UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor crônica

Priscila Akemi Yamamoto

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares De Moraes

Araraquara - SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus De Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor crônica

Priscila Akemi Yamamoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Araraquara - SP

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Y22i

Yamamoto, Priscila Akemi
Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes com dor crônica / Priscila Akemi Yamamoto. – Araraquara, 2018.
134 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Natália Valadares de Moraes.

1. Gabapentina. 2. Farmacogenética. 3. Transportadores de fármacos. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. 5. *SLC22A2*. 6. *SLC22A4.* I. Moraes, Natália Valadares de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

PRISCILA AKEMI YAMAMOTO

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE OCT2 E OCTN1 NA DISPOSIÇÃO CINÉTICA DA GABAPENTINA EM PACIENTES COM DOR CRÔNICA

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 15 de junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

NATÁLIA VALADARES DE MORAES
Orientadora

ROSÂNGELA GONÇALVES PECCININI
Titular

FABÍOLA DACH
(participante por vídeo-conferência)
Titular

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas, aos meus pais **Maria** *e* **José**, *por sempre acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente. Por serem a minha base, a minha fonte de energia e motivação para continuar lutando pelos meus sonhos.*

Ao tio **Mitsu**, *o "***Gordo***", que mais do que meu tio e padrinho é meu companheiro de aventuras, que sempre me incentivou e apoiou todas as minhas decisões.*

*À "***Bá***", minha avó* **Sutae** *(in memorian), que nos momentos mais difíceis me recebia com um sorriso e me dizia para seguir em frente. E hoje está comigo nos meus pensamentos e no meu coração.*

E ao meu anjo da guarda, meu irmão **Ricardo** *(in memorian), não importa onde eu estiver você sempre estará comigo me protegendo e me guiando para o melhor caminho.*

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Prof. Dr. Natália Valadares de Moraes, pela confiança depositada em mim para desenvolver esse projeto. Por toda sua dedicação, paciência, compreensão e, por fomentar meu interesse pela pesquisa incentivando meu crescimento profissional e pessoal.

Aos centros coparticipantes, Hospital Estadual Américo Brasiliense, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara, por permitirem a realização do projeto disponibilizando a infraestrutura necessária para o seu desenvolvimento.

Aos profissionais do Centro de Referência Diagnóstica "Professor Doutor Antônio Longo" pela atenção e paciência ao me ensinarem os procedimentos de coleta de amostras durante o meu estágio no Programa de Aperfeiçoamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP.

Aos coordenadores clínicos, Prof. Dr. Fabíola Dach, Dr. Edgar Janhez Júnior e Enf. Marilice Timossi, por aceitarem fazer parte desse desafio! Por auxiliarem na seleção dos pacientes, por todo tempo dedicado para retirar as dúvidas clínicas e burocráticas que surgiram, e pela preocupação com o bom andamento do projeto.

Aos meus companheiros de Grupo de pesquisa, Mariana e Jhohann, por terem dividido comigo todas as preocupações, alegrias e angústias durante o desenvolvimento e validação dos métodos, pela companhia diária e durante as disciplinas e pelas extensas e produtivas discussões de resultados.

À equipe de farmácia e enfermagem do Hospital Estadual Américo Brasiliense, pela contribuição no rastreamento dos pacientes e auxílio durante as coletas de amostras.

Ao Ambulatório de Dor Neuropática/Cefaleia e Enfermaria de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (médicos, residentes e equipe de enfermagem) pela compreensão da importância e dificuldade

de realizar um projeto clínico, pela cooperação durante as coletas de amostras e pela troca de experiências e conhecimento durante o desenvolvimento da etapa clínica deste projeto.

Ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli por ter aceito a colaboração possibilitando a realização da genotipagem dos participantes.

À Prof. Dr. Francine Johansson Azeredo da Universidade Federal da Bahia (UFBA), por ter aceito participar da etapa final do projeto me ensinando a realizar a modelagem farmacocinética populacional, por toda a atenção e tempo disponibilizados durante a colaboração.

Aos técnicos do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pelo auxílio diário e organização do laboratório proporcionando um ambiente de trabalho seguro e dinâmico.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado, ao PADC (Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP) pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste projeto e a PROPG (Pró-Reitoria de Pós-Graduação) da UNESP pelo apoio financeiro com o qual foi possível realizar a modelagem populacional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (docentes, servidores técnico-administrativos) pela dedicação e oportunidade de fazer parte de um curso de mestrado de excelência constatada em nível internacional. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pela infraestrutura e suporte acadêmico, técnico, financeiro e material oferecidos durante toda a minha formação acadêmica!

Magia de la vida

A lo lejos está lloviendo
las nubes se han oscurecido
pero el sol no se ha cansado de brillar.

En medio de la tormenta hay un arcoíris
gritando al mundo que aun en la tempestad
existen los sueños, sólo para recordarnos que la luz
siempre está ahí, sólo falta abrir los ojos del alma
para que no la cubran nuestros miedos.

Los rayos del sol alumbran la oscuridad
de las nubes con lluvia y al mismo tiempo se ilumina
mi vida y despierta la magia que hay dentro de mi...

La sabiduría de la naturaleza
no nos ha rebelado sus secretos...
El mejor maestro es el que
nos deja descubrir las cosas por nosotros mismos.

Al ver tanta vida me siento chiquita, y mis problemas
a veces me dan risa, al ver que lo que de verdad
vale la pena nadie nos lo quita:
la **luz**, el **amor verdadero** y
nuestros sueños...



(Dulce Maria Espinoza Saviñón)

RESUMO

A gabapentina (GAB) é um anticonvulsivante indicado para o tratamento de epilepsia e dor crônica. Possui cinética não linear relacionada a saturação do processo de absorção, não é metabolizada e é eliminada principalmente por excreção renal. Estudos sugerem a atividade dos transportadores de cátions orgânicos (OCT2 e OCTN1) na secreção renal da GAB. O objetivo do estudo foi investigar a influência dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 e outras possíveis covariáveis na disposição cinética da GAB em pacientes tratados com doses múltiplas. Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) para determinação da concentração de GAB no plasma e na urina foram desenvolvidos e validados segundo a RDC nº 27/2012 da ANVISA. Foi utilizado como agente derivatizante o 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno, e como padrão interno o anlodipino. Os métodos apresentaram linearidade na faixa de 200-14.000 ng/mL de plasma e 2-120 µg/mL de urina. Foram investigados 66 participantes (35 mulheres e 31 homens), com idade média de 54 anos e com dor crônica tratados com GAB por pelo menos 7 dias. Os participantes foram genotipados como GG (n=58) e GT (n=8) para o polimorfismo *SLC22A2* c.808G>T e CC (n=31), CT (n= 27) e TT (n=8) para o polimorfismo *SLC22A4* c.1507C>T. As concentrações plasmáticas mínima de GAB no estado de equilíbrio variaram de 402,0 a 11.937,9 ng/mL durante tratamento com doses diárias que variaram de 600 a 3.600 mg. A idade e a taxa de filtração glomerular estimada apresentaram correlação significativa com a razão concentração plasmática mínima de GAB/dose diária. Outras variáveis (sexo, peso corporal e índice de massa corporal) não apresentaram correlação. A taxa de filtração glomerular estimada e a dose diária foram as covariáveis relevantes para predizer a concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio, explicando 68% da variabilidade na concentração plasmática. A análise populacional indicou que apenas a taxa de filtração glomerular possui efeito sob o clearance de GAB. Os polimorfismos *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T não apresentaram influência na razão concentração plasmática mínima da GAB/dose diária e nos parâmetros farmacocinéticos populacionais estimados (constante de absorção, volume de distribuição e clearance). Em conclusão, a farmacocinética clínica da GAB é fortemente influenciada pela função renal e pela saturação dos processos de absorção e não pela farmacogenética de OCT2 e OCTN1.

Palavras-chave: gabapentina; farmacogenética; transportadores de fármacos; polimorfismo de nucleotídeo único; *SLC22A2*; *SLC22A4.*

ABSTRACT

Gabapentin (GAB) is an anticonvulsant indicated for the treatment of epilepsy and chronic pain. It has nonlinear kinetics due to the saturation of absorption process, is not metabolized and is mainly eliminated by renal excretion. Studies suggest the activity of organic cation transporters (OCT2 and OCTN1) in the renal excretion of GAB. The aim of this study is to investigate the influence of genetic polymorphisms of OCT2 and OCTN1 and other possible covariates on the kinetic disposition of GAB in patients treated with multiple doses. High performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) methods for the determination of GAB plasma and urine concentration were developed and validated according to RDC nº 27/2012 of ANVISA. 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene was used as derivatization agent, and amlodipine as internal standard. The methods showed linearity in the range of 200-14,000 ng/mL of plasma and 2-120 µg/mL of urine. Sixty-six participants (35 women and 31 men), with mean age of 54 years and with chronic pain treated with GAB for at least 7 days were investigated. They were genotyped as GG (n=58) and GT (n=8) for *SLC22A2* c.808G>T polymorphism and as CC (n=31), CT (n=27) and TT (n=8) for *SLC22A4* c.1507C>T polymorphism. GAB steady-state minimum plasma concentrations ranged from 402.0 to 11,937.9 ng/mL during the treatment with daily doses ranging from 600 to 3,600 mg. Age and estimated glomerular filtrate rate showed significant correlation with the plasma concentration of GAB/daily dose ratio. Other variables (gender, body weight and body mass index) were not correlated. The estimated glomerular filtration rate and daily dose were found as significant covariates to predict GAB minimum plasma concentration at steady-state, explained 68% of plasma concentration variability. The population pharmacokinetics showed that GAB clearance was affected only by the glomerular filtration ratio. *SLC22A2* c.808G>T and *SLC22A4* c.1507C>T polymorphisms did not influence the GAB minimum plasma concentration/daily dose ratio and the estimated population pharmacokinetic parameters (first-order absorption rate constant, volume of distribution and clearance). In conclusion, gabapentin clinical pharmacokinetics is strongly influenced by renal function and the absorption process saturation and not by the pharmacogenetics of OCT2 and OCTN1.

Key-words: gabapentin; pharmacogenetics; drug carriers; single nucleotide polymorphism; *SLC22A2*; *SLC22A4.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da gabapentina (GAB) (A) e do ácido γ-aminobutírico (GABA) (B).. 3
Figura 2. Transportadores envolvidos na disposição cinética da GAB..... 6
Figura 3. Localização dos polimorfismos de base única (SNP) com frequência maior ou igual a 1% na estrutura secundária predita da proteína OCT2. 13
Figura 4. Localização dos polimorfismos de base única (SNP) na estrutura secundária predita da proteína OCTN1. 17
Figura 5. Protocolo de preparo de amostra de plasma para análise de GAB por CLAE-UV. 25
Figura 6. Protocolo de preparo de amostra de urina para análise de GAB por CLAE-UV.. 26
Figura 7. Amostras de urina doadas por voluntários sadios..... 29
Figura 8. Estudo do tamanho amostral (grupo experimental) em relação ao poder do teste. 35
Figura 9. Fluxograma da seleção dos participantes e do protocolo clínico do estudo. . 37
Figura 10. Cromatogramas referentes à análise da gabapentina e do padrão interno (anlodipino) em plasma e urina humana por CLAE-UV. 45
Figura 11. Cromatogramas obtidos para o efeito residual em plasma (superior) e urina (inferior)..... 46
Figura 12. Análise da linearidade. 47
Figura 13. Gráficos da %erro *vs*. concentração de gabapentina, em plasma e urina, comparando a regressão linear ordinária com a regressão linear após utilizar ponderação. 50
Figura 14. Fluxograma do recrutamento dos participantes do estudo..... 53
Figura 15. Concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio (n=64)..... 56
Figura 16. Relação entre a porcentagem da dose excretada inalterada na urina durante o intervalo de dose no estado de equilíbrio (Ae %) e a dose diária (mg/dia) 57
Figura 17. Comparação da razão da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio pela dose diária ($Cp_{mín}$/DD) entre homens e mulheres (n=64).. 58

Figura 18. Correlação entre as variáveis (eTFG, idade, peso corporal, IMC) e a razão da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio pela dose diária ($Cp_{mín}$/DD). 59
Figura 19. Análise representativa da qualidade do gDNA extraído por eletroforese em gel de agarose 0,5%, a 70 V por 1 hora e 30 minutos (n=18)..... 60
Figura 20. Efeito do genótipo de OCT2 e OCTN1 na razão entre a concentração plasmática mínima de GAB e a dose diária ($Cp_{mín}$/DD). 61
Figura 21. Predição da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio ($Cp_{mín}$)..... 63
Figura 22. Gráfico de concentração plasmática pelo tempo dos dados observados (n=53)..... 64
Figura 23. Gráficos de correlação entre o efeito aleatório dos parâmetros farmacocinéticos (η) e as covariáveis investigadas..... 66
Figura 24. Correlação entre concentração plasmática observada e concentração plasmática populacional (A) e individual predita (B)..... 68
Figura 25. Distribuição dos resíduos. 69
Figura 26. Distribuição dos efeitos aleatórios (η)..... 70
Figura 27. Gráfico de verificação dos valores preditos (VPC, *visual predictive check*). 70
Figura 28. Reação de derivatização da GAB com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB).. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substratos e inibidores dos transportadores OCT2 e OCTN1 13
Tabela 2. Polimorfismos do gene *SLC22A2* e a frequência dos alelos raros em diferentes grupos étnicos 14
Tabela 3. Polimorfismos do gene *SLC22A4* e a frequência dos alelos raros em diferentes grupos étnicos 17
Tabela 4. Concentrações dos controles de qualidade em plasma e urina..... 28
Tabela 5. Reagentes e condições da reação de RT-PCR utilizados para genotipagem. 40
Tabela 6. Teste-F realizado para avaliar a homocedasticidade dos dados (n=3)..... 48
Tabela 7. Parâmetros da regressão linear (y= ax + b) obtidos utilizando diferentes pesos (w_i) e suas respectivas somatórias dos erros relativos (∑%erro) 49
Tabela 8. Precisão e exatidão (intracorrida e intercorrida) da gabapentina em plasma e urina humana por CLAE-UV..... 51
Tabela 9. Estabilidade da gabapentina em matrizes biológicas (plasma e urina) e em solução (n=3) 52
Tabela 10. Características demográficas e antropométricas dos participantes (n=66) . 54
Tabela 11. Dados clínicos dos participantes (n=66) 54
Tabela 12. Medicamentos de uso crônico mais prescritos para os participantes (n=66) . 55
Tabela 13. Quantidade de gabapentina excretada inalterada na urina 57
Tabela 14. Frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T. 61
Tabela 15. Regressão linear múltipla para estimar a contribuição das variáveis na predição da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio, $Cp_{mín}$ (n=53). 62
Tabela 16. Verossimilhança e critérios de informação de Akaike..... 64
Tabela 17. Correlação de Pearson e/ou ANOVA entre os efeitos aleatórios (η) e as covariáveis 65
Tabela 18. Verossimilhança e critérios de informação de Akaike após adição de uma covariável..... 67
Tabela 19. Equações do modelo populacional e parâmetros estimados..... 67
Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina obtidos de estudos clínicos após administração em dose múltipla 102

Tabela 21. Métodos bioanalíticos para quantificação de gabapentina descritos na literatura de 2007-2017 104
Tabela 22. Características demográficas e antropométricas dos participantes (n=66) 107
Tabela 23. Dados clínicos dos participantes (n=66) 109
Tabela 24. Outros medicamentos utilizados pelos participantes (n=66)..... 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5q31.1 – Braço longo do cromossomo 5, na região 3, banda 1, sub-banda 1

6q25.3 – Braço longo do cromossomo 6, na região 2, banda 5, sub-banda 3

AA – Africano-americano

ABCB1 - ATP-binding cassette sub-family B member 1

AIC – *Akaike Information Criterion* (critérios de informação de Akaike)

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS – Asiático-americano

AVP – Ácido valpróico

$b^{0,+}$ – Sistema $b^{0,+}$ de transporte de aminoácidos

BCRP – Proteína de resistência a câncer de mama

BeWo – Células trofoblásticas humanas

BHE – Barreira hematoencefálica

BID – *Twice a day* (duas vezes ao dia)

BR – Brasileiros – região sudeste

CA – Caucasianos

Caco-2 – Células de adenocarcinoma de cólon humano

cDNA – DNA complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CG – Cromatografia gasosa

CHO – *Chinese Hamster Ovary* (células derivadas do ovário do hamster chinês)

CKD-EPI – *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta

CMT – Neuropatia hereditária de Charcot-Marie-Tooth

CMV – Citomegalovírus

$Cp_{mín}$/DD – Razão entre concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio pela dose diária

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

$C_{ss}C$ – Cistina

CV – Coeficiente de variação

DD – Dose diária

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

EA – Europeu-americano

EC – Eletroforese capilar

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EFNS – European Federation of Neurological Sciences

EFS – Extração em fase sólida

EI/MS – *Electron ionization-mass spectrometry*

ELL – Extração líquido-líquido

EMA – *European Medicines Agency*

ENT – Transportador de nucleosídeo equilibrativo

EPR – Erro padrão relativo

eTFG –Taxa de filtração glomerular estimada

ETL – Etilista

FCF-UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP

fd – Fator de diluição

FDA – *Food and Drug Administration*

FDNB – 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno

F_{exp} – Valor de F experimental

F_{tab} – Valor de F tabelado

GAB – Gabapentina

GABA – Ácido γ-aminobutírico

$GABA_A$ – Receptor de GABA classe A

$GABA_B$ – Receptor de GABA classe B

gDNA – DNA genômico

Gli-Glu – Dipeptídeo glicina-glutamato

GLUT – Transportador de glicose

HC-FMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HEAB – Hospital Estadual Américo Brasiliense

HILIC – *Hydrophilic interaction liquid chromatography* (Cromatografia líquida de interação hidrofílica)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC – Índice de Massa Corporal

IWRES – *Individual weighted residuals* (resíduos individuais ponderados)

JEG-3 – Células placentárias humanas

LAT – Transportador de aminoácidos do tipo L

LAT1 – Transportador de aminoácidos do tipo L 1

LAT2 – Transportador de aminoácidos do tipo L 2

LEV – Levetiracetam

LIF – *Laser-induced fluorescence* (fluorescência induzida por laser)

LIQ – Limite inferior de quantificação

LSQ – Limite superior de quantificação

MATE – Transportador de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas

MCT – Transportador de ácido monocarboxílico

ME – Mexicano-americano

ME – Microextração

MPP^+ – $[^3H]$-1-metil-4-fenilpiridina

MRP – Proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos

MS/MS – Espectrometria de massas em tandem

MS/SAS – Ministério da Saúde/Secretaria de Atenção à Saúde

MT – Monitorização terapêutica

NMDA – N-metil D-aspartato

NPDE – *Normalized prediction distribution errors* (distribuição dos erros preditos normalizada)

OAT – Transportador de ânions orgânicos

OATP – Polipeptídeo transportador de ânions orgânicos

OCT – Transportador de cátions orgânicos

OCT2 – Transportador de cátions orgânicos 2

OCTN1 – Transportador de cátions orgânicos/ergotioneína

OCTN2 – Transportador de cátions orgânicos/carnitina

P-gp – Glicoproteína-P

PEPT1 – Transportador de peptídeos 1

PGB – Pregabalina

PI – Padrão interno

PIDC – Polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica

PP – Precipitação de proteína

PWRES – *Population weighted residuals* (resíduos populacionais ponderados)

QD – *Once daily* (uma vez ao dia)

QID – *Four times a day* (quatro vezes ao dia)

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RP – *Reverse phase* (fase reversa)

rs – Número de referência do *SNP*

RT-PCR – Reação de polimerase em cadeia em tempo real

SBED – Sociedade Brasileira para Estudo da Dor

SCA – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara

SDCR – Síndrome de dor complexa regional

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SLC22A2 – Solute carrier family 22 member 2

SLC22A4 – Solute carrier family 22 member 4

SLC7A5 – Solute carrier family 7 member 5

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de base única)

SVS/MS – Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde

TARV – Terapia antirretroviral

TBG – Tabagista

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE – Tampão Tris-EDTA

TEA – Tetraeilamônio

TID – Three times a day (três vezes ao dia)

TOP – Topiramato

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UHPLC – *Ultra performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de ultra pressão)

URAT – Transportador de urato

UV-VIS – Ultravioleta-visível

VBG – Vigabatrina

VII – Variabilidade interindividual

VPC – *Visual predictive check* (verificação visual dos dados preditos)

LISTA DE SÍMBOLOS

-2LL – *-2×log-likelihood* (verossimilhança)

η – Efeito aleatório dos parâmetros farmacocinéticos

τ – Intervalo de doses

χ^2 – Qui-quadrado

2pq – Frequência do genótipo heterozigoto

aa^0 – Aminoácidos neutros

Ae – Quantidade do fármaco eliminado inalterado na urina

$ASC^{0-\infty}$ – Área sob a curva concentração plasmática *vs*. tempo de zero a infinito

ASC^{0-24} – Área sob a curva concentração plasmática *vs*. tempo de zero a 24 horas

ASC^{0-8} – Área sob a curva concentração plasmática *vs*. tempo de zero a 8 horas

B – Coeficiente de regressão

Cl – Clearance

Cl_{CR} – Clearance de creatinina

Cl_R – Clearance renal

$C_{máx}$ – Concentração plasmática máxima

$Cp_{mín}$ – Concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio

Cr_S – Valor de creatinina sérica

Cu – Concentração de gabapentina na urina

ka – Constante de absorção

kb – Kilobase

ke – Constante de eliminação

p – Frequência do alelo selvagem

p^2 – Frequência do genótipo homozigoto para o alelo selvagem

q – Frequência do alelo raro

q^2 – Frequência do genótipo homozigoto para o alelo raro

r – Coeficiente de correlação de Spearman

R^2 – Coeficiente de determinação

S^2 – Variância

$t_{1/2}$ – Meia-vida

$t_{máx}$ – Tempo para atingir a concentração plasmática máxima

V ou Vd – Volume de distribuição

w_i – Fator peso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DA LITERATURA 2
2.1 Gabapentina (GAB) 2
2.1.1 Mecanismo de ação 3
2.1.2 Farmacocinética 4
2.1.3 Parâmetros farmacocinéticos após administração em dose múltipla 9
2.1.4 Influência de variáveis na disposição cinética da GAB 9
2.1.4.1 Alimentação 9
2.1.4.2 Sexo e Idade 10
2.1.4.3 Regime posológico (intervalo de doses, τ) 11
2.2 Transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) 12
2.3 Transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1 (OCTN1) 15
2.4 Métodos bioanalíticos para quantificação de GAB 19
3 OBJETIVOS 21
3.1 Objetivos específicos 21
3.1.1 Desenvolver e validar métodos bioanalíticos para quantificação de GAB em plasma e urina humana 21
3.1.2 Investigar a influência dos polimorfismos SLC22A2 c.808G>T e SLC22A4 c.1507C>T na disposição cinética da GAB; 21
3.1.3 Investigar a influência de variáveis demográficas (idade, sexo), dados antropométricos (peso corporal) e variáveis clínicas (clearance de creatinina, índice de massa corporal) na disposição cinética da GAB; 21
3.1.4 Estimar os parâmetros farmacocinéticos da GAB por análise populacional. .. 21
4 MATERIAL E MÉTODOS 22
4.1 Métodos bioanalíticos para análise de GAB em plasma e urina 22
4.1.1 Reagentes 22
4.1.2 Soluções-padrão 22
4.1.3 Equipamento e condições cromatográficas 23
4.1.4 Preparo das amostras 24
4.1.4.1 Plasma 24
4.1.4.2 Urina 25
4.1.5 Validação de métodos bioanalíticos 27

