130	99,00	109,00	114,00	79,00	76,00	167,00	169,00	76,00	80,00	199,00	138,00	193,00
Proteínas totais g/dL	6,0 – 8,5	6,50	7,50	5,10	8,90	7,04	5,49	7,28	5,85	7,40	4,93	6,26	4,93
Ureia mg/dL	10 - 50	25,00	50,00	23,00	25,78	28,91	46,08	48,66	17,69	21,72	41,33	20,64	29,33

VR: valores de referência; **α-1-GPA:** alfa-1-glicoproteína ácida; **ALT:** alanina aminotransferase; **TGP:** transaminase glutâmico pirúvica; **AST:** aspartato aminotransferase; **TGO:** transaminase glutâmico-oxalacética; **Gama GT:** gamaglutamiltransferase.

Tabela 37: Dados individuais dos exames laboratoriais das voluntárias sadias (n= 15)

		Grupo voluntárias sadias														
	VR	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
Albumina g/dL	3,5 – 4,8	4,30	3,80	3,90	4,00	4,40	4,10	4,30	4,00	4,10	4,40	3,76	4,14	4,18	4,17	4,34
α-1-GPA mg/dL	50 – 120	83,80	88,00	89,00	67,40	97,60	49,00	61,50	54,90	73,60	72,00	100,63	75,67	66,78	72,10	57,22
ALT (TGP) U/L	≤ 31,0	20,30	19,00	13,00	16,80	12,10	12,00	10,20	6,80	15,70	6,00	14,52	14,61	30,36	14,78	14,64
AST (TGO) U/L	≤ 32,0	12,60	20,00	15,00	15,20	13,80	17,00	13,00	19,60	21,30	14,00	19,54	16,04	28,04	19,37	17,75
Bilirrubina total mg/dL	0,2 – 1,2	0,37	0,27	0,37	0,30	0,48	0,38	0,54	0,82	0,39	0,37	0,96	0,54	0,34	0,34	0,64
Bilirrubina direta mg/dL	≤ 0,3	0,11	0,09	0,12	0,08	0,12	0,09	0,15	0,18	0,12	0,10	0,19	0,10	0,11	0,11	0,17
Bilirrubina indireta mg/dL	≤ 0,9	0,26	0,18	0,25	0,22	0,36	0,28	0,38	0,64	0,28	0,28	0,78	0,44	0,23	0,22	0,47
Creatinina mg/dL	0,7 – 1,5	0,69	0,84	0,93	0,76	0,85	0,73	0,83	0,78	0,97	0,74	0,77	0,64	0,58	0,73	0,73
Fosfatase Alcalina U/L	65 – 300	109,00	122,00	114,00	229,00	121,00	133,00	82,00	104,00	-	76,00	155,08	192,91	242,27	211,97	175,23
Gama GT U/L	11 – 50	17,00	20,00	32,00	25,00	30,00	70,00	22,00	55,00	24,00	12,00	14,68	10,66	31,89	12,31	24,21
Glicemia mg/dL	70 – 100	86,00	72,00	77,00	74,00	90.00	91,00	78,00	72,00	78,00	84,00	59,27	81,17	73,70	85,44	-
Colesterol mg/dL	< 200	139,00	271,00	253,00	203,00	212,00	174,00	175,00	137,00	155,00	187,00	180,43	203,13	152,79	129,04	217,33
Triglicérides mg/dL	< 150	84,00	146,00	161,00	149,00	113,00	155,00	133,00	90,00	61,00	80,00	62,36	102,03	34,41	47,96	47,18
HDL mg/dL	> 35	53,60	69,00	72,00	50,70	40,80	48,00	63,50	49,30	45,90	69,00	37,44	65,37	67,46	38,67	66,05
LDL mg/dL	< 130	69,00	173,00	149,00	123,00	149,00	95,00	85,00	70,00	97,00	102,00	131,00	117,00	78,00	81,00	142,00
Proteínas totais g/dL	6,0 – 8,5	7,10	7,20	7,20	6,60	7,50	6,50	6,80	9,70	7,20	6,80	5,80	7,21	6,96	7,15	6,52
Ureia mg/dL	10 - 50	31,00	33,00	25,00	18,00	21,00	22,00	22,00	30,00	24,00	19,00	26,84	16,45	40,29	34,42	28,82