4.1.5.1 Preparo dos controles de qualidade (CQ) 27
4.1.5.2 Seletividade 28
4.1.5.2.1 Plasma 28
4.1.5.2.2 Urina 28
4.1.5.3 Curva de calibração/Linearidade 29
4.1.5.4 Efeito residual 30
4.1.5.5 Precisão e Exatidão 30
4.1.5.6 Estabilidade 31
4.1.5.6.1 Estabilidade de curta duração 31
4.1.5.6.2 Estabilidade de pós-processamento 31
4.1.5.6.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento 32
4.1.5.6.4 Estabilidade de longa duração 32
4.1.5.6.5 Estabilidade da GAB e do PI em solução 32
4.2 Protocolo clínico 33
4.2.1 Participantes, locais de recrutamento e coordenadores clínicos 33
4.2.2 Critérios de inclusão 33
4.2.3 Critérios de exclusão 34
4.2.4 Cálculo do tamanho amostral 34
4.2.5 Protocolo clínico 35
4.3 Genotipagem 38
4.3.1 Extração de DNA genômico humano 38
4.3.2 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) 39
4.4 Análise estatística 40
4.5 Análise farmacocinética populacional 41
5 RESULTADOS 44
5.1 Análise da GAB em plasma e urina por CLAE-UV 44
5.2 Etapa clínica 52
5.2.1 Participantes 52
5.2.2 Determinação da concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio e da quantidade de GAB excretada inalterada na urina 55
5.2.3 Correlação entre a concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio e as possíveis covariáveis 57
5.2.4 Extração de DNA genômico humano 59

5.2.5 Genotipagem dos polimorfismos por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) 60
5.2.6 Regressão linear múltipla da GAB 62
5.2.7 Análise farmacocinética populacional 63
6 DISCUSSÃO 71
6.1 Análise da GAB em plasma e urina por CLAE-UV 71
6.2 Farmacocinética clínica da GAB 74
7 CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 83
ANEXOS 94
APÊNDICES 102

1 INTRODUÇÃO

A gabapentina (GAB) é um anticonvulsivante de segunda geração indicado, no Brasil, para o tratamento de epilepsia e dor neuropática. É utilizada na clínica como tratamento de primeira escolha para diversos tipos de dor neuropática (Attal e tal., 2010). Este fármaco apresenta biodisponibilidade oral variável, não é metabolizado e não se liga à proteínas plasmáticas (Stewart et al., 1993; Patsalos et al., 2008; Patsalos et al., 2017). A excreção urinária é a principal forma de eliminação da GAB e dados da literatura sugerem que o clearance renal envolve a secreção tubular via transporte mediado por transportadores de cátions orgânicos (OCT2 e OCTN1) (Urban et al., 2008; Lal et al., 2010). Os genes *SLC22A2* e *SLC22A4* que codificam os transportadores OCT2 e OCTN1, respectivamente, são polimórficos. O polimorfismo de base única (SNP) *SLC22A4* c.1507C>T apresenta frequência de 32,9% em brasileiros da região sudeste e dados da literatura demonstram que a especificidade do transportador OCTN1 por diversos de seus substratos é alterada na presença deste SNP (Urban et al., 2008; Refargen, 2014; Bonifaz-Peña et al., 2014). Por outro lado, o polimorfismo *SLC22A2* c.808G>T, com frequência de 11,9% em brasileiros está relacionado a redução da atividade de OCT2 (Choi; Song, 2008; Song et al., 2008; Wang et al., 2008; Refargen, 2014; Bonifaz-Peña et al., 2014). Tendo em vista que a GAB tem sido descrita como substrato de OCT2 e OCTN1, espera-se que o polimorfismo genético dos transportadores possa explicar, pelo menos parcialmente, a variabilidade na disposição cinética da GAB.

Devido a ausência de metabolismo e ausência de ligação as proteínas plasmáticas em humanos, a GAB pode ser considerada um bom modelo para o estudo dos transportadores OCT2 e OCTN1. Este estudo clínico foi realizado em pacientes em uso contínuo da GAB para a investigação do impacto dos polimorfismos *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T nos seus principais parâmetros farmacocinéticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gabapentina (GAB)

A gabapentina (GAB) é um anticonvulsivante que tem sido utilizado na prática clínica para o tratamento de diversas condições de dor neuropática. Estudos clínicos randomizados e controlados por placebo mostraram sua eficácia na redução da intensidade e frequência da dor em pacientes com neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética, neuropatia relacionada ao HIV e outras síndromes de dor neuropática (Backonja et al., 1998; Rowbotham et al., 1998; Rice et al., 2001; Serpell et al., 2002; Tai et al., 2002; Hahn et al., 2004; Levendoglu et al., 2004). Além disso, estudos clínicos indicam o uso de GAB para o tratamento das ondas de calor em mulheres pós-menopausa, e de seu pró-fármaco (gabapentina enacarbil) para o tratamento da síndrome das pernas inquietas (Garcia-Borreguero et al., 2002; Guttuso et al., 2003; Butt et al., 2008; Lee et al., 2011; Lal et al., 2012; Winkelman et al., 2016; Cobin; Goodman, 2017).

A dor é considerada como prioridade global de saúde pública (Goldberg; McGee, 2011). De acordo com a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED), estudos sobre dor crônica mostram que a prevalência no Brasil varia de 30 a 50% (De Siqueira, 2017). A prevalência de dor crônica no Brasil foi estimada após 723 participantes distribuídos pelo país serem entrevistados, foi observado prevalência de 39% de dor crônica, com maior prevalência nas regiões Sul e Sudeste (De Souza et al., 2017). Devido ao aumento da população idosa, incidência de diabetes e melhora da sobrevivência de pacientes com câncer, o número de pessoas afetadas pela dor neuropática tende a aumentar (Bennett, 2015).

A portaria MS/SAS Nº 1.083, de 02 de outubro de 2012, aprovou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica, o qual indica a associação de

antiepilépticos (como a gabapentina) para o tratamento da dor neuropática nos casos em que não há resposta ao tratamento com antidepressivos tricíclicos (Brasil, 2012a). De acordo com o guia sobre o tratamento farmacológico da dor neuropática da Federação Europeia de Ciências Neurológicas (*European Federation of Neurological Sciences, EFNS*) a GAB é recomendada como tratamento de primeira escolha para diversas condições de dor neuropática, como por exemplo a neuropatia diabética, a neuralgia pós-herpética e a dor central (Attal et al., 2010).

A dose terapêutica usual para epilepsia e dor neuropática varia de 300 a 1.200 mg, três vezes ao dia (*TID, three times a day*). O tratamento é iniciado com 900 mg/dia administrada em três doses igualmente divididas, o aumento da dose é gradual até uma dose máxima de 3.600 mg/dia (Tjandrawinata et al., 2014; Finnerup et al., 2015).

2.1.1 Mecanismo de ação

Apesar da sua semelhança estrutural com o neurotransmissor GABA (ácido γ-aminobutírico) (Figura 1), a GAB parece não interagir com os receptores de $GABA_A$ ou $GABA_B$ no cérebro ou na medula espinhal (Krasowski; McMillin, 2014; Kremer et al., 2016).

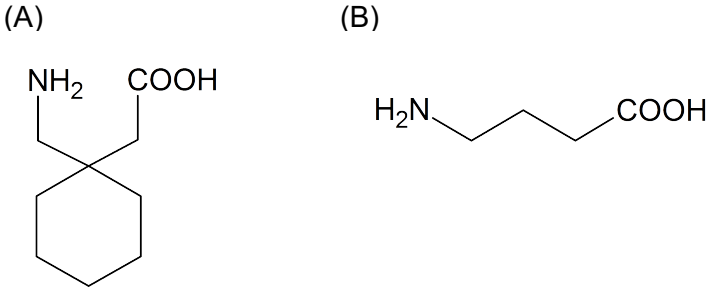


Figura 1. Estrutura química da gabapentina (GAB) (A) e do ácido γ-aminobutírico (GABA) (B). Ilustração: Próprio autor.

Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. Estudos mostraram que a GAB se liga à subunidade α2δ (alfa-2-delta) dos canais de cálcio voltagem-

dependentes interrompendo o transporte de cálcio, o que leva a inibição da formação de uma nova sinapse excitatória no sistema nervoso central ou a inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios (Maneuf et al., 2003; Hendrich et al., 2008; Eroglu et al., 2009; Dickens et al., 2013). No entanto, devido à diversidade da expressão dos canais de cálcio no cérebro e nos músculos, os resultados da ação da GAB nesses canais são contraditórios. Além disso, diferentes regiões do neurônio possuem diferentes componentes de canal de cálcio. Portanto, o local do neurônio onde o canal de cálcio é expresso pode ser importante para o mecanismo de ação da GAB e não seu subtipo. Dados sugerem que os canais de cálcio encontrados na sinapse podem mediar o efeito da GAB (Offord; Isom, 2016).

Outros mecanismos de ação foram propostos para a GAB, entre eles, efeitos em receptores NMDA, canais de sódio, vias monoaminérgicas, no sistema opioide e canabinoide, efeito indireto em componentes neuroimunes (Clivatti; Sakata; Issy, 2009; Kukkar et al., 2013; Kremer et al., 2016).

2.1.2 Farmacocinética

A GAB é classificada, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e o *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS)*, como Classe III, pois apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade (Benet; Broccatelli; Oprea, 2011; Rocha et al., 2016). Após a administração oral, a GAB é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal ($t_{máx}$ 2-3 horas) (Patsalos et al., 2008; Krasowski; McMillin, 2014). A GAB é principalmente absorvida no intestino delgado com maior eficiência de absorção na região duodenal (Chen; Cowles; Sweeney, 2013). Uma vez que a GAB apresenta baixa permeabilidade, sua rápida absorção pode ser explicada pela captação mediada por transportadores expressos

nas células intestinais. A cinética da GAB é não linear, mesmo em doses terapêuticas, e sua biodisponibilidade é variável (biodisponibilidade oral 29-60%). A biodisponibilidade diminui com o aumento da dose, o que está provavelmente relacionado com a sua absorção limitada devido à saturação do transportador de aminoácidos do tipo L (LAT) (Figura 2A) (Stewart et al., 1993; Gidal et al., 1998; Patsalos et al., 2008; Striano et al., 2008; Yagi et al., 2012a**;** Tjandrawinata et al., 2014; Larsen et al., 2015). Outro mecanismo de absorção intestinal da GAB foi proposto após estudo com enterócitos de ratos, o qual envolve o transportador de peptídeos 1 (PEPT1) e a trans-estimulação pelo transportador de aminoácidos $b^{0,+}$. O modelo sugere que o transportador PEPT1 modula a captação do dipeptídeo glicina-glutamato (Gli-Glu), que passa por uma hidrólise intracelular, por ação de uma dipeptidase, formando os aminoácidos glicina e glutamato. O glutamato é convertido à glutamina por ação da glutamina sintetase. A glutamina fornece força motriz para a absorção trans-estimulada da GAB, através do transportador de aminoácidos $b^{0,+}$. Na membrana basolateral, o efluxo da GAB para a circulação sistêmica ocorre devido à atividade do transportador de aminoácidos do tipo L (LAT2), o qual faz a troca da GAB por aminoácidos neutros (aa^0) presentes na circulação sistêmica (Figura 2A) (Nguyen; Smith; Fleisher, 2007).

No entanto, não foram observados efeitos no início da captação apical de GAB após co-aplicação de L-lisina e L-cistina ($C_{ss}C$), ambos substratos do transportador $b^{0,+}$. Além disso, a co-aplicação de L-lisina não afetou a permeabilidade da GAB através da monocamada de células Caco-2, sugerindo que o transportador $b^{0,+}$ não tem ou tem um envolvimento limitado na absorção intestinal da GAB *in vivo* e em células Caco-2 (Larsen et al., 2015). Portanto, o mecanismo de absorção da GAB no intestino não está completamente elucidado. Antiácidos contendo alumínio ou

magnésio também podem alterar a absorção de GAB reduzindo-a em até 40% (Patsalos et al., 2008; Yagi et al., 2012a).

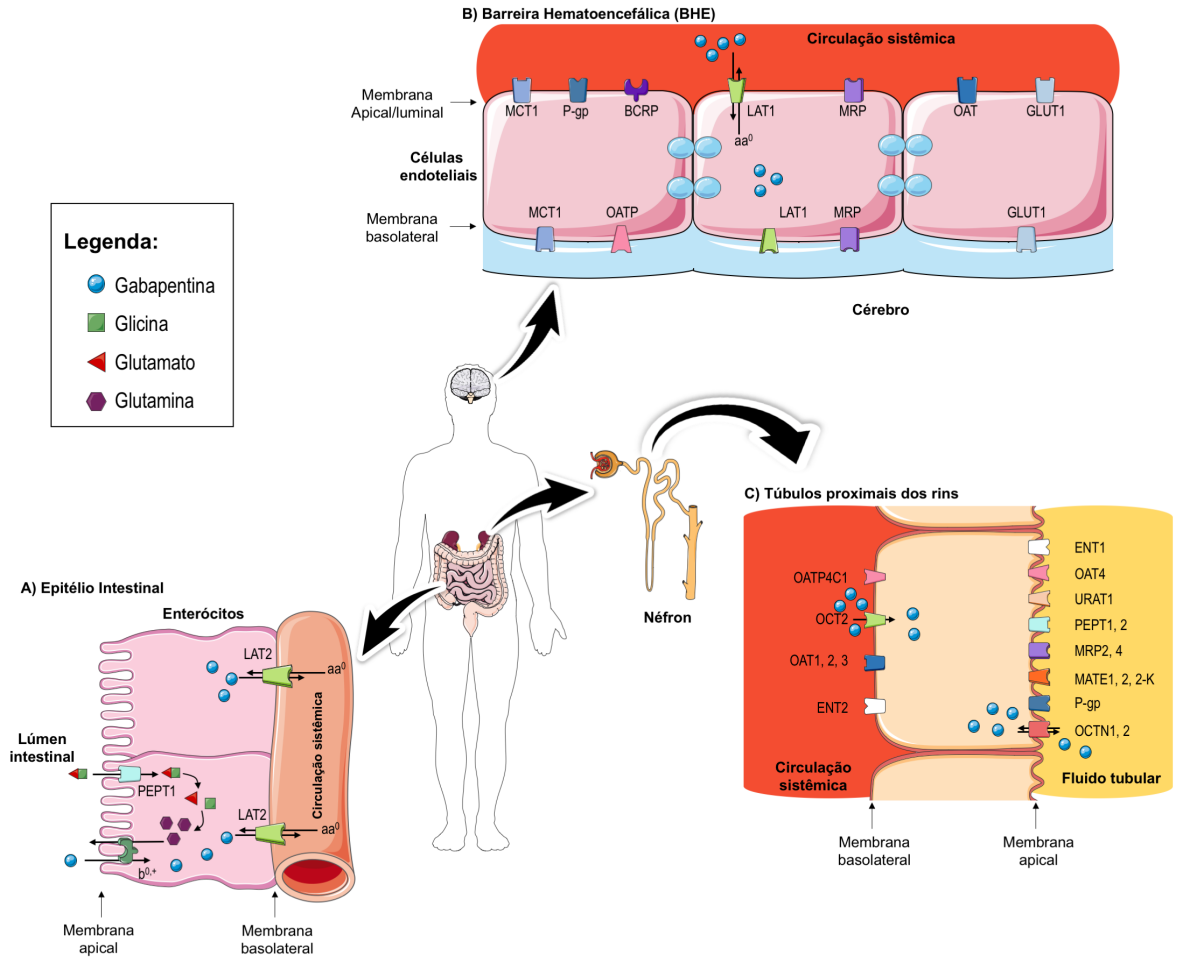


Figura 2. Transportadores envolvidos na disposição cinética da GAB. (A) Absorção da GAB no epitélio intestinal (B) Transporte da GAB pela barreira hematoencefálica (BHE) (C) Secreção da GAB nos túbulos proximais dos rins. [LAT: transportador de aminoácidos do tipo L (LAT1, 2); PEPT: transportadores de peptídeos (PEPT1, 2); $b^{0,+}$: sistema de transporte de aminoácidos $b^{0,+}$; aa^0: aminoácidos neutros; MCT: transportador de ácido monocarboxílico (MCT1); P-gp: glicoproteína-P; BCRP: proteína de resistência a câncer de mama; OATP: polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP4C1); MRP: proteínas associadas a resistência à múltiplos fármacos (MRP2, 4): OAT: transportadores de ânions orgânicos (OAT1, 2, 3, 4); GLUT: transportador de glicose (GLUT1); OCT: transportador de cátions orgânicos (OCT2); URAT: transportador de urato (URAT1); MATE: transportadores de extrusão de múltiplos fármacos e toxinas (MATE1, 2-K); OCTN1: transportador de cátions orgânicos/ergotioneína; OCTN2: transportador de cátions orgânicos/carnitina; ENT: transportador de nucleosídeo equilibrativo (ENT1, 2)]. Ilustração: próprio autor (A: adaptado de Nguyen; Smith; Fleisher, 2007; C: adaptado de Giacomini; Huang, 2013) (imagens retiradas do banco de imagens de Servier Medical Art, Servier).

Estudos sugerem o envolvimento do transportador LAT1 (codificado pelo gene *SLC7A5*) na passagem da GAB pela barreira hematoencefálica (Su et al., 1995; Del

Amo; Urtti; Yliperttula, 2008; Benarroch, 2012; Dickens et al., 2013) (Figura 2B). Su et al. (1995) e Dickens et al. (2013) mostraram que o transporte de GAB em quatro diferentes tipos celulares (astrócitos, sinaptossomas, células CHO e células endoteliais do cérebro) foi inibido por *L*-fenilalanina, aminoácido neutro substrato dos transportadores da família LAT (Su et al., 1995; Dickens et al., 2013). Estudo *in vitro* com células de coriocarcinoma placentário (BeWo e JEG-3) sugere que o transportador LAT1 é o principal contribuinte para o transporte de GAB pela placenta (Furugen et al., 2017).

A GAB apresenta meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 5 a 9 horas em voluntários sadios, sendo o tempo para atingir o estado de equilíbrio de 1-2 dias (Goa; Sorkin, 1993). Recentemente, um estudo clínico avaliou a ligação à proteína plasmática de 25 antiepilépticos, dos quais apenas a GAB e a pregabalina (PGB) não apresentaram ligação à proteínas plasmáticas (Patsalos et al., 2017). O volume de distribuição (Vd) da GAB varia de 0,65 – 1,4 L/kg, sendo o Vd estimado baseado em uma análise farmacocinética populacional de 0,8 L/kg (valor independente da biodisponibilidade) (Bockbrader et al., 2010; Milosheska; Grabnar; Vovk, 2015). Além disso, ela não é metabolizada em humanos. Sua eliminação é exclusivamente renal na forma inalterada do fármaco. Em função dessa característica, a GAB é o fármaco de escolha para pacientes com disfunção hepática (Johannessen et al., 2003; Johannessen; Tomson, 2006; Patsalos et al., 2008; Clivatti; Sakata; Issy, 2009; Asconapé, 2014; Krasowski; McMillin, 2014; Tjandrawinata et al., 2014). O fato da GAB não se ligar à proteínas plasmáticas, não ser metabolizada e não induzir enzimas hepáticas microssomais, justifica a ausência de interação com outros anticonvulsivantes (Neels et al., 2004).

O clearance renal (Cl_R) da GAB é cerca de 25% superior ao clearance de creatinina (Cl_{CR}), sendo que indivíduos com Cl_{CR} de 100 mL/min apresentaram clearance da GAB de aproximadamente 125 mL/min (Bockbrader et al., 2010). Os dados da literatura sobre a correlação entre o Cl_{CR} e o Cl_R da GAB são controversos. Alguns autores relatam que o Cl_R de GAB é fortemente correlacionado com a taxa de filtração glomerular, a qual é avaliada pelo Cl_{CR} (Galitz; Jayawardena; Furey, 2015; Ahmed et al., 2017). O estudo de farmacocinética populacional com pacientes idosos (n= 75) demonstrou que o clearance (Cl) de GAB está correlacionado apenas com a função renal (taxa de filtração glomerular estimada). Não foi observado efeito estatisticamente significante da idade, sexo, peso corporal ou comorbidades no clearance de GAB ajustado à taxa de filtração glomerular. No entanto, o estudo investigou uma faixa etária muito estreita, o que pode ter diminuído o poder do teste para detectar o efeito da idade no clearance (Ahmed et al., 2017).

Por outro lado, estudos mostram que o Cl_R da GAB ocorre tanto por filtração glomerular quanto por secreção tubular mediada por transportadores (Urban et al., 2008; Lal et al., 2010). A filtração glomerular explica apenas parcialmente a variabilidade no Cl_R da GAB, pois foi observado uma baixa correlação entre o Cl_{CR} e o Cl_R da GAB (R^2= 0,234, P= 0,0028) (Boyd et al., 1999). Além disso, em estudos farmacocinéticos o Cl_R da GAB foi maior que o Cl_{CR} tanto em crianças como em adultos (Urban et al., 2008). Tais resultados sugerem a participação do transporte ativo na excreção renal da GAB.

A excreção renal da GAB parece ser dependente dos transportadores de cátions orgânicos OCT2 e OCTN1, os quais são expressos nos rins (Figura 2C). A coadministração de cimetidina, fármaco inibidor de ambos transportadores, reduziu o

clearance de GAB sugerindo a participação de OCT2 e OCTN1 na excreção renal da GAB (Urban et al., 2008; Lal et al., 2010).

2.1.3 Parâmetros farmacocinéticos após administração em dose múltipla

Poucos estudos clínicos utilizando dose múltipla de GAB apresentaram os valores dos parâmetros farmacocinéticos no estado de equilíbrio. Com base nos dados disponíveis nos estudos de dose múltipla observou-se que a média da concentração plasmática (ng/mL) e a área sob a curva concentração plasmática *vs.* tempo de zero a 8h (ASC^{0-8h}) aumentam de acordo com a dose diária administrada, porém esse aumento não é linear, dado já descrito na literatura. O $t_{máx}$ médio observado entre os estudos foi de aproximadamente 2 horas. A meia-vida ($t_{1/2}$) variou de 5,1 a 7,5 horas. Os estudos mostraram que a quantidade de GAB excretada inalterada na urina (Ae %) reduz com o aumento da dose diária, essa redução pode ser atribuída a biodisponibilidade dose-dependente da GAB (Apêndice 1, Tabela 20).

2.1.4 Influência de variáveis na disposição cinética da GAB

2.1.4.1 Alimentação

Estudos clínicos investigaram a influência da alimentação, com composições diferentes, na cinética da GAB. A alimentação rica em proteínas mostrou influenciar a absorção de GAB, uma vez que foi observado um aumento significativo de 36% na concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e o tempo para atingir a concentração plasmática máxima ($t_{máx}$) foi reduzido após a ingestão de uma alimentação controlada rica em proteínas (80 g de proteína, 52 g de carboidrato e 9 g gordura). A absorção de GAB após dieta rica em proteínas não foi prejudicada, e sim melhorada, possivelmente devido ao processo de trans-estimulação do transporte ativo intestinal

(o aumento agudo da concentração de aminoácidos no lúmen intestinal resulta em um aumento agudo da atividade do Sistema-L) (Gidal et al., 1996).

Entretanto, dados sugerem que a absorção da GAB parece não sofrer influência da presença de alimentação padrão ou com alto teor de gordura. Os parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção ($C_{máx}$, $t_{máx}$ e $ASC^{0-\infty}$) foram comparados entre pacientes em jejum e pacientes no estado alimentado (alimentação padrão ou com alto teor de gordura). Os pacientes no estado alimentado apresentaram um aumento de aproximadamente 10% em $C_{máx}$ e $ASC^{0-\infty}$, e nenhuma diferença significativa em $t_{máx}$ foi observada. No entanto, a diferença observada não é clinicamente significativa, assim sendo, não há necessidade de ajuste de dose quando a GAB for administrada com alimentos (Bockbrader et al., 2010).

Toh et al. (2014) avaliaram a influência da presença de ergotioneína, substrato de OCTN1 derivado de uma refeição rica em cogumelos shitake, na disposição cinética da GAB. As altas concentrações de ergotioneína resultaram em um aumento significativo no Cl_R ($P<0,05$) e no $t_{máx}$ ($P<0,05$) da GAB. Além disso, houve uma diminuição significativa no $C_{máx}$ ($P<0,001$), mas nenhuma diferença foi observada na ASC^{0-t} ($P=0,726$). Embora alguns parâmetros farmacocinéticos tenham sido alterados, os autores concluíram que a alimentação rica em shitake pode não ter relevância clínica, uma vez que a ASC^{0-t} não apresentou diferença estatística (Toh et al., 2014).

2.1.4.2 Sexo e Idade

Estudos clínicos investigaram o sexo e a idade como potenciais covariáveis na razão concentração/dose em pacientes em uso de GAB. Não foi observada diferença na farmacocinética entre os sexos, apesar de $C_{máx}$ ter sido significativamente maior em mulheres, o que pode ser explicado pela diferença do tamanho corporal (Boyd et

al., 1999). Além disso, não foi observada diferença na razão concentração/dose (0,027±0,03 em mulheres e 0,029±0,03 em homens) (Landmark et al., 2015). Por outro lado, a razão concentração/dose aumenta com a idade (Armijo et al., 2004). Pacientes idosos apresentaram razão concentração/dose 2 vezes maior que pacientes adultos jovens, o que pode ser explicado pela redução da excreção renal de GAB (Armijo et al., 2004; Landmark et al., 2015). Assim sendo, os autores sugerem ajustar a dose de GAB com base no clearance de creatinina (Blum et al., 1994; Armijo et al., 2004). Entretanto, estudos indicam que o Cl_R de GAB não está relacionado apenas ao clearance de creatinina, mas também a secreção tubular ativa mediada por transportadores de fármacos (Boyd et al., 1999; Bockbrader et al., 2010).

2.1.4.3 Regime posológico (intervalo de doses, τ)

A GAB é usualmente administrada em três doses igualmente divididas. Estudos clínicos avaliaram a influência da frequência de administração na disposição cinética da GAB. Pacientes utilizando a dose de 4.800 mg/dia apresentaram aumento significativo (P=0,006) na biodisponibilidade ao aumentar a frequência de administração de três (TID, 29,2±16,2%) para quatro (QID, 35,7±17,6%) vezes ao dia. No entanto, não foi observada diferença significativa em dose de 3.600 mg/dia (Gidal et al., 1998).

Outro estudo avaliou a eficácia e os níveis de concentração plasmática de GAB ao reduzir de TID para BID (duas vezes ao dia). As médias das concentrações plasmáticas observadas foram de 5,4±1,9 µg/mL e 5,1±1,8 µg/mL quando a dose diária ótima para cada paciente (1.200 a 3.200 mg/dia) foi dividida em TID e BID, respectivamente, não apresentando diferença estatística significativa (P=0,72). A eficácia da GAB se manteve e não foi observado aumento de eventos adversos ao

reduzir a frequência de administração. Assim sendo, a GAB pode ser administrada duas vezes ao dia com segurança e eficácia (Muscas et al., 2000).

2.2 Transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2)

O transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) é uma proteína de membrana constituída por 555 aminoácidos, em humanos. O gene *SLC22A2* localizado no cromossomo 6 (6q25.3) (*Gene ID*: 6582) é o responsável pela expressão do OCT2 (UCSF, 2017). Utilizando a sequência primária da proteína (NP_003049.2) é possível predizer que sua estrutura é composta por 12 domínios transmembranas, como demonstrado na Figura 3, predita utilizando o *website Protter* (Omasits et al., 2014). O OCT2 é principalmente expresso nos rins e está localizado na membrana basolateral dos túbulos proximais (Figura 2C). Este transportador também pode ser encontrado no intestino delgado, pulmões, placenta, timo, cérebro, ouvido interno, baço, traqueia e pele (Koepsell; Lips; Volk, 2007; Koepsell, 2013). Nos rins, sua função é mediar a excreção renal de cátions orgânicos e a reabsorção de algumas substâncias endógenas (Koepsell, 2013; Lai, 2013). Dentre seus substratos estão substâncias endógenas e fármacos (Tabela 1). O OCT2 é considerado o principal transportador para captação de vários xenobióticos catiônicos da corrente sanguínea para as células do epitélio dos rins (Leabman et al., 2002). Portanto, sua inibição pode acarretar em acúmulo de seus substratos aumentando a concentração plasmática e o risco de efeitos adversos. Os inibidores da atividade de OCT2 descritos na literatura estão representados na Tabela 1.

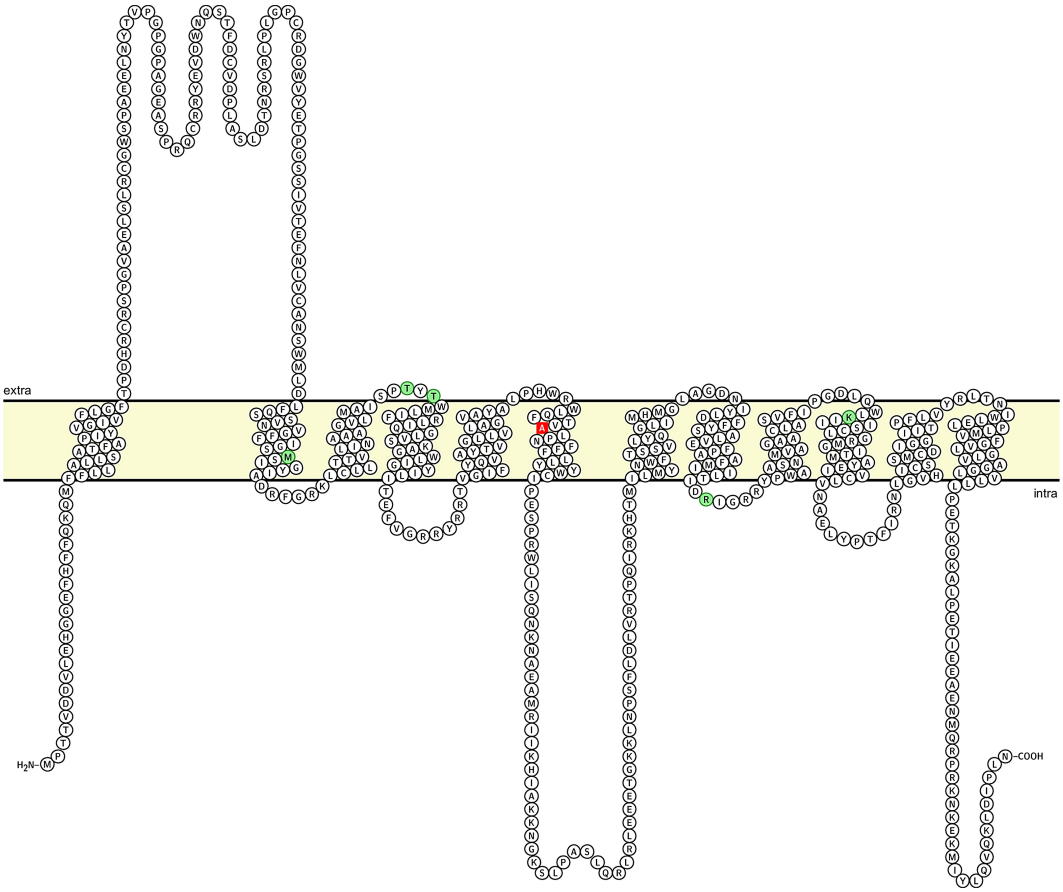


Figura 3. Localização dos polimorfismos de base única (SNP) com frequência maior ou igual a 1% na estrutura secundária predita da proteína OCT2. Os SNPs estão indicados em verde. O SNP de interesse (rs316019) está representado pelo quadrado em vermelho. O diagrama de topologia de transmembrana foi predito utilizando a sequência primária da proteína (NP_003049.2) e o *website Protter* (Omasits et al., 2014). Fonte: Próprio autor.

Tabela 1. Substratos e inibidores dos transportadores OCT2 e OCTN1

Transportador	Substratos	Inibidores	Ref.
OCT2	acetilcolina, amantadina, amilorida, cetirizina, cimetidina, cisplatina, colina, creatinina, dopamina, epinefrina, famotidina, fenformina, gabapentina, histamina, ifosfamida, lamivudina, memantina, metformina, norepinefrina, oxaliplatina, picoplatina, putrescina, quinina, ranitidina, serotonina, zalcitabina	cimetidina, cocaína, desipramina, fenoxibenzamina, grepafloxacino, imipramina, mepiperfenidol, mesilato de nafamostat, *N*-1-metilnicotinamida, nicotina, *O*-metilisopralina, procainamida, quinidina, trimetoprim, verapamil	[1],[2], [3],[4]
OCTN1	acetilcolina, betonicina, cefaloridina, *D*-carnitina, doxorrubicina, ergotioneína, estaquidrina, gabapentina, glicina-betaína, ipratrópio, *L*-carnitina, mitoxantrona, pirilamina, quinidina, tiotrópio, verapamil	cefaloridina, cimetidina, clonidina, colina, *D*-carnitina, *L*-carnitina, levofloxacino, lidocaína, nicotina, ofloxacino, procainamida, quinidina, quinina, tetrabutilamônio, tetrapentilamônio, verapamil	[3],[4],[5]

[1] Fujita et al., 2006; [2] Lal et al., 2010; [3] Koepsell, 2013; [4] Dresser; Leabman; Giacomini, 2001; [5] Koepsell; Lips; Volk, 2007.

Vários polimorfismos de base única (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) já foram descritos na literatura para o gene *SLC22A2*, sendo que a presença desses SNPs pode ou não alterar a atividade do transportador (Leabman et al., 2002; Fukushima-Uesaka et al., 2004). Os SNPs não sinônimos com frequência ≥ 1% estão representados na Tabela 2 e destacados na Figura 3, sendo que o *SLC22A2* c.808G>T (A270S) é o único polimorfismo frequentemente encontrado em todos os grupos étnicos (Leabman et al., 2002; Fukushima-Uesaka et al., 2004; Kang et al., 2007a).

Tabela 2. Polimorfismos do gene *SLC22A2* e a frequência dos alelos raros em diferentes grupos étnicos

Número de referência (rs)	Alteração de nucleotídeos[a]	Sequência proteica	Frequência (%)					Ref.
			CA	AA	AS	ME	BR	
rs8177508	495G>A	M165I	0	1,0	0	0	-	[1]
rs8177516	1198C>T	R400C	0	1,5	0	0	-	[1]
			-	-	-	-	0,6	[5]
MPJ6_OC2003[b]	596C>T	T199I	-	-	1,0	-	-	[2]
			-	-	0,9	-	-	[3]
MPJ6_OC2004[b]	602C>T	T201M	-	-	2,0	-	-	[2]
			-	-	1,3	-	-	[3]
			-	-	0,4	-	-	[4]
rs316019	808G>T	A270S	15,7	11,0	8,6	15,0	-	[1]
			-	-	13,3	-	-	[4]
							11,9	[5]
-	1294A>C	K432Q	0	1,0	0	5,0	-	[1]

CA: caucasianos; AA: africano-americano; AS: asiático-americano; ME: mexicano-americano; BR: brasileiros - região sudeste; rs: número de referência do SNP; -: frequência não descrita na literatura.
[a]A numeração foi realizada a partir do códon iniciador (ATG) da sequência do cDNA do gene *SLC22A2* (GenBank: NM_003058).
[b]Fonte: http://www.nihs.go.jp/mpj/MPJ6_SNPs/html/html/SLC22A2/SnpList.html
[1] Leabman et al., 2002; [2] Kang et al., 2007a; [3] Fukushima-Uesaka et al., 2004; [4] Wang et al., 2008; [5] Refargen, 2014; Bonifaz-Peña et al., 2014.

Estudos *in vitro* mostraram redução no transporte de MPP^+ ([^{3}H]-1-metil-4-fenilpiridina) e TEA (tetraetilamônio), os quais são substratos de OCT2, em células expressando as variantes c.495G>A, c.1198C>T, c.596C>T, c.602C>T e c.808G>T. A variante c.1294A>C apresentou aumento na captação de MPP^+ (Leabman et al., 2002; Kang et al., 2007a). Embora os polimorfismos *SLC22A2* c.596C>T e c.602C>T apresentaram alteração na atividade do OCT2 eles são encontrados em frequências

que variam de 1 a 2% apenas em populações asiáticas (coreanas e japonesas). Os polimorfismos *SLC22A2* c.596C>T, c.602C>T e c.808G>T influenciam na disposição cinética da metformina, substrato de OCT2, diminuindo o clearance renal do fármaco e elevando a concentração plasmática (Choi; Song, 2008; Song et al., 2008). Indivíduos homozigotos para o alelo raro (TT) na posição c.808C>T na presença de cimetidina apresentaram menor alteração no clearance renal de metformina (12%) do que pacientes que possuem pelo menos um alelo selvagem (26,0% para GT e 42,4% para GG), o que indica que os homozigotos para o alelo raro são menos sensíveis à inibição pela cimetidina (Wang et al., 2008). Até o momento, nenhum estudo clínico avaliou a presença de polimorfismos genéticos no OCT2 com a disposição cinética da GAB.

2.3 Transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1 (OCTN1)

O transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1 (OCTN1) é um transportador bidirecional e pH-dependente constituído por 551 aminoácidos, em humanos (Dresser; Leabman; Giacomini, 2001; Urban et al., 2007). O gene responsável por codificar essa proteína transmembrana é o *SLC22A4*, localizado no cromossomo 5 (5q31.1) (Gene ID: 6583) (UCSF, 2017). Assim como o OCT2, a estrutura secundária predita a partir da sequência primária da proteína (NP_003050.2) apresenta 12 domínios transmembranas, como demonstrado na Figura 4, predita utilizando o *website Protter* (Omasits et al., 2014). O OCTN1 é expresso na borda em escova da membrana apical do túbulo proximal nos rins e participa da reabsorção de zwitteríons e da secreção de cátions orgânicos (Koepsell, 2013; Lai, 2013) (Figura 2C). Além disso, o OCTN1 também está presente nos eritrócitos, intestino, baço, coração, músculo esquelético, cérebro, glândulas mamárias, pulmões, timo, próstata,

vias aéreas, testículos, olhos, fígado fetal, esperma, células do sistema imunológico (Koepsell; Lips; Volk, 2007; Urban et al., 2007; Koepsell, 2013).

Substâncias endógenas, substâncias presentes em alimentos e fármacos são substratos de OCTN1 (Tabela 1). Vários compostos, dentre eles alguns fármacos, foram descritos como inibidores de OCTN1 (Tabela 1).

Estudos *in vitro* mostraram a presença de vários SNPs em regiões codificadoras e não codificadoras no gene *SLC22A4*. Na Tabela 3 estão descritos os polimorfismos presentes na região codificadora do gene *SLC22A4*. Tais mutações, destacadas na Figura 4, levam à substituição de aminoácido (SNPs não sinônimos) ou são mutações sem sentido (SNP *nonsense*) podendo acarretar em alteração da atividade do transportador (Kawasaki et al., 2004; Peltekova et al., 2004; Urban et al., 2007).

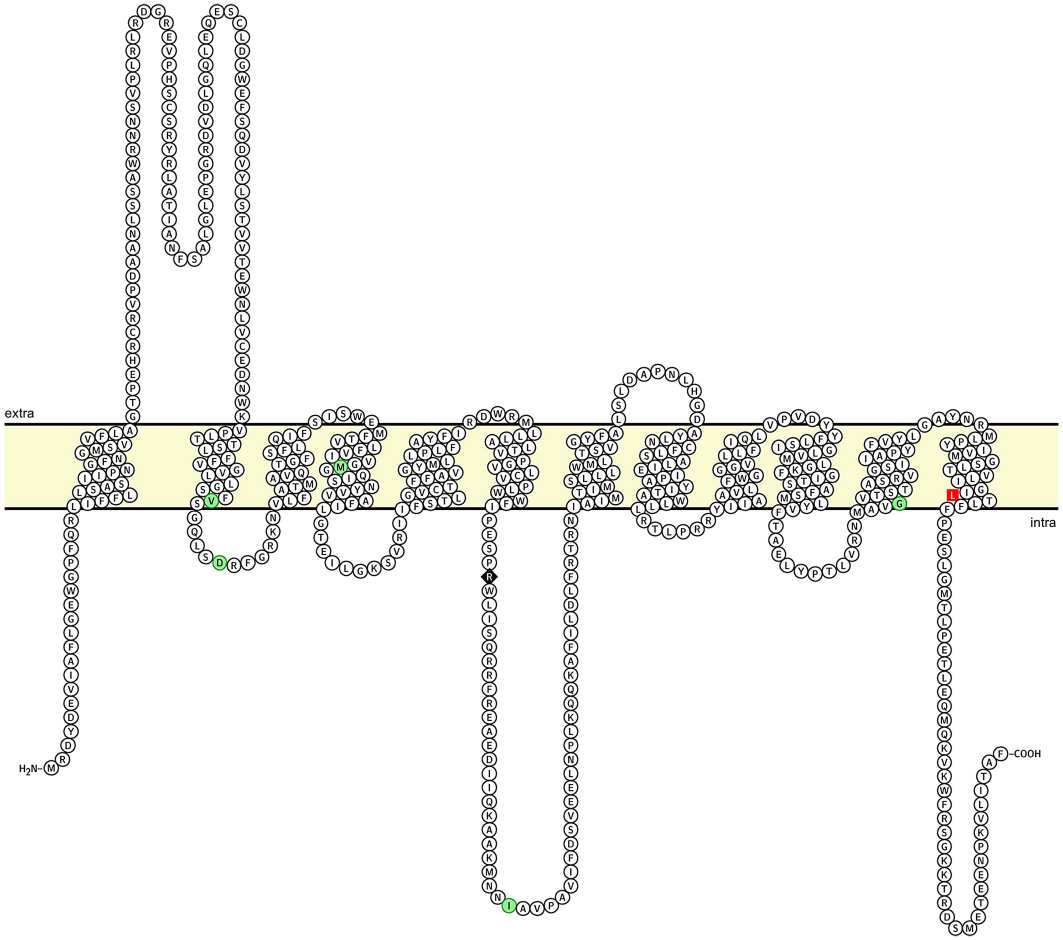


Figura 4. Localização dos polimorfismos de base única (SNP) na estrutura secundária predita da proteína OCTN1. Os SNPs não-sinônimos estão indicados em verde. A mutação sem sentido (SNP nonsense) está destacada pelo losango preto. O SNP de interesse (rs1050152) está representado pelo quadrado em vermelho. O diagrama de topologia de transmembrana foi predito utilizando a sequência primária da proteína (NP_003050.2) o *website Protter* (Omasits et al., 2014). Fonte: Próprio autor.

Tabela 3. Polimorfismos do gene *SLC22A4* e a frequência dos alelos raros em diferentes grupos étnicos

Número de referência (rs)	Alteração de nucleotídeos[a]	Sequência proteica	Frequência (%)					Referências
			AA	EA	AS	ME	BR	
rs11568510	494A>G	D165G	0	0	0,8	0	-	[1]
rs11568503	844C>T	R282del	0,6	0	0	0	-	[1]
rs11568500	615G>A	M205I	0,6	0	0	0	-	[1]
rs11568509	475G>A	V159M	0,6	0	0	0	-	[1]
rs272893	917C>T	T306I	26,9	33,8	64,2	24,0	-	[1]
-	1385G>A	G462E	-	-	-	-	33,5 33,5	[2] [3]
rs1050152	1507C>T	L503F	8,8	41,2	0	23,0	- 32,9	[1] [3]

AA: africano-americano (n=160); EA: europeu-americano (n=160); AS: asiático-americano (n=120); ME: mexicano-americano (n=100); BR: brasileiros - região sudeste (n=270); rs: número de referência do SNP; -: frequência não descrita na literatura.