VR: valores de referência; **α-1-GPA:** alfa-1-glicoproteína ácida; **ALT:** alanina aminotransferase; **TGP:** transaminase glutâmico pirúvica; **AST:** aspartato aminotransferase; **TGO:** transaminase glutâmico-oxalacética; **Gama GT:** gamaglutamiltransferase.

Tabela 38: Dados individuais do hemograma das pacientes com LES controlado (n= 13)

		Glóbulos vermelhos 10*6/µL	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Glóbulos brancos 10*6/µL	Plaquetas 10*3/µL
	VR	**3,9 – 5,0**	**12,0 – 15,5**	**35 – 45**	**3,5 – 10,5**	**150 – 450**
LES CONTROLADO	**1**	3,07	9,10	28,00	1,40	197
	2	4,20	11,50	34,00	7,00	186
	3	4,28	13,10	38,00	4,00	316
	4	4,89	13,20	42,00	4,10	342
	5	4,47	14,20	43,00	7,50	278
	6	4,26	13,50	38,00	5,20	260
	7	4,07	11,70	35,00	3,90	326
	8	4,88	13,80	40,00	4,80	315
	9	4,77	12,40	37,00	5,70	343
	10	4,52	13,70	41,00	4,10	241
	11	4,37	13,80	44,00	6,50	226
	12	3,80	10,80	35,00	4,20	435
	13	4,90	13,60	41,00	4,30	169

VR: valores de referência.

Tabela 39: Dados individuais do hemograma das pacientes com LES não controlado (n= 12)

		Glóbulos vermelhos 10*6/µL	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Glóbulos brancos 10*6/µL	Plaquetas 10*3/µL
	VR	**3,9 – 5,0**	**12,0 – 15,5**	**35 – 45**	**3,5 – 10,5**	**150 – 450**
LES NÃO CONTROLADO	**1**	3,84	13,80	40,00	5,60	239
	2	4,62	12,90	39,00	8,30	313
	3	3,57	10,30	32,00	2,00	261
	4	4,43	13,50	41,00	4,20	300
	5	4,44	12,30	36,00	2,50	247
	6	4,05	11,10	34,00	6,20	261
	7	3,83	11,80	35,00	3,20	317
	8	3,86	11,20	33,00	5,50	471
	9	3,38	11,00	33,00	3,00	193
	10	4,02	10,60	33,00	3,80	279
	11	4,37	12,10	36,00	2,00	76
	12	3,69	10,70	31,00	3,90	235

VR: valores de referência.

Tabela 40: Dados individuais do hemograma das voluntárias sadias (n= 15)

		Glóbulos vermelhos 10*6/µL	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Glóbulos brancos 10*6/µL	Plaquetas 10*3/µL
	VR	**3,9 – 5,0**	**12,0 – 15,5**	**35 – 45**	**3,5 – 10,5**	**150 – 450**
VOLUNTÁRIAS SADIAS	**1**	4,64	14,40	42,00	8,40	340
	2	5,10	14,80	43,00	9,60	365
	3	4,58	12,60	37,00	7,30	416
	4	4,77	12,80	38,00	4,80	388
	5	4,47	12,80	37,00	4,90	294
	6	4,00	12,40	37,00	6,90	298
	7	4,63	12,70	38,00	10,50	270
	8	4,32	13,20	40,00	7,90	356
	9	4,53	12,20	38,00	5,10	249
	10	4,24	12,40	37,00	5,40	261
	11	4,03	11,80	35,00	7,80	310
	12	4,72	13,60	43,00	10,90	406
	13	4,18	12,50	37,00	8,10	342
	14	4,37	12,90	37,00	5,90	171
	15	3,95	12,60	37,00	5,10	233

VR: valores de referência.