[a]A numeração foi realizada a partir do códon iniciador (ATG) da sequência do cDNA do gene *SLC22A4* (GenBank: NM_003059)

[1] Urban et al., 2007; [2] Kawasaki et al., 2004; [3] Refargen, 2014; Bonifaz-Peña et al., 2014.

Dados da literatura mostram que a substituição nos aminoácidos D165G e G462E e a deleção do aminoácido R282Del levam à perda da atividade do OCTN1 *in vitro*. No entanto, a frequência desses polimorfismos em diferentes grupos étnicos é baixa ou não foi relatada (Kawasaki et al., 2004; Urban et al., 2007). O polimorfismo c.615G>A (M205I) reduz a atividade do transporte *in vitro* de TEA por OCTN1; e os polimorfismos c.475G>A (V159M) e c.917C>T (T306I) não apresentaram alteração na atividade do transportador (Urban et al., 2007).

Estudo *in vitro* mostrou que o polimorfismo c.1507C>T (L503F) altera a especificidade dos substratos aumentando a afinidade por compostos tetra-alquilamônio e diminuindo a afinidade por *L*-carnitina, colina, cimetidina, lidocaína, N-metilnicotinamida e verapamil (Peltekova et al., 2004). A atividade dos polimorfismos c.1507C>T (L503F) e c.917C>T (T306I) no transporte de três biguanidas (metformina, buformina e fenformina) e da GAB foi avaliada *in vitro*. Uma maior atividade no transporte das biguanidas na presença do polimorfismo c.1507C>T (L503F) foi observada quando comparado com o gene selvagem. Por outro lado, o polimorfismo c.917C>T (T306I) reduziu transporte da GAB, como relatado para o polimorfismo c.1507C>T (L503F). No entanto, os níveis de expressão do transportador polimórfico foram menores que o transportador selvagem, o que torna a interpretação do efeito do polimorfismo na atividade do transportador difícil (Urban et al., 2008; Futatsugi et al., 2016).

Considerando a elevada frequência desse polimorfismo em europeus-americanos (41,2%) e na população brasileira (32,9%), estudos que avaliam o impacto do genótipo de OCTN1 são necessários para compreender a variabilidade interindividual na disposição cinética dos seus substratos.

2.4 Métodos bioanalíticos para quantificação de GAB

A cromatografia líquida tem sido a técnica mais utilizada, no período de 2007-2017 (Apêndice 2, Tabela 21), para análise da GAB em fluidos biológicos (plasma, urina, soro, sangue total). Outras técnicas como cromatografia gasosa e eletroforese capilar também foram utilizadas para análise de GAB, porém em um número menor (Ikeda et al., 2014; Lin et al., 2015; Hložek et al., 2016).

A maior parte dos métodos descritos na literatura utilizaram detecção por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) (Park et al., 2007; Oertel et al., 2009; Wattananat; Akarawut, 2009; Juenke et al., 2011; Kim et al., 2011; Shibata et al., 2012; Chahbouni et al., 2013; Deeb et al., 2014). Embora os métodos que utilizam MS/MS apresentam, na maioria das vezes, mais vantagens do ponto de vista químico analítico (maior especificidade, melhor seletividade e maior detectabilidade, por exemplo), sua disponibilidade em laboratórios e hospitais é baixa, devido ao alto custo desses equipamentos.

Métodos de cromatografia líquida acoplados a detectores de ultravioleta (CLAE-UV) (Jalalizadeh et al., 2007; Gujral; Haque, 2009; Ebrahimzadeh et al., 2010) ou fluorescência (Mercolini et al., 2010; Yagi et al., 2012b; Martinc et al., 2014) também estão descritos na literatura. Alguns desses métodos utilizaram extração em fase sólida (EFS) ou possuem o preparo de amostra complexo ou com muitas etapas, o que aumenta o custo das análises e reduz a disponibilidade nos laboratórios (Gujral; Haque, 2009; Ebrahimzadeh et al., 2010; Mercolini et al., 2010; Martinc et al., 2014). Em outros casos, um grande volume de amostra foi utilizado (Mercolini et al., 2010; Martinc et al., 2014) ou os métodos não apresentaram todos os requisitos necessários para uma validação completa, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2012b). Dados da validação (Ebrahimzadeh et al., 2010) ou dos

testes de estabilidade (Jalalizadeh et al., 2007; Mercolini et al., 2010; Martinc et al., 2014) não foram apresentados em alguns trabalhos disponíveis na literatura.

A amostra mais utilizada para detectar e quantificar GAB em fluidos biológicos é o plasma. Poucos trabalhos recentes utilizam outras matrizes biológicas, como a urina (Gujral; Haque, 2009; Ebrahimzadeh et al., 2010; Yagi et al., 2012b; Lin et al., 2015).

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência de polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 e outras potenciais covariáveis na disposição cinética da GAB em pacientes tratados com doses múltiplas.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Desenvolver e validar métodos bioanalíticos para quantificação de GAB em plasma e urina humana

3.1.2 Investigar a influência dos polimorfismos SLC22A2 c.808G>T e SLC22A4 c.1507C>T na disposição cinética da GAB;

3.1.3 Investigar a influência de variáveis demográficas (idade, sexo), dados antropométricos (peso corporal) e variáveis clínicas (clearance de creatinina, índice de massa corporal) na disposição cinética da GAB;

3.1.4 Estimar os parâmetros farmacocinéticos da GAB por análise populacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Métodos bioanalíticos para análise de GAB em plasma e urina

4.1.1 Reagentes

A GAB é um medicamento controlado pela Portaria SVS/MS nº 344/1998, portanto, foi necessária autorização especial concedida pela ANVISA a FCF-UNESP para a compra do padrão analítico certificado (Anexo 1; Brasil, 2014). Os padrões analíticos de gabapentina (GAB, 99,2%, Cerilliant, Round Rock, TX, EUA) e besilato de anlodipino (99,7%, EDQM, Strasbourg, França) foram obtidos da Sigma Aldrich® (São Paulo, Brasil); e o padrão analítico em pó de gabapentina (GAB, 99,8%, USP Reference Standard, Rockville, MD, EUA) foi adquirido posteriormente da LAS do Brasil (Aparecida de Goiânia, Brasil).

O 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB, ≥ 98,0%) adquirido da Sigma Aldrich® foi utilizado como agente derivatizante. Os solventes metanol (J.T. Baker, Ecatepec, México), acetonitrila (J.T. Baker, Ecatepec, México), diclorometano (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 1-butanol (Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, Brasil) utilizados foram de grau CLAE. Foram utilizados os reagentes fosfato de sódio monobásico anidro (Synth, Diadema, Brasil), ácido *o*-fosfórico 85% (Synth, Diadema, Brasil), ácido clorídrico 37% (Neon, São Paulo, Brasil), ácido bórico (Sigma, St. Louis, MO, EUA), hidróxido de sódio micropérolas (Audaz, São Paulo, Brasil) e cloreto de potássio (Amresco, Solon, Ohio, EUA) de grau analítico. A água utilizada em todas as soluções foi obtida através de sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore, Belford, MA, EUA).

4.1.2 Soluções-padrão

A solução-padrão estoque de GAB para análise em plasma foi preparada em metanol na concentração de 100 µg/mL, a partir da qual foram preparadas soluções-

padrão de uso nas concentrações de 1; 2; 5; 10; 20; 30; 60 e 70 µg/mL em metanol. Para análise de GAB em urina, a solução-padrão estoque foi preparada na concentração de 1 mg/mL de metanol, as soluções-padrão de uso foram preparadas em metanol nas concentrações de 5; 10; 20; 30; 50; 75; 100; 150; 200 e 300 µg/mL a partir da solução-padrão estoque.

Todas as soluções-padrão de GAB foram armazenadas em freezer (-20º C). O anlodipino foi empregado como padrão interno (PI). A solução estoque do PI foi preparada na concentração de 400 µg/mL de água; e para solução de trabalho foi utilizada a concentração de 200 µg/mL de água, ambas soluções foram armazenadas a 4-8º C. A solução do agente derivatizante FDNB foi preparada em acetonitrila na concentração de 0,06 M e armazenada a 4-8º C em frasco âmbar.

4.1.3 Equipamento e condições cromatográficas

A análise da GAB em plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) utilizando o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu (Shimadzu Inc., Kioto, Japão), composto de um sistema de bombas quaternário LC-20AT, desgaseificador DGV-20A5R e detector UV-VIS SDP-20AT. A GAB e o PI foram separados em coluna de fase reversa LiChrospher® C18 RP (125 × 4,0 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha) com pré-coluna LiChroCART® 4-4 Purospher® RP-18 capeada (5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 3,9):metanol (27:73, v/v), em fluxo de 1,2 mL/min. A detecção por ultravioleta foi realizada a 360 nm e a corrida cromatográfica teve duração de 10 minutos. A aquisição dos dados e a quantificação das amostras foram efetuadas utilizando o programa LabSolutions versão 5.57 SP1 (Shimadzu Inc., Kioto, Japão).

4.1.4 Preparo das amostras

4.1.4.1 Plasma

Amostras de 100 µL de plasma foram adicionadas de 25 µL da solução de padrão interno (anlodipino, 200 µg/mL, em água) e homogeneizadas por inversão. A precipitação proteica foi realizada adicionando 200 µL de acetonitrila, seguido por 5 minutos de agitação em agitador horizontal de mesa reciprocante mecânica e 15 minutos de centrifugação a 15.000 rcf, à temperatura ambiente. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um microtubo limpo e foram adicionados 200 µL de solução tampão borato 0,25 M (pH 8,2), 30 µL de agente derivatizante (FDNB, 0,06M) e 1 mL de acetonitrila. Para ocorrer a reação de derivatização, as amostras foram invertidas, aquecidas em bloco seco a 65 ºC por 10 minutos e mantidas sob proteção da luz. Após o período da reação, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida foram adicionados 25 µL de HCl 1M. Os tubos foram invertidos e as amostras evaporadas até a secura em sistema de evaporação a vácuo (Genevac Ltda., DUC-12060-C00, Ipswich, Inglaterra). Os resíduos foram reconstituídos com 200 µL de fase móvel, agitados em vortex por 20 segundos, e então 50 µL foram injetados no sistema CLAE-UV (Figura 5).

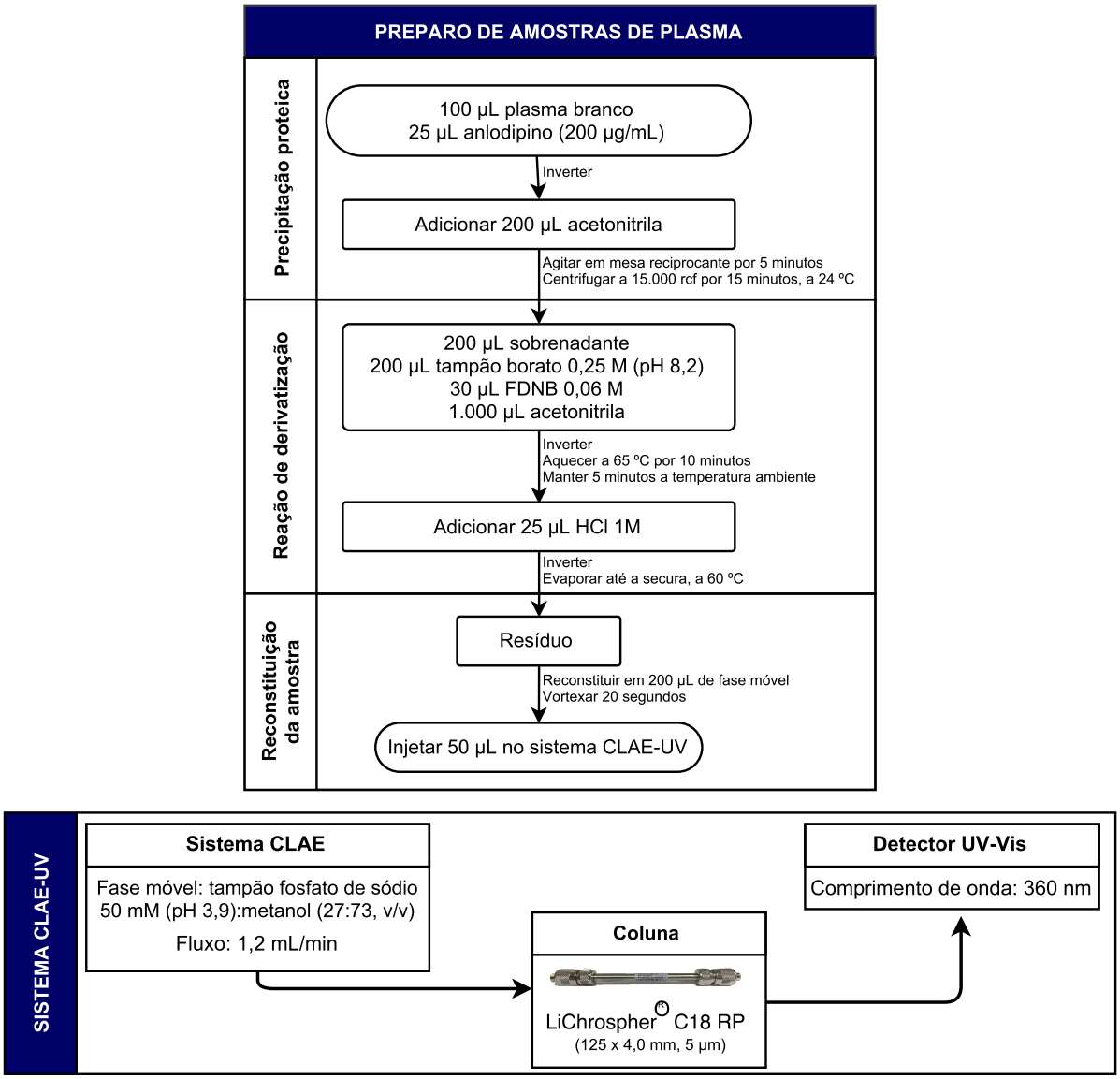


Figura 5. Protocolo de preparo de amostra de plasma para análise de GAB por CLAE-UV. Fonte: Próprio autor.

4.1.4.2 Urina

Amostras de 50 µL de urina foram adicionadas de 25 µL da solução de padrão interno (anlodipino, 200 µg/mL, em água), 60 µL de solução tampão borato 0,25 M (pH 8,2), 10 µL de agente derivatizante (FDNB, 0,06 M) e 300 µL de acetonitrila. As amostras foram homogeneizadas por inversão e submetidas ao mesmo protocolo de derivatização que as amostras de plasma (item 4.1.4.1). Após a reação de derivatização foi efetuada uma extração líquido-líquido utilizando a mistura de diclorometano:1-butanol (1:1, v/v) como solvente extrator. As amostras foram agitadas

em mesa reciprocante horizontal por 20 minutos e centrifugadas a 15.000 rcf por 15 minutos, à temperatura ambiente. A fase orgânica (750 µL) foi separada em tubo limpo e evaporada até a secura em sistema de evaporação a vácuo (Genevac Ltda., DUC-12060-C00, Ipswich, Inglaterra). Os resíduos foram reconstituídos com 200 µL de fase móvel, agitados em vortex por 20 segundos, e então 50 µL foram injetados no sistema CLAE-UV (Figura 6).

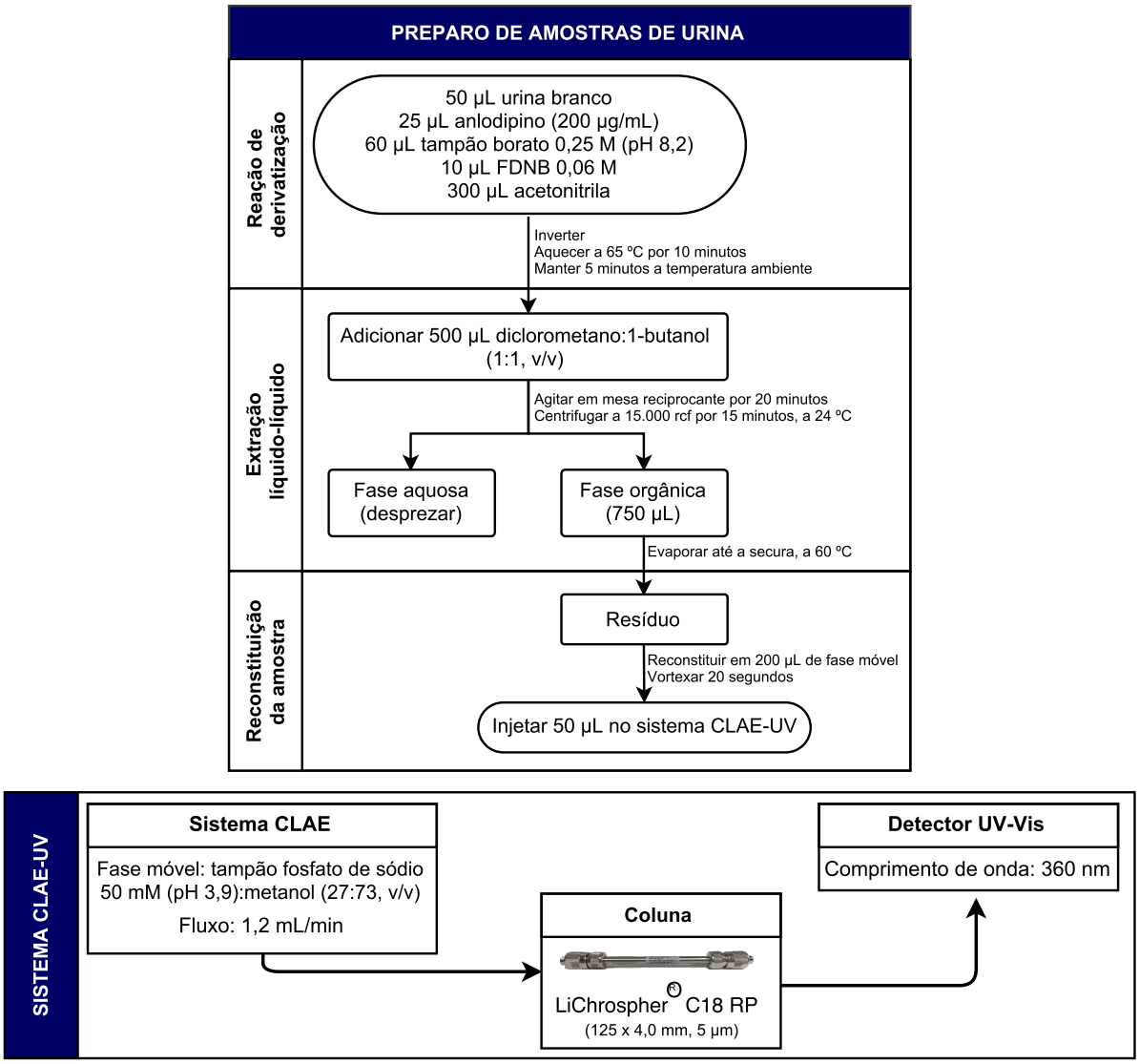


Figura 6. Protocolo de preparo de amostra de urina para análise de GAB por CLAE-UV. Fonte: Próprio autor.

4.1.5 Validação de métodos bioanalíticos

Os métodos de análise da GAB em plasma e urina foram desenvolvidos e validados de acordo com a resolução da ANVISA, RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, para a validação de métodos bioanalíticos (Brasil, 2012b). O processo de validação incluiu todos os parâmetros requeridos para demonstrar que o método desenvolvido é compatível com a aplicação em estudos de disposição cinética. Os parâmetros considerados foram: seletividade; linearidade; limite inferior de quantificação (LIQ); efeito residual; precisão e exatidão inter e intracorrida; estabilidade em matriz em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento, quanto ao período de armazenamento em freezer (longa duração); e estabilidade em solução.

4.1.5.1 Preparo dos controles de qualidade (CQ)

O limite inferior da quantificação (LIQ) é definido como a menor concentração quantificada com coeficiente de variação (CV) de até 20% e porcentagem de inexatidão dentro da faixa de ± 20%. Foram avaliadas triplicatas das amostras de plasma enriquecidas com GAB nas concentrações de 100 e 200 ng/mL. Para a determinação do LIQ em urina triplicatas das amostras enriquecidas com 2 e 4 µg/mL foram avaliadas. O LIQ é utilizado como CQ nas análises de precisão e exatidão.

As amostras de controle de qualidade foram preparadas enriquecendo amostras de plasma e urina branco em 4 diferentes níveis de concentração: controle de qualidade de baixa concentração (CQB), de média concentração (CQM), de alta concentração (CQA) e de diluição (CQD) (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações dos controles de qualidade em plasma e urina

Controle de Qualidade	Plasma Concentração (ng/mL)	Urina Concentração (µg/mL)
LIQ	200	2
CQB	400	4
CQM	6.000	60
CQA	11.000	90
CQD (fd)	20.000 (5x)	300 (10x)

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; fd: fator de diluição.

4.1.5.2 Seletividade

O método é considerado seletivo quando a resposta dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção da GAB e do PI forem, respectivamente, inferiores a 20% e 5% das suas respostas. As amostras utilizadas para a análise da seletividade dos métodos estão descritas a seguir.

4.1.5.2.1 Plasma

Foram obtidas e analisadas amostras de plasma de 6 voluntários, sendo 4 amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Os resultados das análises foram comparados com o resultado do limite inferior de quantificação (LIQ, 200 ng/mL).

4.1.5.2.2 Urina

Foram obtidas e analisadas amostras de urina de 12 voluntários, sendo 6 homens e 6 mulheres. As amostras analisadas apresentavam diferentes colorações (amarelo claro a amarelo escuro) e aspecto (translúcida ou turva) para avaliar as diversas características dessa matriz (Figura 7). Os resultados das análises foram comparados com o resultado do LIQ (2 µg/mL).



Figura 7. Amostras de urina doadas por voluntários sadios. (A) Amostras de voluntários do sexo feminino (B) Amostras de voluntários do sexo masculino. Fonte: Próprio autor.

4.1.5.3 Curva de calibração/Linearidade

Três curvas de calibração contendo a amostra branco (matriz não enriquecida), a amostra zero (matriz enriquecida apenas com PI) e amostras enriquecidas com diferentes concentrações de GAB foram analisadas para avaliar a linearidade da faixa da curva de calibração selecionada. O método bioanalítico é considerado linear quando o coeficiente de determinação (R^2) é $\geq$ 0,98 e a variância do erro for $\leq$ 20% e $\leq$ 15% para o LIQ e para os demais padrões de calibração, respectivamente.

Alíquotas de 100 µL de plasma foram enriquecidas com 20 µL de cada solução-padrão (para plasma), obtendo assim, as concentrações finais de 200, 400, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 12.000, 14.000 ng/mL em plasma. Todas as amostras de plasma foram preparadas conforme descrito previamente (item 4.1.4.1).

Concentrações finais de 2, 4, 8, 12, 20, 30, 40, 60, 80 e 120 µg/mL em urina foram obtidas enriquecendo alíquotas de 50 µL de urina com 20 µL de cada solução-padrão (para urina). As amostras foram preparadas conforme descrito previamente (item 4.1.4.2).

4.1.5.4 Efeito residual

O efeito residual foi verificado através de 3 injeções da mesma amostra branco (plasma e urina). Foi realizada uma injeção antes e duas imediatamente após a injeção de duas amostras do limite superior de quantificação (LSQ, 14.000 ng/mL de plasma e 120 µg/mL de urina). O efeito residual é considerado ausente quando a resposta de picos interferentes no tempo de retenção é menor que 20% e 5% da resposta do LIQ e do PI, respectivamente.

4.1.5.5 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram determinadas na mesma corrida (intracorrida) e em corridas realizadas em 3 dias diferentes (intercorridas). Em cada corrida foram analisadas quintuplicatas do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

A exatidão foi expressa através do erro padrão relativo (EPR, %), o qual foi calculado utilizando a fórmula descrita a seguir (Equação 1). As concentrações dos controles de qualidade obtidas devem estar dentro da faixa de ± 15% da concentração nominal, exceto para o LIQ, para o qual são aceitos valores dentro da faixa de ± 20% da concentração nominal.

$$\mathbf{EPR}\ (\%) = \frac{(\mathbf{concentração\ média\ experimental} - \mathbf{concentração\ nominal})}{\mathbf{concentração\ nominal}} \times \mathbf{100} \qquad (1)$$

A precisão foi expressa através do coeficiente de variação (CV, %), calculado conforme a fórmula a seguir (Equação 2). Os valores do CV não devem ser superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual valores ≤ 20% são aceitos.

$$\boldsymbol{CV}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{desvio\ padrão}}{\boldsymbol{concentração\ média\ experimental}} \times \mathbf{100} \qquad (2)$$

4.1.5.6 Estabilidade

A estabilidade da GAB em plasma e urina foi avaliada utilizando uma triplicata dos controles de qualidade CQB e CQA, que foram analisados logo após o seu preparo e depois de serem submetidos a diversas condições de armazenamento. As amostras dos estudos de estabilidade foram processadas, como descrito no item 4.1.4, e quantificadas usando uma curva de calibração recém preparada. O analito é considerado estável na matriz biológica quando a média da concentração dos controles de qualidade estiver dentro de ± 15% da concentração nominal. A estabilidade da GAB em plasma e urina foi demonstrada através dos seguintes estudos: (a) estabilidade de curta duração; (b) estabilidade pós-processamento; (c) estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e (d) estabilidade de longa duração.

4.1.5.6.1 Estabilidade de curta duração

No estudo de estabilidade de curta duração as amostras de CQB e CQA foram processadas e analisadas após permanecerem 6 horas a temperatura ambiente, tempo superior ao utilizado durante a análise das amostras do estudo.

4.1.5.6.2 Estabilidade de pós-processamento

As amostras de CQB e CQA foram processadas e mantidas nas mesmas condições de análise das amostras em estudo por um tempo superior à duração da corrida analítica mais longa. Neste estudo, após serem processadas as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas antes de serem analisadas.

4.1.5.6.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Neste estudo de estabilidade, as amostras de CQB e CQA foram congeladas à -70 ºC (temperatura na qual todas as amostras foram armazenadas após coletadas) por 24 horas. Após esse período, foram submetidas ao descongelamento por 1 hora para atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram novamente congeladas sob as mesmas condições anteriores. Três ciclos de congelamento e descongelamento foram efetuados, e ao final do último ciclo as amostras foram processadas e analisadas.

4.1.5.6.4 Estabilidade de longa duração

As amostras de plasma de CQB e CQA foram armazenadas a -70 ºC por um período superior ao intervalo de tempo entre a coleta das amostras e sua análise. Assim sendo, as amostras dos controles de qualidade foram processadas e analisadas após serem mantidas a -70 ºC por 4 meses.

4.1.5.6.5 Estabilidade da GAB e do PI em solução

Para avaliar a estabilidade da GAB em solução foram analisadas triplicatas da solução-padrão estoque (100 µg/mL de metanol) e da solução-padrão de trabalho de menor concentração (1 µg/mL de metanol) após essas soluções ficarem armazenadas a -20 ºC por 120 dias. Para avaliar a estabilidade do anlodipino (PI) em solução foram analisadas triplicatas da solução estoque (400 µg/mL de água) e da solução de trabalho (200 µg/mL de água) após ficarem armazenadas a 4-8 ºC por 30 dias. As médias das respostas dessas soluções de GAB e PI foram comparadas com as médias obtidas de soluções recém preparadas. As soluções de GAB e PI são

consideradas estáveis quando o desvio da média das respostas não for superior a 10% da média das respostas das soluções recém preparadas.

4.2 Protocolo clínico

4.2.1 Participantes, locais de recrutamento e coordenadores clínicos

Para avaliar a influência dos polimorfismos e outras covariáveis na disposição cinética da GAB foram investigados pacientes tratados com doses múltiplas atendidos no Hospital Estadual Américo Brasiliense (HEAB), no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP), bem como na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara (SCA) entre setembro de 2016 e fevereiro de 2018. O desenvolvimento do projeto foi realizado sob coordenação clínica do Dr. Edgar Ianhez Júnior (HEAB), da Profa. Dra. Fabíola Dach (HC-FMRP-USP) e da enfermeira Mariele Timossi (SCA). O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF-UNESP) (Anexo 2, CAAE: 53902516.4.0000.5426) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Anexo 3, CAAE: 53902516.4.3001.5440). O estudo está cadastrado no *ClinicalTrials.gov* (identificador NCT02977208).

4.2.2 Critérios de inclusão

No presente trabalho foram investigados pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, em uso crônico de GAB quer seja para o tratamento de epilepsia ou para o tratamento de dor crônica atendidos no HEAB, no HC-FMRP-USP e na SCA. Os pacientes que faziam uso de GAB sem alteração de dose pelo período de pelo menos uma semana foram incluídos no protocolo clínico. Esse período é

necessário para que seja atingido o estado de equilíbrio das concentrações plasmáticas de GAB (período superior a 6 meias-vidas do fármaco).

4.2.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do protocolo de estudo as pacientes gestantes, lactantes e/ou pacientes em uso de fármacos inibidores de OCT2 e OCTN1 e ainda os pacientes que não concordam em continuar o estudo.

4.2.4 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado através do programa *Power and Sample Calculation* versão 3.1.2 (Dupont; Plummer, 1997) com base na variabilidade da concentração de GAB no plasma previamente estudada em voluntários sadios (Gordi et al., 2008). Neste estudo a média ± desvio padrão da concentração plasmática mínima (vale) de GAB no estado de equilíbrio foi 1.849 ± 658 ng/mL após a administração de 1.800 mg, uma vez ao dia. Nossa hipótese de trabalho é a de que o polimorfismo genético *SLC22A2* c.808G>T irá elevar em pelo menos 30% a concentração de GAB no plasma em portadores de pelo menos um alelo raro. Tal polimorfismo foi escolhido para o cálculo do tamanho amostral por apresentar menor frequência alélica do que *SLC22A4* c.1507C>T. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em 5%, poder de 0,80 e diferença entre as médias de concentração da GAB no plasma em 30%. A Figura 8 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral do grupo experimental. Como pode ser observada a inclusão de 15 pacientes no grupo experimental, constituído por pacientes portadores de pelo menos um alelo raro, irá acarretar em poder do teste acima de 80%. Tendo em vista que a média da frequência do polimorfismo c.808G>T

é de 11,9% em brasileiros da região sudeste (Refargen, 2014; Bonifaz-Peña et al., 2014), será necessária a inclusão de 67 pacientes em uso de GAB no total. Considerando o total de 67 pacientes incluídos no estudo e com base na frequência alélica do polimorfismo c.808G>T, propõe-se a inclusão de 15 pacientes no grupo experimental e 52 pacientes no grupo controle.

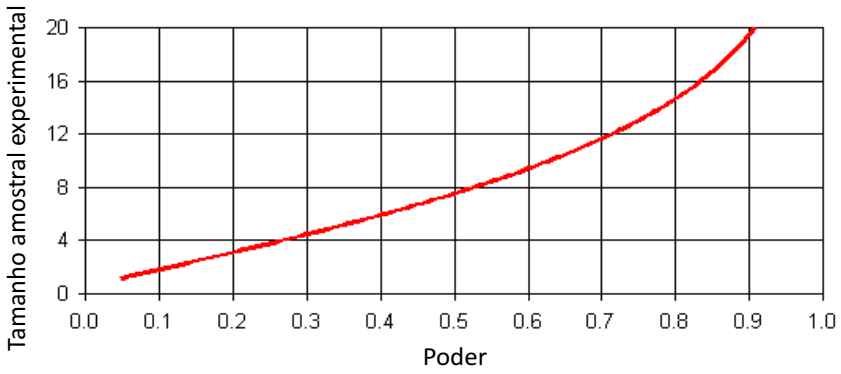


Figura 8. Estudo do tamanho amostral (grupo experimental) em relação ao poder do teste (*Power and Sample Calculation* versão 3.1.2). Fonte: Próprio autor.

4.2.5 Protocolo clínico

Após concordarem em participar do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice 3) previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa, os participantes foram submetidos a 3 coletas de amostras. As características antropométricas (peso corporal e altura), as variáveis demográficas (idade, sexo, raça/cor), bem como informações referentes a comorbidades, ao uso crônico de outros medicamentos e seus regimes posológicos e resultados de exames laboratoriais foram obtidas a partir dos prontuários eletrônicos dos participantes.

Durante o recrutamento foi requisitado aos participantes realizar jejum de 8 horas para as coletas de sangue, porém nem todos seguiram essa orientação devido à presença de outras comorbidades. Antes da administração do fármaco, foram

coletados 20 mL de sangue venoso para análise da concentração plasmática de GAB (8 mL com heparina), determinação de creatinina sérica (Cr_S) (4 mL sem anticoagulante) e genotipagem dos polimorfismos de OCT2 e OCTN1 (8 mL com EDTA). A determinação de Cr_S foi realizada apenas quando o participante estava em jejum de 8 horas e este dado não estava disponível em seu prontuário. O valor de Cr_S foi usado para estimar a taxa de filtração glomerular (eTFG), a qual foi calculada utilizando a equação CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) (Equação 3) através do aplicativo *QxCalculate* (versão 6.12.0 para iOS, QxMD Medical Software, 2017).

$$eTFG = 141 \times min\left(\frac{Cr_S}{\kappa,1}\right)^{\alpha} \times max\left(\frac{Cr_S}{\kappa,1}\right)^{-1,209} \times 0{,}993^{idade} \times 1{,}018(mulher) \times 1{,}159(preto^{*}) \quad (3)$$

Em que:
Cr_S: valor de creatinina sérica (mg/dL)
κ é 0,7 para mulheres e 0,9 para homens
α é -0,329 para mulheres e -0,411 para homens
min: indica o valor mínimo de Cr_S/κ ou 1
max: indica o valor máximo de Cr_S/κ ou 1
*: pacientes autodeclarados pretos e pardos

A segunda amostra de sangue venoso (8 mL com heparina) foi coletada após 1,5 horas da administração do fármaco para análise da concentração plasmática de GAB. A terceira amostragem foi realizada após 4 horas da administração do fármaco, sendo coletados 8 mL de sangue venoso com heparina para a análise da concentração plasmática de GAB. No caso dos participantes internados e quando possível, também foi realizada a coleta de urina no intervalo entre as doses de GAB, (Figura 9).

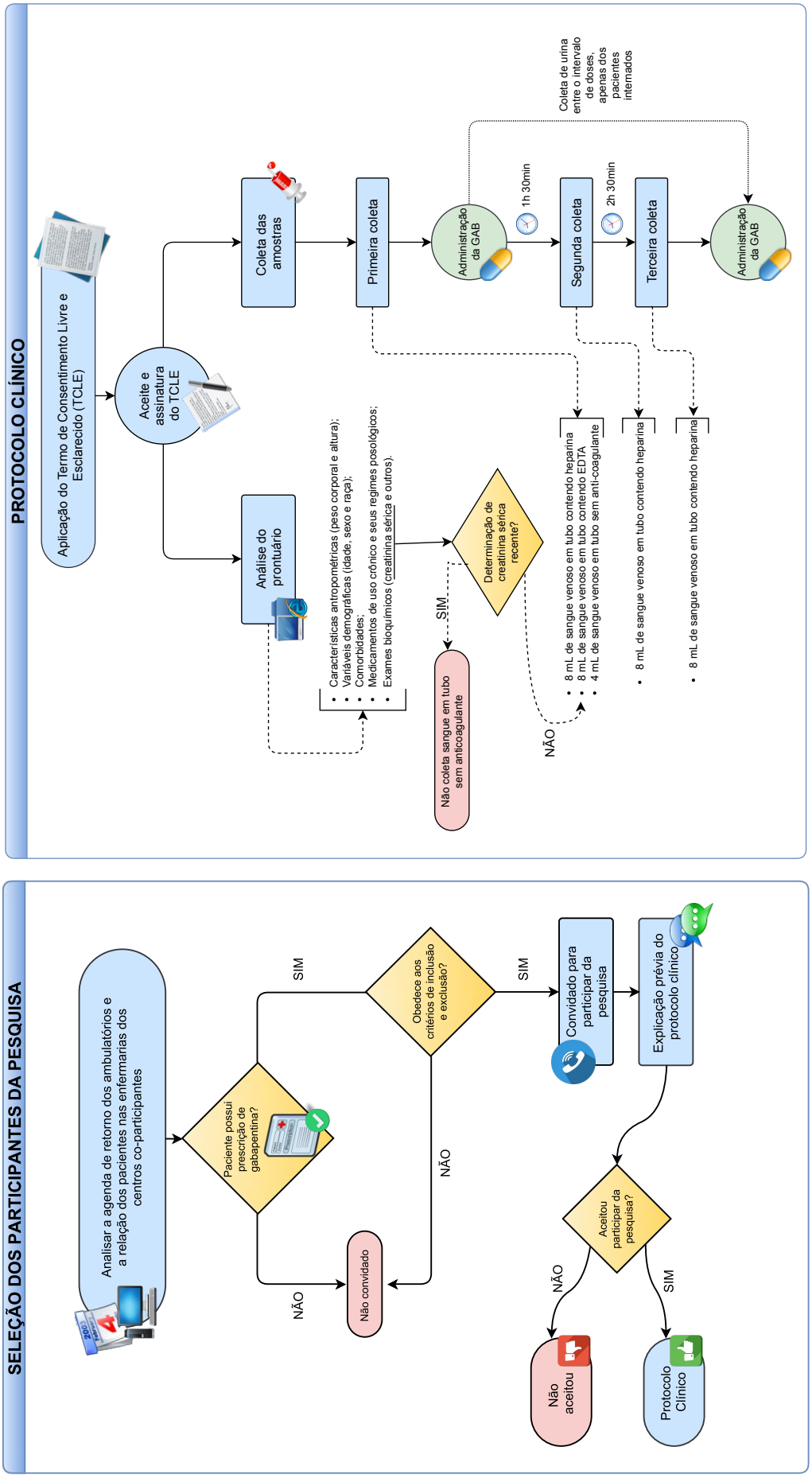


Figura 9. Fluxograma da seleção dos participantes e do protocolo clínico do estudo. Fonte: Próprio autor.

4.3 Genotipagem

4.3.1 Extração de DNA genômico humano

O DNA genômico (gDNA) foi extraído de amostras de 4 mL de sangue venoso coletado em tubo contendo EDTA utilizando a técnica de *salting-out* (modificado de Lahiri; Nurnberger, 1991). Brevemente, as amostras de sangue foram transferidas para tubos de 50 mL limpos e foi adicionado tampão de lise I gelado [102,69 g sacarose; 0,048 g MgCl; 10 mL Triton X-100 dissolvidos com solução de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)] até o volume final de 18 mL. Os tubos foram invertidos delicadamente e centrifugados por 6 minutos a 1.780 rcf, à 4 ºC. Após centrifugar, o sobrenadante foi descartado e o precipitado retido no fundo do tubo foi ressuspendido com 1,8 mL de tampão de lise II (4,35 g NaCl; 8,92 g EDTA, o pH foi ajustado com NaOH para pH 8,0 e o volume completado para 1 L), 50 µL de SDS 10% e 440 µL de perclorato de sódio 5 M. As amostras foram submetidas a agitação vigorosa por 10 segundos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,8 mL de NaCl 6 M saturado e os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos à temperatura ambiente e centrifugados por 8 minutos à 2.000 rcf, à temperatura ambiente. Cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e adicionado de 2 mL de isopropanol absoluto (à temperatura ambiente). Os tubos foram homogeneizados por inversão gentilmente, por aproximadamente 2 minutos, até o DNA precipitar. O DNA precipitado foi retirado com auxílio de uma ponteira e transferido para um microtubo limpo. Para retirar o isopropanol, o DNA foi lavado com 0,4 mL de etanol 70% gelado e centrifugado por 5 minutos a 15.000 rcf. O excesso de etanol foi retirado e o DNA ficou à temperatura ambiente até secar completamente. Por fim, as amostras de DNA foram reconstituídas com 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 e 1 mM EDTA pH 8,0).

A quantificação do gDNA foi realizada utilizando espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (versão 1.5, Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA), o qual também fornece a razão A_{260nm}/A_{280nm} (razão da absorbância do DNA pela absorbância de proteínas) utilizada para verificar a pureza da amostra ($A_{260nm}/A_{280nm} \approx 1,8$ o DNA é considerado "puro") (Matlock, 2015).

4.3.2 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

A genotipagem dos SNPs foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF-UNESP). A avaliação dos polimorfismos c.808G>T (A270S) do gene *SLC22A2* e c.1507C>T (L503F) do gene *SLC22A4* foi feita por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) utilizando os kits *TaqMan™ Drug Metabolism SNP Genotyping Assay* da *Applied Biosystems*® (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda, Itapevi, Brasil), ensaios C__3111809_20 e C__3170459_30, respectivamente.

As amostras de gDNA extraídas a partir do sangue total foram diluídas para a concentração de 1,5 ng/µL. A reação de RT-PCR foi realizada no termociclador 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*®, Foster City, EUA) utilizando os reagentes e condições descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Reagentes e condições da reação de RT-PCR utilizados para genotipagem

1. Preparo da reação de RT-PCR

Reagente	*Volume (µL)*
gDNA (1,5 ng/µL)	11.25
TaqMan® Master Mix 2X	12.50
SNP Genotyping *Assay* 20X	1.25
Volume total (µL/poço)	**25**

2. Condições para reação de RT-PCR

Etapa	*Temperatura*	*Tempo*	*Ciclos*
Ativação da enzima	95 ºC	10’	espera
Desnaturação	95 ºC	15’’	50
Anelamento/Extensão	60 ºC	90’’	

TaqMan® Master Mix: contém DNA polimerase AmpliTaq Gold®, desorribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), ROX™ (referência interna utilizada para normalizar a fluorescência) e tampão; *SNP* Genotyping *Assay* 20X: contém oligonucleotídeos iniciadores com sequências específicas para o SNP, marcadores TaqMan® MGB para detecção do alelo 1 (VIC®) e do alelo 2 (FAM®)

4.4 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do *software GraphPad Prism* (versão 6.0c para Macintosh, GraphPad software, São Diego, CA, EUA). O teste de correlação de Spearman (não paramétrico) foi utilizado para avaliar a correlação entre as variáveis [idade, peso corpóreo, eTFG e índice de massa corporal (IMC)] com a razão da concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio pela dose diária (razão $Cp_{mín}$/DD). A análise da diferença entre sexo foi realizada através do teste Mann-Whitney, teste-*t* não paramétrico para amostras não pareadas. A concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio (concentração no vale) e as potenciais covariáveis (idade, sexo, eTFG, peso ou IMC, cor/raça e dose diária) foram relacionadas através uma regressão linear múltipla utilizando o *software IBM SPSS Statistics* (para Macintosh, versão 23, IBM Corp., Armonk, NY, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $P<0,05$.

A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada quanto a desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste do qui-quadrado (χ^2). As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas utilizando as Equações 4 e 5. As razões $Cp_{mín}$/DD foram comparadas entre os genótipos de OCT2 e OCTN1 usando o

teste de Kruskal-Wallis ou teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P<0,05.

$$\boldsymbol{p + q = 1} \quad (4)$$

$$\boldsymbol{p^2 + 2pq + q^2 = 1} \quad (5)$$

Em que:
p é a frequência do alelo selvagem
q é a frequência do alelo raro
p^2 é a frequência do genótipo homozigoto para o alelo selvagem
2pq é a frequência do genótipo heterozigoto
q^2 é a frequência do genótipo homozigoto para o alelo raro

4.5 Análise farmacocinética populacional

Os parâmetros farmacocinéticos da GAB foram estimados usando abordagem populacional através do *software Monolix® Suite 2018R1* (Lixoft®, Antony, França) em colaboração com a Profa. Dra. Francine Johansson Azeredo da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Com base na análise visual dos dados e em estudos disponíveis na literatura (Carlsson et al., 2009; Ahmed et al., 2017; Tran et al., 2017), o modelo estrutural avaliado foi o modelo de 1-compartimento, com absorção de primeira ordem e eliminação linear. Os dados observados de concentração plasmática e a variabilidade interindividual (VII) dos parâmetros foram descritos utilizando uma distribuição normal e log-normal, respectivamente. O modelo foi parametrizado em clearance (Cl), volume de distribuição (V) e constante de absorção (ka). Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados utilizando a aproximação estocástica.

Diferentes modelos de erros foram analisados para explicar a variabilidade do erro residual incluindo modelo de erro aditivo e proporcional. Os modelos foram comparados considerando os valores de verossimilhança, representados por *-2×log-likelihood* (-2LL), e dos critérios de Akaike (AIC), sendo que o melhor modelo apresenta valores menores.

Após estabelecer o modelo base, novos modelos adicionando as variáveis investigadas no estudo (IMC, eTFG, sexo, genótipo de OCT2 e OCTN1) foram desenvolvidos. A análise visual dos gráficos e testes estatísticos (correlação de Pearson e ANOVA) foram realizados para verificar se há alguma relação entre os efeitos aleatórios dos parâmetros (η) e as variáveis que poderia contribuir para melhorar o modelo.

As covariáveis foram adicionadas separadamente ao modelo base, a fim de verificar se sua adição contribui para melhorar o ajuste do modelo aos dados observados. A adição de uma covariável foi considerada estatisticamente significativa quando resultou em uma redução de 3,84 do valor de -2LL (χ^2, P≤0,05, graus de liberdade= 1) e redução de 2 no valor de AIC (Mould; Upton, 2013). Este processo foi repetido até que a adição de uma covariável não reduziu os valores de -2LL e AIC. Em seguida, um processo de eliminação de covariáveis foi realizado, no qual as covariáveis que ao serem retiradas não resultaram em um aumento de 6,63 do valor de -2LL (χ^2, P≤0,01, graus de liberdade= 1) eram eliminadas do modelo final.

Durante o desenvolvimento do modelo base até a obtenção do modelo final, os gráficos diagnóstico que mostram o ajuste dos dados observados ao modelo desenvolvido também foram avaliados. Portanto, foram avaliados os gráficos que correlacionam as concentrações plasmáticas observadas com as concentrações plasmáticas individuais ou populacionais preditas; gráficos de distribuição dos resíduos populacionais e individuais ponderados (PWRES e IWRES, respectivamente) e a distribuição dos erros preditos normalizada (NPDE). Além disso, para avaliar se simulações realizadas a partir do modelo desenvolvido são capazes de reproduzir a mediana e a variabilidade dos dados observados foi gerado um gráfico

para verificação visual dos dados preditos (VPC, *visual predictive check*), o qual apresenta os percentis 5, 50 e 95 dos dados observados e dos dados simulados.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da GAB em plasma e urina por CLAE-UV

A validação dos métodos desenvolvidos foi realizada de acordo com a Resolução da ANVISA, RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, para a validação de métodos bioanalíticos (Brasil, 2012b). A Figura 10 apresenta os cromatogramas da análise de GAB em plasma e urina humana. A GAB e o PI (anlodipino) foram completamente separados em menos de 10 minutos. Os métodos foram considerados seletivos e não apresentaram efeito residual (Figura 11). O LIQ de 200 ng/mL de plasma foi determinado após a análise em triplicata de amostras enriquecidas com GAB nas concentrações de 100 e 200 ng/mL. Uma triplicata das concentrações de 2 e 4 µg/mL de urina foi analisada para determinar o LIQ em urina, o qual ficou estabelecido como 2 µg/mL de urina.

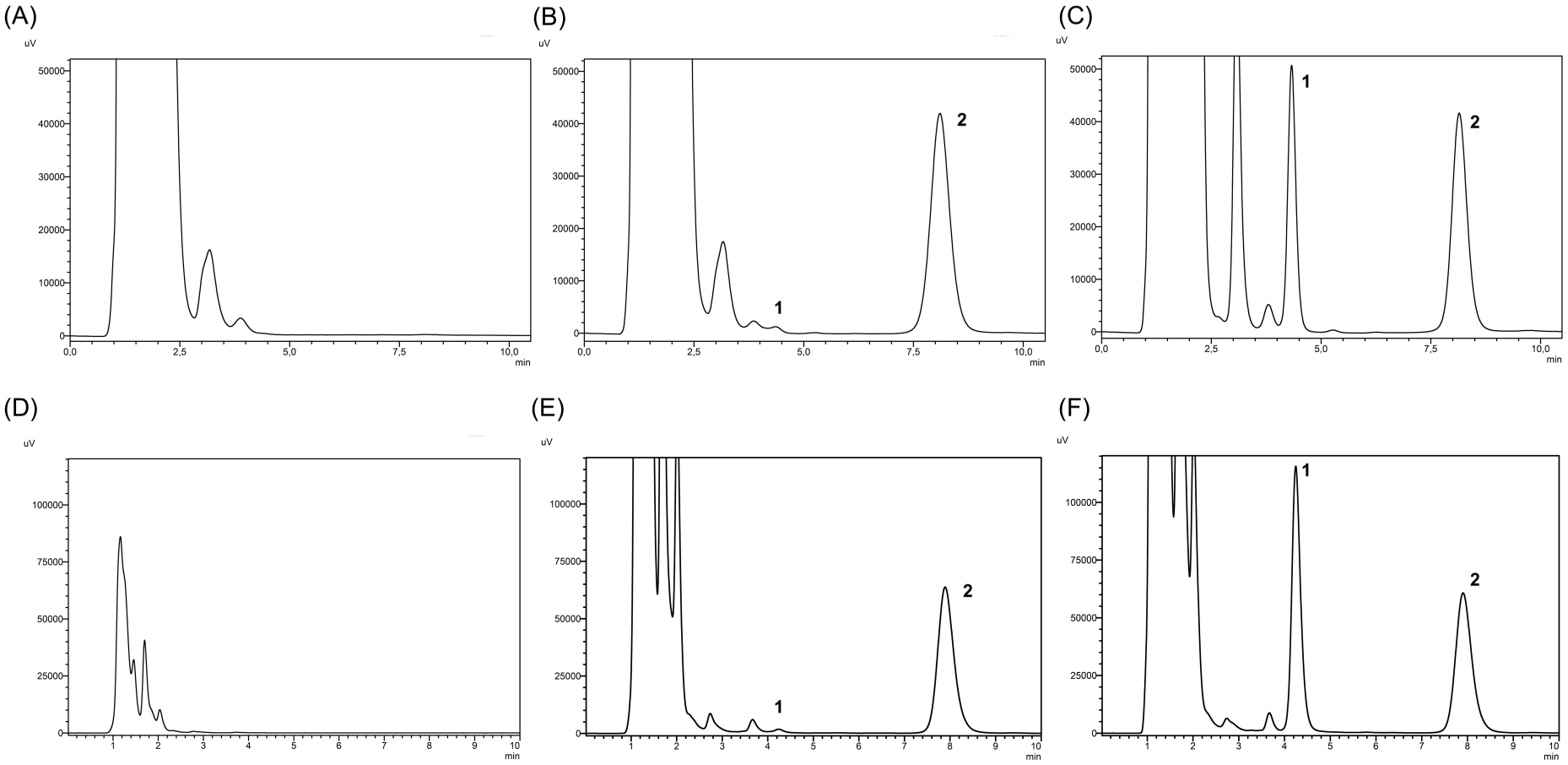


Figura 10. Cromatogramas referentes à análise da gabapentina e do padrão interno (anlodipino) em plasma e urina humana por CLAE-UV. (A) Plasma humano branco (B) Plasma humano enriquecido com gabapentina na concentração de 200 ng/mL de plasma e padrão interno (anlodipino, 200 µg/mL) (C) Plasma de participante obtido no estado de equilíbrio enriquecido com anlodipino na concentração de 200 µg/mL (D) Urina humana branco (E) Urina humana enriquecida com gabapentina na concentração de 2 µg/mL de urina e padrão interno (anlodipino, 200 µg/mL) (F) Urina de participante obtido no estado de equilíbrio enriquecida com anlodipino na concentração de 200 µg/mL. [Picos: 1. Gabapentina, 2. Padrão interno (Anlodipino)].

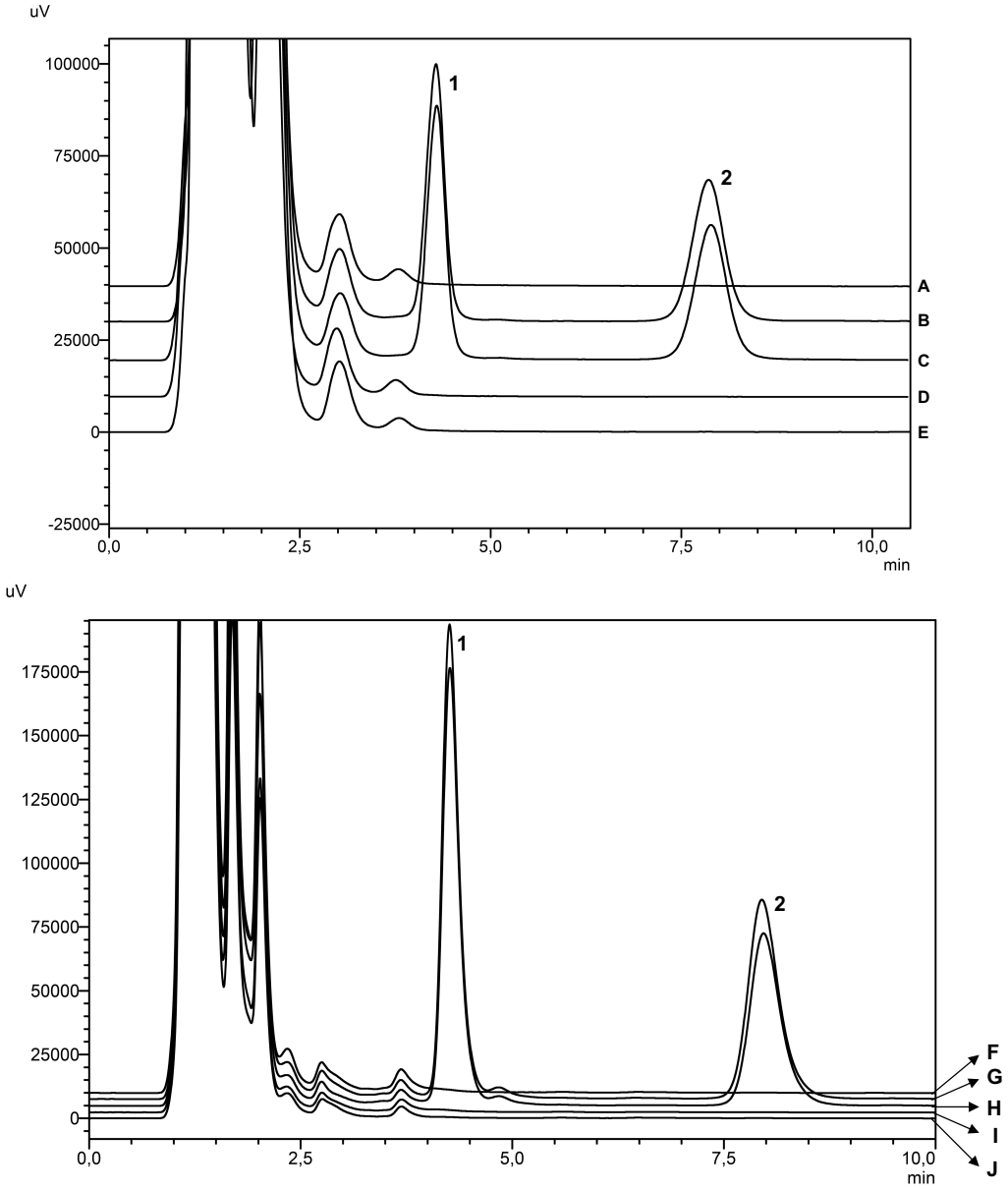


Figura 11. Cromatogramas obtidos para o efeito residual em plasma (superior) e urina (inferior). (A) (D) (E) Plasma humano branco; (B) (C) Plasma humano branco enriquecido com 14.000 ng/mL de GAB (LSQ) e padrão interno (anlodipino, 200 µg/mL). (F) (I) (J) Urina humana branco; (G) (H) Urina humana branco enriquecida com 120 µg/mL de GAB (LSQ) e padrão interno (anlodipino, 200 µg/mL). [Picos: 1. Gabapentina, 2. Padrão interno (Anlodipino)].

A curva analítica incluiu a análise das amostras branco, zero e de amostras com concentrações finais de 200, 400, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 12.000, 14.000 ng/mL em plasma e 2, 4, 8, 12, 20, 30, 40, 60, 80 e 120 µg/mL em urina. A curva de calibração foi gerada através do gráfico da razão entre a área da GAB/área do PI *vs.* a concentração da GAB. Os métodos apresentaram coeficientes de determinação (R^2) ≥ 0,98 para o plasma e urina, porém o fato de apresentar R^2 ≥ 0,98 não é suficiente

para indicar que o método é linear (Figuras 12A e 12B) nos intervalos de concentração investigados, uma vez que também é necessária a análise de homogeneidade da variância dos dados (homocedasticidade).

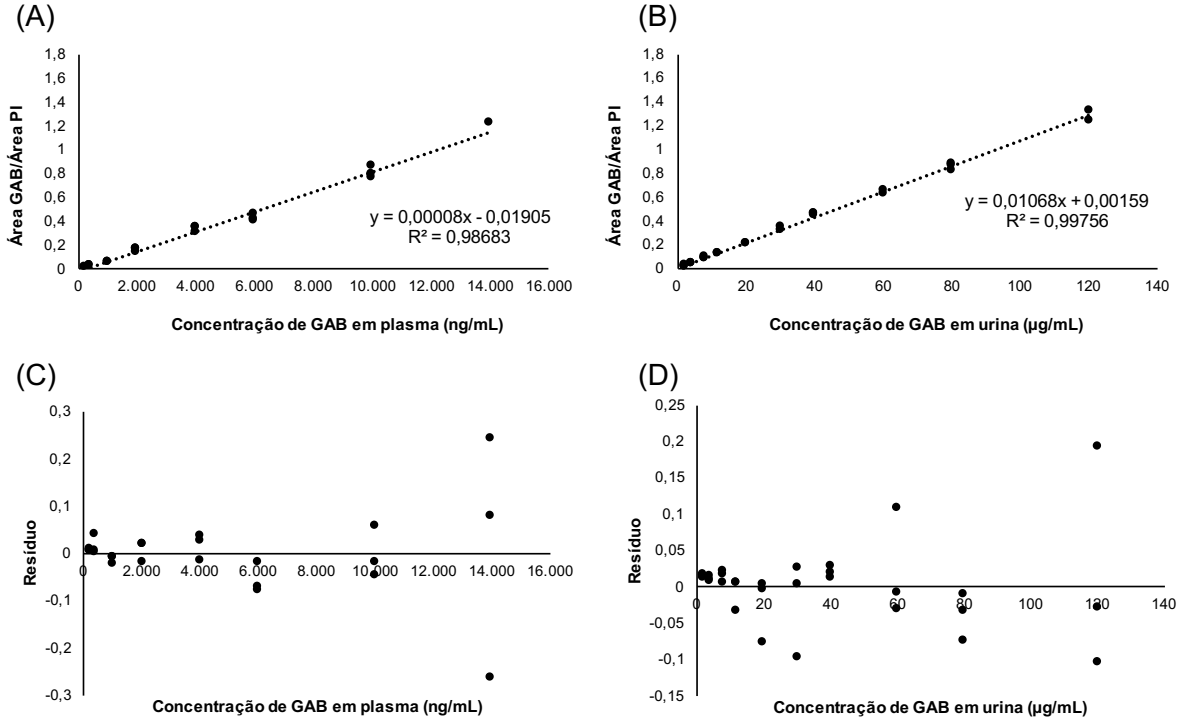


Figura 12. Análise da linearidade. Curvas analíticas da GAB em plasma (A) e em urina (B) humanas representadas pela regressão linear ordinária entre a razão Área GAB/Área PI *vs*. concentração de GAB. Gráficos de resíduos *vs*. concentração de GAB em plasma (C) e urina (D).

A homocedasticidade (variâncias iguais) foi observada através dos gráficos de resíduos *vs*. concentração e do teste-*F* (Almeida; Castelo-Branco; Falcão, 2002; Da Silva; Emídio; De Marchi, 2015). No teste-*F* os dados apresentam variâncias igualmente distribuídas quando o valor de F tabelado (F_{tab}: valor tabelado utilizando um intervalo de confiança de 99% e graus de liberdade= 2) for maior que o valor de F experimental (F_{exp}). O valor de F_{exp} foi calculado através da Equação 6, a qual utiliza os valores de variância da menor concentração ($\boldsymbol{S^2_{LIQ}}$) e da maior concentração ($\boldsymbol{S^2_{LSQ}}$). Como observado na Tabela 6, os valores de F_{exp} foram maiores que de F_{tab} para

ambos os métodos, ou seja, os dados apresentam heterocedasticidade (variâncias desiguais).

$$F_{exp} = \frac{S^2_{LIQ}}{S^2_{LSQ}} \quad (6)$$

Tabela 6. Teste-*F* realizado para avaliar a homocedasticidade dos dados (n=3)

Matriz	Conc.	Área GAB	Área PI	Razão A_{GAB}/A_{PI}	S^2	F_{exp}	F_{tab} (2; 2; 0,99)
Plasma							
	200 ng/mL	15.931	1.449.118	0,011	5,46E^{-06}	12.259,9	99,0
		17.848	1.159.668	0,015			
		13.011	1.100.829	0,012			
	14.000 ng/mL	1.226.904	1.397.321	0,878	6,70E^{-02}		
		1.245.371	1.019.631	1,221			
		1.270.855	917.540	1,385			
Urina							
	2 µg/mL	25.844	1.510.775	0,017	1,46E^{-06}	16.151,4	99,0
		26.915	1.503.555	0,018			
		30.447	1.562.991	0,019			
	120 µg/mL	1.882.602	1.520.153	1,238	2,36E^{-02}		
		2.001.415	1.523.180	1,314			
		2.118.539	1.381.078	1,534			

Conc.: concentração; S^2: variância; F_{exp}: valor de F experimental; F_{tab} (2; 2; 0,99): valor de F tabelado considerando intervalo de confiança de 99% e graus de liberdade (n-1)= 2.

Os gráficos de resíduos *vs*. concentração mostram que não há uma distribuição homogênea e aleatória das variâncias em torno do eixo x, mesmo a equação da regressão linear ordinária apresentando coeficiente de determinação ≥ 0,98. É possível observar que a variância aumenta com o aumento da concentração, assim sendo, as concentrações mais altas influenciam mais a regressão linear do que as menores concentrações, podendo gerar valores de menor concentração menos exatos (Figura 12C e 12D).

Tendo em vista, a não homocedasticidade dos dados, modelos de ponderação foram analisados para definir qual modelo apresenta uma distribuição mais homogênea em torno do eixo x, e além disso, também foi considerado o modelo que apresentou a menor somatória dos erros relativos (%erro) (Equação 7). Os

parâmetros da regressão linear obtidos utilizando diferentes pesos ($\mathbf{1/x}, \mathbf{1/\sqrt{x}}, \mathbf{1/x^2}, \mathbf{1/y}, \mathbf{1/\sqrt{y}}, \mathbf{1/y^2}$) e as respectivas somatórias dos erros relativos (∑%erro) estão representados na Tabela 7.

$$\%\boldsymbol{erro} = \frac{\boldsymbol{C_{experimental} - C_{nominal}}}{\boldsymbol{C_{nominal}}} \times \mathbf{100} \quad (7)$$

Ao utilizar a ponderação $\mathbf{1/x^2}$ foram observados menor valor da somatória dos erros relativos (∑%erro= 0,00), melhor distribuição das variâncias em torno do eixo x e menores valores de erro relativo (%erro) para ambos os métodos (Tabela 7, Figura 13). Portanto, a linearidade dos métodos foi avaliada utilizando o modelo matemático linear com ponderação de $\mathbf{1/x^2}$. Após a ponderação foram observados erros inferiores a 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações indicando que o método apresentou linearidade nos intervalos de 200 a 14.000 ng/mL de plasma e 2 a 120 µg/mL de urina (Figura 13).

Tabela 7. Parâmetros da regressão linear (y= ax + b) obtidos utilizando diferentes pesos (w_i) e suas respectivas somatórias dos erros relativos (∑%erro)

Matriz	Peso (w_i)	a	b	r	∑%erro
Plasma					
	$\mathbf{1}$	0,00008	-0,01905	0,99339	144,16
	$\mathbf{1/x}$	0,00008	-0,00829	0,99469	0,00
	$\mathbf{1/\sqrt{x}}$	0,00008	-0,01133	0,99447	35,82
	$\mathbf{1/x^2}$	0,00008	-0,00605	0,99257	0,00
	$\mathbf{1/y}$	0,00008	-0,00803	0,99455	11,87
	$\mathbf{1/\sqrt{y}}$	0,00008	-0,01124	0,99447	41,08
	$\mathbf{1/y^2}$	0,00008	-0,00527	0,99194	41,72
Urina					
	$\mathbf{1}$	0,01068	0,00159	0,99878	-120,66
	$\mathbf{1/x}$	0,01083	-0,00375	0,99887	0,00
	$\mathbf{1/\sqrt{x}}$	0,01076	-0,00217	0,99895	-30,14
	$\mathbf{1/x^2}$	0,01088	-0,00415	0,99741	0,00
	$\mathbf{1/y}$	0,01082	-0,00396	0,99888	9,23
	$\mathbf{1/\sqrt{y}}$	0,01076	-0,00240	0,99896	-22,51
	$\mathbf{1/y^2}$	0,01080	-0,00417	0,99702	17,78

a: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r: coeficiente de correlação; x: concentração; y: razão entre a área de gabapentina e a área do padrão interno; %erro: erro relativo {[(concentração experimental – concentração nominal)/concentração nominal] × 100}.

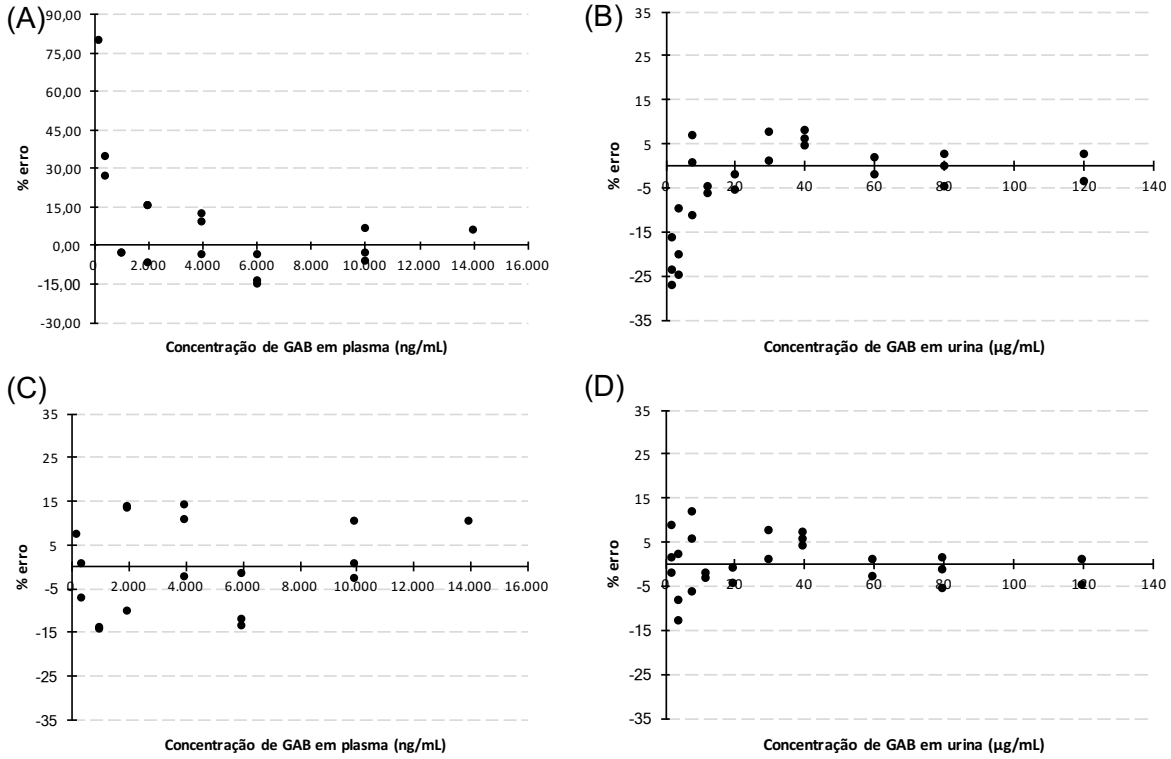


Figura 13. Gráficos da %erro *vs*. concentração de gabapentina, em plasma e urina, comparando a regressão linear ordinária com a regressão linear após utilizar ponderação. Regressão linear ordinária em plasma (A) e em urina (B). Regressão linear após utilizar a ponderação de $\mathbf{1}/\boldsymbol{x}^{\mathbf{2}}$ em plasma (C) e em urina (D).

Os métodos desenvolvidos apresentaram precisão intra e intercorrida, representada pelo coeficiente de variação (CV, %), dentro do estabelecido pela ANVISA (item 4.1.5.5). O método em plasma apresentou valores de CV ≤ 9,89% e o método em urina valores de CV ≤ 13,86% para todos os níveis de concentração analisados nos testes intra e intercorrida (Tabela 8). Os métodos além de precisos são exatos, pois apresentaram erro padrão relativo (EPR, %) inferiores a 15%, conforme as recomendações da ANVISA para todos os níveis de concentração analisados e nos ensaios intra e intercorrida (Tabela 8).

Tabela 8. Precisão e exatidão (intracorrida e intercorrida) da gabapentina em plasma e urina humana por CLAE-UV

	Concentração		Precisão CV (%)	Exatidão EPR (%)
	Nominal	Experimental (média ± DP)		
Plasma				
Intracorrida (n=5)	LIQ (200 ng/mL)	206,74 ± 12,90	6,24	3,37
	CQB (400 ng/mL)	422,18 ± 18,27	4,33	5,54
	CQM (6.000 ng/mL)	6.798,35 ± 61,16	0,90	13,31
	CQD (20.000 ng/mL)	19.793,47 ± 1.062,69	5,37	-1,03
	CQA (11.000 ng/mL)	12.482,08 ± 640,09	5,13	13,47
Intercorrida (n=3)	LIQ (200 ng/mL)	203,39 ± 20,12	9,89	1,69
	CQB (400 ng/mL)	410,22 ± 17,85	4,35	2,55
	CQM (6.000 ng/mL)	6.882,55 ± 208,26	3,03	14,71
	CQD (20.000 ng/mL)	20.590,49 ± 1.261,90	6,13	2,95
	CQA (11.000 ng/mL)	12.465,47 ± 506,91	4,07	13,32
Urina				
Intracorrida (n=5)	LIQ (2 µg/mL)	2,06 ± 0,09	4,53	3,02
	CQB (4 µg/mL)	3,45 ± 0,11	3,06	-13,63
	CQM (60 µg/mL)	53,77 ± 3,67	6,82	-10,39
	CQD (300 µg/mL)	281,10 ± 14,51	5,16	-6,30
	CQA (90 µg/mL)	82,47 ± 2,34	2,83	-8,36
Intercorrida (n=3)	LIQ (2 µg/mL)	2,08 ± 0,20	9,74	4,15
	CQB (4 µg/mL)	3,70 ± 0,35	9,45	-7,60
	CQM (60 µg/mL)	56,64 ± 5,00	8,83	-5,61
	CQD (300 µg/mL)	325,95 ± 45,19	13,86	8,65
	CQA (90 µg/mL)	91,10 ± 9,04	9,92	1,23

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação [(desvio padrão/média das concentrações) × 100]; EPR: erro padrão relativo {[(concentração média observada – concentração nominal)/concentração nominal] × 100}; LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQD: controle de qualidade de diluição; CQA: controle de qualidade de alta concentração.

Os estudos de estabilidade realizados indicaram que as amostras de GAB são estáveis em plasma e/ou urina após permanecerem à temperatura ambiente por até 6 horas (estabilidade de curta duração), após 3 ciclos de congelamento (-70 ºC) e descongelamento (temperatura ambiente) e depois de serem armazenadas a -70 ºC por 120 dias (estabilidade de longa duração). Após serem processadas, as amostras foram estáveis por até 24 horas quando mantidas a temperatura ambiente (Tabela 9).

As soluções-padrão de GAB (solução-padrão estoque, 100 µg/mL de metanol; e solução-padrão de trabalho de menor concentração, 1 µg/mL de metanol) apresentaram estabilidade quando armazenadas a -20 ºC por 120 dias (Tabela 9). Por outro lado, as soluções-padrão de anlodipino (200 e 400 µg/mL de água) foram estáveis após 30 dias armazenadas a 4-8 ºC (Tabela 9).

Tabela 9. Estabilidade da gabapentina em matrizes biológicas (plasma e urina) e em solução (n=3)

	EPR (%)			
	Plasma (ng/mL)		Urina (µg/mL)	
Condição de armazenamento	CQB (400)	CQA (11.000)	CQB (4)	CQA (90)
Curta duração (6h a 24 ºC)	0,29	9,65	8,44	0,09
Pós-processamento (24h a 24 ºC)	-12,31	11,09	7,04	-0,73
Ciclos de congelamento e descongelamento (n=3)	11,81	10,34	-5.54	-4.22
Longa duração (120 dias a -70 ºC)	-0,89	6,55	n.a.	n.a.

Soluções-padrão	**EPR (%)**
Gabapentina (120 dias a -20 ºC)	
Solução de menor concentração (1 µg/mL metanol)	9,48
Solução estoque (100 µg/mL metanol)	10,08
Anlodipino (30 dias a 4-8 ºC)	
Solução de menor concentração (200 µg/mL água)	-2,24
Solução estoque (200 µg/mL água)	5,21

EPR: erro padrão relativo {[(concentração média observada – concentração nominal)/concentração nominal] × 100}; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; n.a.: não analisado.

5.2 Etapa clínica

5.2.1 Participantes

Foram incluídos 66 participantes no estudo. No entanto, um participante não completou o protocolo clínico e apenas a primeira coleta de sangue foi realizada (Figura 14). A inclusão dos participantes no protocolo clínico foi realizada após terem concordado e assinado o TCLE. Os participantes do estudo foram atendidos no HEAB e no HC-FMRP-USP. Nenhum paciente atendido na SCA foi incluído, devido a adição posterior da SCA como centro co-participante.

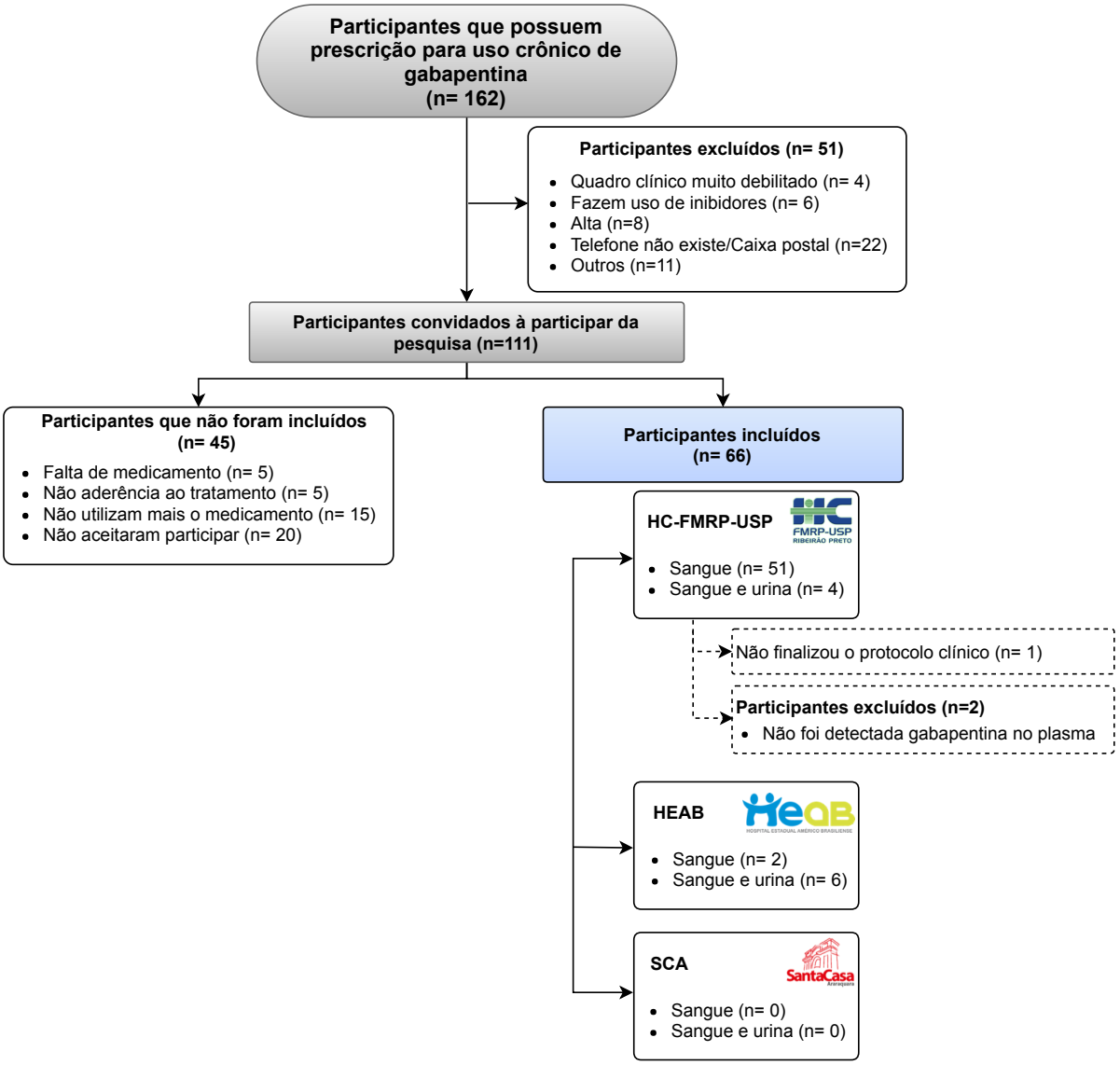


Figura 14. Fluxograma do recrutamento dos participantes do estudo (diagrama de fluxo segundo *CONSORT* 2010). Fonte: próprio autor.

As características demográficas e antropométricas dos participantes incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 10 (Apêndice 4, Tabela 22). Na Tabela 11 estão apresentados os dados clínicos (dose diária, intervalo de dose, comorbidades e exames laboratoriais mais frequentes disponíveis nos prontuários) (Apêndice 4, Tabela 23).

Tabela 10. Características demográficas e antropométricas dos participantes (n=66)

	n	média	DP	CV (%)	mediana	mínimo-máximo
Idade (anos)	66	54	13	24	56	20-75
Peso corporal (kg)	66	79,8	15,6	19,6	77,9	50,0-120,0
Altura (m)	66	1,66	0,09	5,51	1,66	1,47-1,85
IMC (kg/m^2)	66	29,05	5,91	20,36	27,75	19,53-44,89
Sexo	**n (%)**					
Mulher	35 (53)					
Homem	31 (47)					
	n (%)					
Tabagista	11 (16,7)					
Etilista	3 (4,5)					
Raça/cor[a]	**n (%)**					
Branca	59 (89,4)					
Preta	5 (7,6)					
Parda	2 (3,0)					
Amarela	0 (0,0)					
Indígena	0 (0,0)					

IMC: índice de massa corporal; n: número de participantes; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação. [a]Classificação segundo o conceito de cor ou raça do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE (IBGE, 2017)

Tabela 11. Dados clínicos dos participantes (n=66)

	n	média	DP	CV (%)	mediana	mínimo-máximo
Dose diária (mg)	66	1.445	772	53	1.200	600-3.600
Exames laboratoriais						
Creatinina sérica (mg/dL)	55	0,90	0,43	47,82	0,79	0,44-3,34
eTFG (mL/min/1,73m^2)[a]	55	90,41	23,84	26,37	93,20	19,50-132,00
Ureia (mg/dL)	15	36,98	19,24	52,03	31,68	15,07-87,31
Intervalo de dose	**n (%)**					
QD	1 (1,5)					
BID	16 (24,2)					
TID	46 (69,7)					
QID	3 (4,5)					
Comorbidades	**n (%)**					
Hipertensão	32 (48,5)					
Dislipidemia	22 (33,3)					
Diabetes mellitus	13 (19,7)					

n: número de participantes; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; eTFG: taxa de filtração glomerular estimada; QD: uma vez ao dia (*once daily*); BID: duas vezes ao dia (*twice a day*); TID: três vezes a dia (*three times a day*); QID: quatro vezes ao dia (*four times a day*).
[a]estimada utilizando a equação CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) através do aplicativo *QxCalculate* (versão 6.12.0 para iOS, QxMD Medical Software, 2017).

As indicações mais frequentes do uso da GAB foram para o tratamento de dor neuropática por hérnia discal, dor neuropática central (por exemplo, mielite transversa, esclerose múltipla), dor neuropática pós acidente vascular cerebral, neuropatia diabética, neuralgia do trigêmeo. Após a consulta aos prontuários, foi observado que

nenhum dos participantes apresentava diagnóstico de epilepsia. Portanto, neste estudo, a GAB foi indicada apenas para o tratamento de dor crônica.

Antidepressivos (como, amitriptilina, sertralina, fluoxetina), anti-hipertensivos (losartana, hidroclorotiazida, enalapril) e analgésicos (dipirona, codeína, paracetamol, tramadol) são as classes de medicamentos prescritos para quase 50% dos participantes que fazem uso de GAB. A Tabela 12 mostra quais são as classes terapêuticas mais frequentes e os medicamentos mais prescritos de cada uma delas. As informações individuais estão apresentadas na Tabela 24 (Apêndice 4).

Tabela 12. Medicamentos de uso crônico mais prescritos para os participantes (n=66)

Classe terapêutica	n (%)	Medicamentos mais prescritos (n)
Antidepressivos	44 (66,7%)	Amitriptilina (19), Sertralina (9), Fluoxetina (8), Nortriptilina (6), Venlafaxina (5)
Anti-hipertensivos	34 (51,5%)	Losartana (11), Hidroclorotiazida (10), Enalapril (7), Anlodipino (5)
Analgésicos	32 (48,5%)	Dipirona (13), Codeína (10), Paracetamol (9), Tramadol (9), Metadona (6)
Antiulceroso	26 (39,4%)	Omeprazol (23)
Anticonvulsivantes	20 (30,3%)	Clonazepam (13)
Antilipêmico	21 (31,8%)	Sinvastatina (10)
Relaxantes musculares	16 (26,5%)	Baclofeno (9), Ciclobenzaprina (8)
Antidiabéticos	12 (18,2%)	Metformina (10), Insulina (5)
Hormônio tiroidiano	9 (13,6%)	Levotiroxina (9)
Outros	37 (56,1%)	Ácido acetilsalicílico (12), Varfarina (6), Enoxaparina sódica (5), Lactulose (5)

5.2.2 Determinação da concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio e da quantidade de GAB excretada inalterada na urina

No presente estudo, as concentrações plasmáticas mínima de GAB no estado de equilíbrio ($Cp_{mín}$) variaram de 402,0 a 11.937,9 ng/mL para os participantes tratados com doses diárias que variaram de 600 a 3.600 mg (Figura 15).

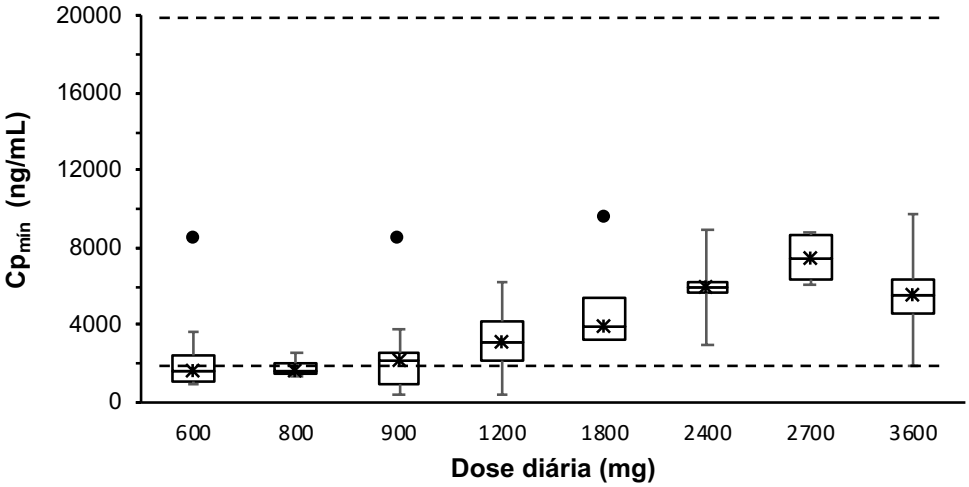


Figura 15. Concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio (n=64). A linha tracejada representa o intervalo de referência (2.000 – 20.000 ng/mL). Mediana (∗), percentil 25 (linha inferior), percentil 75 (linha superior) e *outliers* (•).

As amostras de urina no intervalo de doses foram coletadas e a concentração de GAB foi determinada usando o método cromatográfico descrito acima. No entanto, foi possível coletar a urina de apenas 10 participantes, uma vez que o número de pacientes internados investigados foi baixo em relação ao número de pacientes ambulatoriais. Foi observada alta variabilidade interindividual na quantidade de GAB excretada na urina no intervalo de dose (Ae %) (12,7%-117,0%), a qual diminui com o aumento da dose diária (P= 0,0332) (Tabela 13, Figura 16).

Tabela 13. Quantidade de gabapentina excretada inalterada na urina

Presente estudo (n=10)						
Participante	**Dose (mg)**	**Dose diária (mg/dia)**	**Volume urina (mL)**	**Cu (µg/mL)**	**Ae (mg)**	**Ae (%)**
2	400	800	440	276,5	121,7	30,4
5	400	800	625	415,4	259,6	64,9
30	300	900	550	233,4	128,4	42,8
42	400	800	870	538,0	468,1	117,0
49	400	800	1080	215,0	232,2	58,1
50	400	1.200	190	267,2	50,8	12,7
55	600	1.800	850	199,5	169,6	28,3
59	600	1.800	350	844,8	295,7	49,3
63	900	2.700	550	354,0	194,7	21,6
65	300	900	1000	106,5	106,5	35,5

Cu: concentração de GAB na urina; Ae: quantidade de GAB excretada na urina na sua forma inalterada (concentração de GAB na urina x volume de urina no intervalo de dose); Ae (%): porcentagem da dose excretada inalterada na urina durante o intervalo de doses no estado de equilíbrio [(Ae*100)/Dose]; DPR: desvio padrão relativo (%).

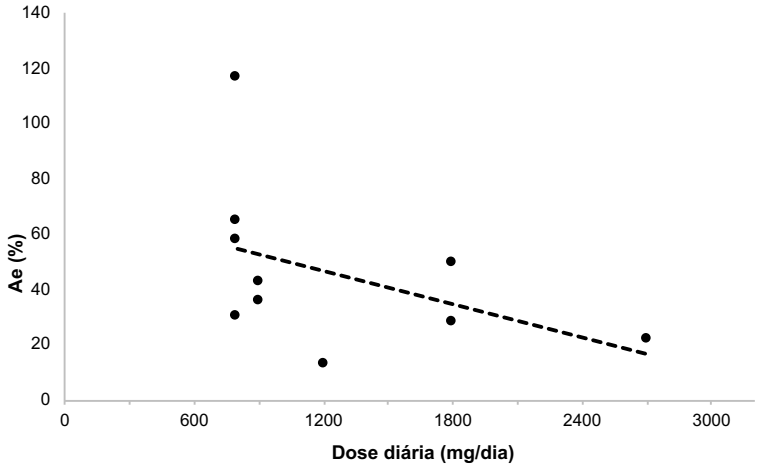


Figura 16. Relação entre a porcentagem da dose excretada inalterada na urina durante o intervalo de dose no estado de equilíbrio (Ae %) e a dose diária (mg/dia).

5.2.3 Correlação entre a concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio e as possíveis covariáveis

Foram realizadas correlações entre a razão da concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio pela dose diária (razão $Cp_{mín}$/DD) e as seguintes variáveis – sexo, idade, IMC, peso corporal e eTFG. A razão $Cp_{mín}$/DD não apresentou diferença estatística quando correlacionada ao sexo (teste Mann-Whitney, teste-*t* não paramétrico para amostras não pareadas, P=0,4057), os valores da mediana (percentil 25-percentil 75) observados foram de 2,526 (1,819-3,363) (ng/mL)/mg e

2,225 (1,733-2,853) (ng/mL)/mg para homens e mulheres, respectivamente (Figura 17).

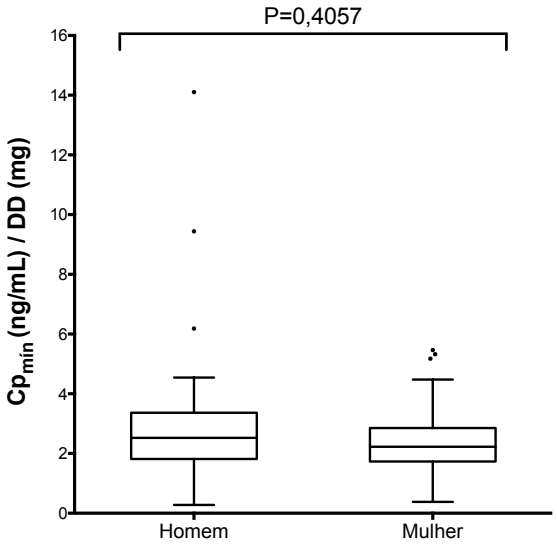


Figura 17. Comparação da razão da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio pela dose diária ($Cp_{mín}$/DD) entre homens e mulheres (n=64). Mediana (linha central), percentil 25 (linha inferior), percentil 75 (linha superior) e *outliers* (•).

Apenas a idade e a eTFG apresentaram correlação significativa com a razão $Cp_{mín}$/DD (Figura 18). A taxa de filtração glomerular estimada apresentou uma correlação negativa com r=-0,6705 (P<0,0001) (Figura 18A), ou seja, a razão $Cp_{mín}$/DD aumenta quando a eTFG diminui. Tal resultado era esperado devido a GAB ser eliminada inalterada na urina. Os resultados obtidos apresentaram uma correlação significativa positiva entre a razão $Cp_{mín}$/DD e a idade com r=0,3877 (P=0,0015) (Figura 18B).

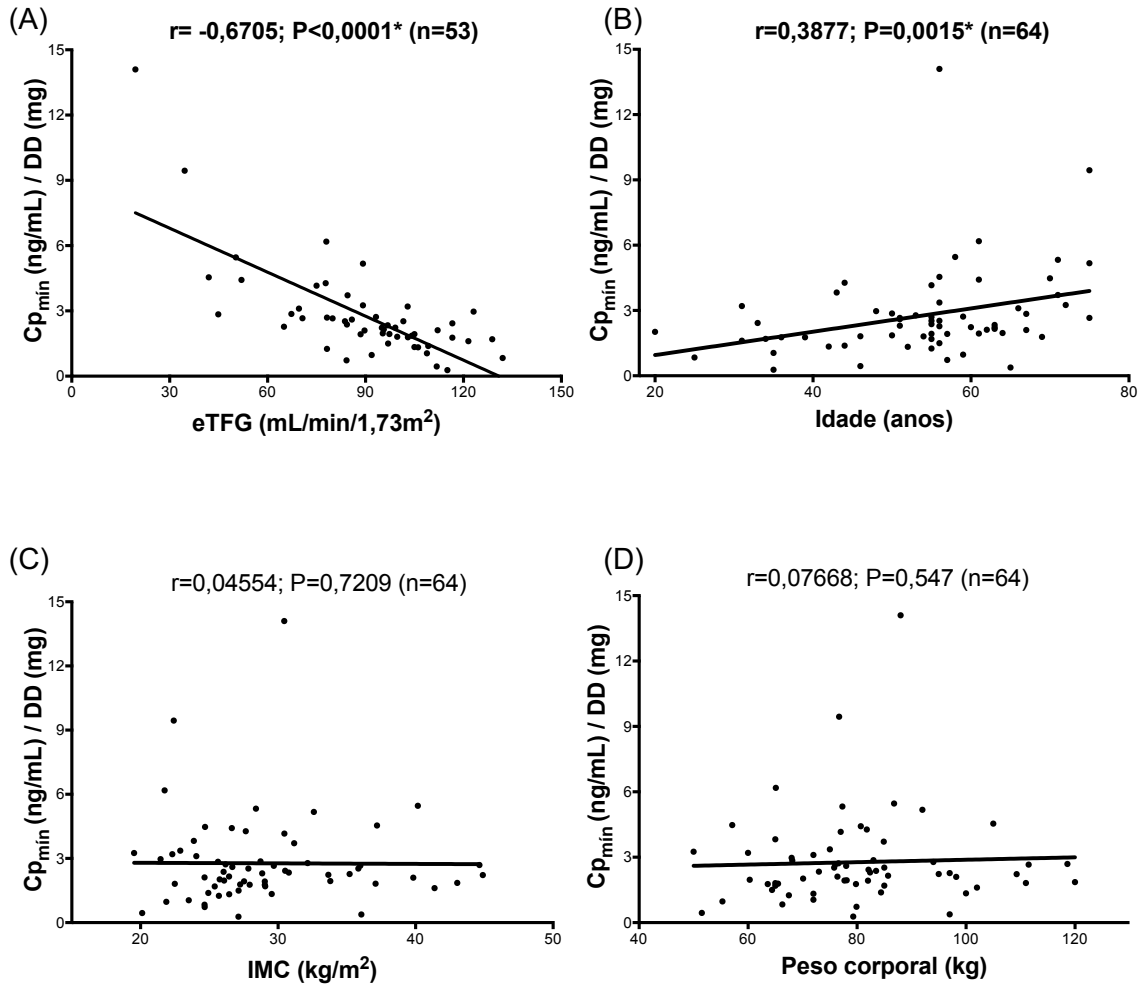


Figura 18. Correlação entre as variáveis (eTFG, idade, peso corporal, IMC) e a razão da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio pela dose diária ($Cp_{mín}$/DD). Coeficiente de correlação de Spearman (r), sendo o valor de P<0,05 considerado estatisticamente significativo

5.2.4 Extração de DNA genômico humano

O DNA genômico (gDNA) dos participantes foi extraído seguindo o protocolo descrito no item 4.3.1. Para verificar a integridade das amostras extraídas, ou seja, se o material genético obtido estava degradado ou não, as amostras foram analisadas em gel 0,5% de agarose, a 70 V por 1 hora e 30 minutos. Como demonstrado na Figura 19, o protocolo de extração foi eficiente para extrair o gDNA, o que foi confirmado pela presença da banda com peso molecular superior a 12 kb. As amostras não apresentaram degradação, pois não foi observado arraste ou bandas de peso molecular inferior. O gDNA obtido não foi tratado com a enzima RNAse, por isso uma contaminação com RNA pode ser observada na base inferior do gel.

Algumas amostras apresentaram maior impureza, tendo em vista a presença de proteínas/polissacarídeos na parte superior dos canais do gel. No entanto, todas as amostras de gDNA extraídas apresentaram pureza próximo ao aceitável (A_{260}/A_{280}= 1,8).

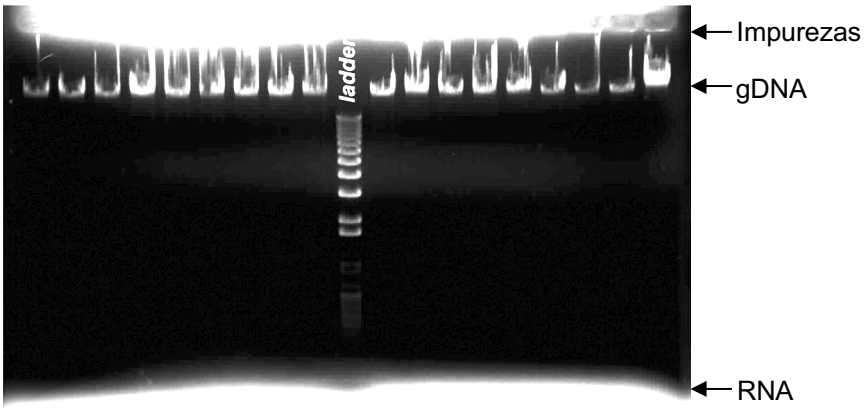


Figura 19. Análise representativa da qualidade do gDNA extraído por eletroforese em gel de agarose 0,5%, a 70 V por 1 hora e 30 minutos (n=18). *Ladder*: padrão de tamanho molecular 1 kb (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). gDNA: DNA genômico.

5.2.5 Genotipagem dos polimorfismos por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

Os genótipos de cada participante estão descritos na Tabela 22 (Apêndice 4) e as frequências alélicas e genotípicas observadas estão apresentadas na Tabela 14. Os participantes foram agrupados de acordo com a ausência do alelo raro (GG para OCT2 e CC para OCTN1) e a presença de pelo menos um alelo raro (GT/TT para OCT2 e CT/TT para OCTN1). Nenhuma diferença na razão $Cp_{mín}$/DD foi observada ao comparar os grupos considerando o genótipo de OCT2 (P=0,9760) e OCTN1 (P=0,1839) separadamente (Figura 20A). A análise combinando os genótipos de OCT2 e OCTN1 também foi realizada, a fim de verificar se há alguma relação entre os polimorfismos. Não foi observada diferença na razão $Cp_{mín}$/DD entre os grupos que

não possuem alelo raro e os que possuem 1 ou 2 alelos raros (P=0,3356) (Figura 20B).

Tabela 14. Frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos *SLC22A2 c.808G>T* e *SLC22A4 c.1507C>T*.

SNP	Frequência genotípica	Frequência alélica	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P)
SLC22A2 c.808G>T	GG 0,88 GT 0,11 TT 0,00	G 0,94 T 0,06	1,0000
SLC22A4 c.1507C>T	CC 0,45 CT 0,44 TT 0,11	C 0,67 T 0,33	0,9257

Teste do Qui-quadrado representado pelo valor de P (P>0,05 significa que houve o equilíbrio de Hardy-Weinberg).

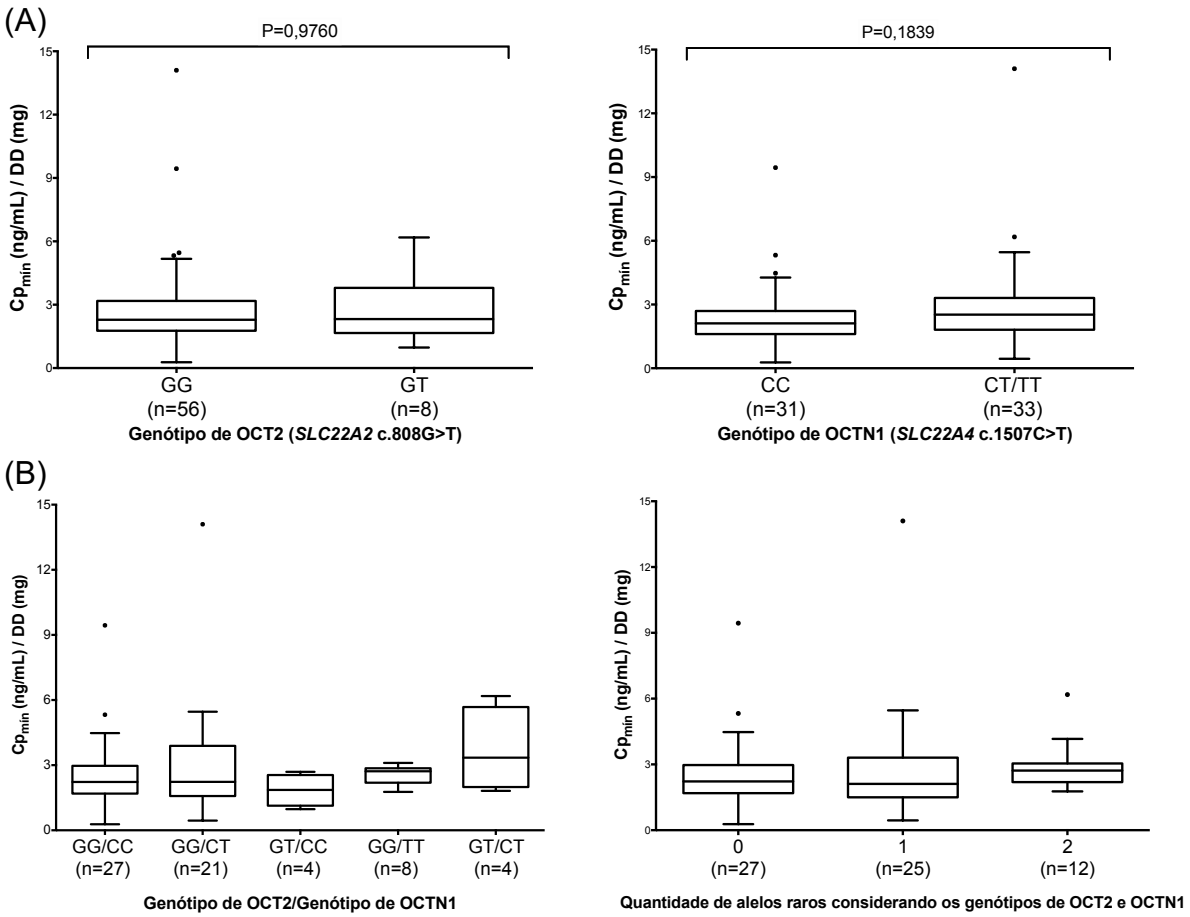


Figura 20. Efeito do genótipo de OCT2 e OCTN1 na razão entre a concentração plasmática mínima de GAB e a dose diária ($Cp_{mín}$/DD). (A) Análise dos genótipos individuais. (B) Análise das combinações dos genótipos. [GG: homozigoto selvagem para OCT2; CC: homozigoto selvagem para OCTN1; GT: heterozigoto para OCT2; CT: heterozigoto para OCTN1; TT: homozigoto raro para OCTN1].

5.2.6 Regressão linear múltipla da GAB

Primeiramente, foi simulado um modelo com todas as variáveis, mas apenas a eTFG e a dose diária apresentaram contribuição estatisticamente significativa (P<0,0001) (Modelo 1). A partir dessa informação, nova regressão múltipla foi realizada incluindo apenas essas duas covariáveis. Esse novo modelo consegue explicar 68% da variabilidade na concentração plasmática mínima estimada (Modelo 2) (Tabela 15). A equação da regressão linear múltipla que contém apenas as covariáveis dose diária e eTFG está descrita na Tabela 15. A correlação observada entre os valores de $Cp_{mín}$ preditas através da equação obtida e os valores observados experimentalmente apresentou distribuição dos resíduos padronizados próximo de zero satisfazendo as hipóteses de linearidade e homocedasticidade (Figura 21).

Tabela 15. Regressão linear múltipla para estimar a contribuição das variáveis na predição da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio, $Cp_{mín}$ (n=53). Valor de P<0,05 considerado estatisticamente significativo.

Modelo 1			**Modelo 2**		
Variável	**B**	**P**	**Variável**	**B**	**P**
Constante	7.863,868	0,001*	Constante	7.686,597	<0,0001*
OCT2	-216,073	0,752	eTFG	-71,126	<0,0001*
OCTN1	139,279	0,772	DD	1,637	<0,0001*
Sexo	331,402	0,522			
IMC	12,706	0,775			
Etilista	1.126,014	0,301			
Tabagista	-22,574	0,970			
eTFG	-66,616	<0,0001*			
τ	-561,93	0,275			
DD	1,792	<0,0001*			
Hipertensão	373,985	0,534			
Diabetes mellitus	-205,911	0,743			
Dislipidemia	429,252	0,478			
R^2	**0,714**		**R^2**	**0,676**	

B: coeficiente de regressão; IMC: índice de massa corporal (kg/m^2); eTFG: taxa de filtração glomerular estimada ($mL/min/1,73m^2$); DD: dose diária (mg); τ: intervalo de dose (h); R^2: coeficiente de determinação.
$Cp_{mín} = 7.686,597 - 71,126 \times eTFG + 1,637 \times DD$.

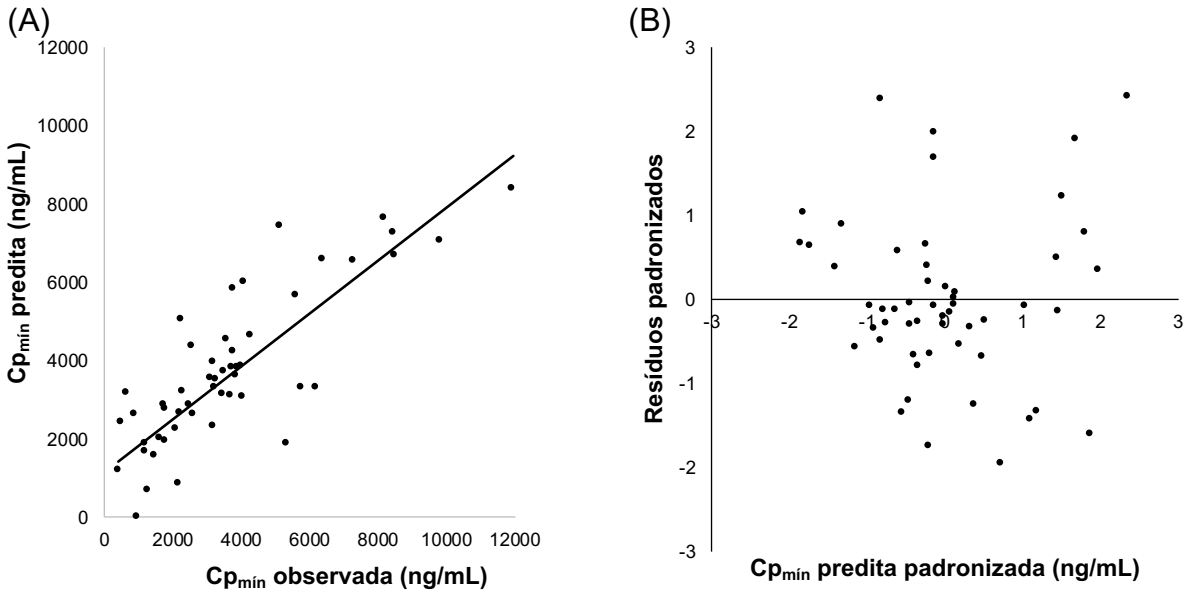


Figura 21. Predição da concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio ($Cp_{mín}$). (A) Relação entre a concentração plasmática mínima de gabapentina no estado de equilíbrio predita e observada. (B) Gráfico dos resíduos padronizados *vs*. a concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio predita padronizada.

5.2.7 Análise farmacocinética populacional

O modelo farmacocinético populacional foi obtido utilizando os dados observados de 53 participantes, os quais apresentavam quatro dados de concentração plasmática, resultando no total de 212 dados. Uma vez que todos os participantes foram investigados após alcançarem o estado de equilíbrio, assumiu-se que a concentração final do intervalo de dose foi igual a concentração plasmática mínima. Os participantes que não possuíam o valor de creatinina sérica disponíveis no prontuário (n=11) foram excluídos da análise populacional. Também foram excluídos os participantes com níveis não quantificáveis de GAB no vale, uma vez que essa observação demonstra não aderência ao tratamento (n=2).

O modelo estrutural de 1 compartimento foi escolhido com base nos estudos de farmacocinética populacional disponíveis na literatura (Carlsson et al., 2009; Ahmed et al., 2017, Tran et al., 2017) e após a análise visual do gráfico de concentração plasmática pelo tempo obtido com os dados observados, o qual indica que há apenas um decaimento da concentração plasmática após a absorção (Figura 22).

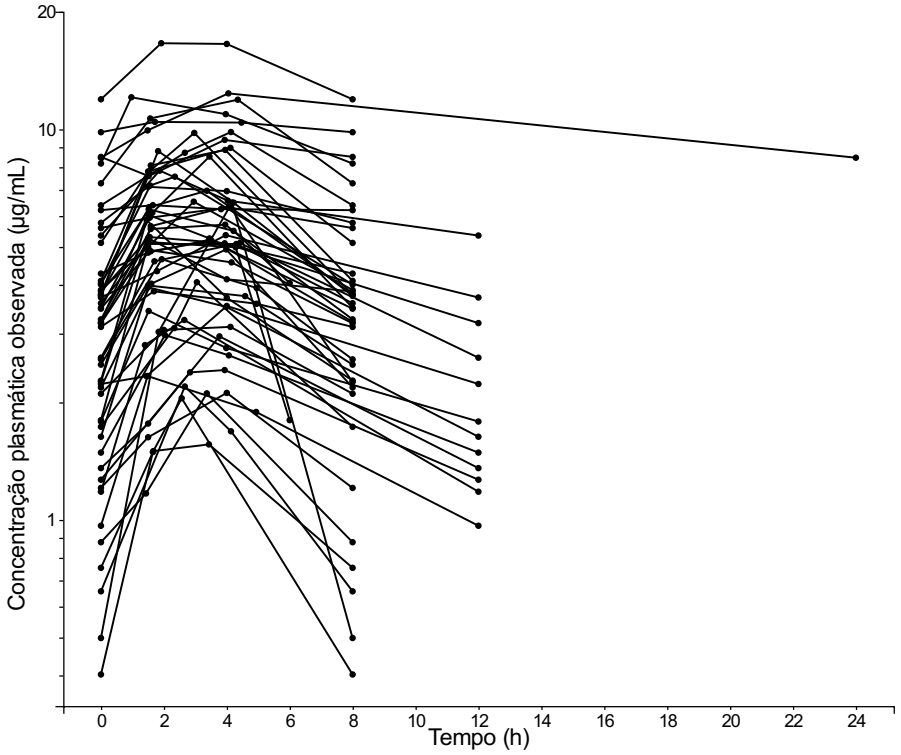


Figura 22. Gráfico de concentração plasmática pelo tempo dos dados observados (n=53).

O modelo de erro residual proporcional foi o que apresentou menores valores de AIC e -2LL, e foi utilizado como modelo base por apresentar maior verossimilhança (Tabela 16).

Tabela 16. Verossimilhança e critérios de informação de Akaike

	Aditivo	Proporcional
Verossimilhança (*-2xlog-likelihood, -2LL*)	645,85	611,92
Critérios de informação de Akaike (AIC)	659,85	625,92

A partir dos resultados dos testes de correlação (Tabela 17) e da análise visual dos gráficos de efeitos aleatórios dos parâmetros (η) *versus* covariáveis do modelo base (Figura 23), as covariáveis foram selecionadas para serem adicionadas ao modelo. A covariável eTFG ao ser transformada em potencial e normalizada pela média apresentou melhor resposta do que quando adicionada na sua forma linear (Tabela 18). Os resultados de -2LL e AIC após a adição de cada variável separadamente estão representados na Tabela 18. A análise com multicovariáveis foi

realizada incluindo apenas a eTFG potencial no clearance e o sexo no volume de distribuição e na constante de absorção, pois foram as únicas associações que resultaram em redução significativa de -2LL e/ou AIC.

Tabela 17. Correlação de Pearson e/ou ANOVA entre os efeitos aleatórios (η) e as covariáveis

	η_{ka}		η_{V}		η_{Cl}	
	r	*Valor de P*	*r*	*Valor de P*	*r*	*Valor de P*
Idade	-0,0586	0,8920	0,0547	0,9709	-0,3874	**0,0066***
IMC	0,0288	0,7143	-0,0281	0,5195	-0,1610	0,3237
Peso corporal	-0,0827	0,2949	0,0494	0,6064	-0,1490	0,3670
eTFG	0,0066	0,7524	0,0047	0,9767	0,6872	**<0,0001***
Log(eTFG/média)	0,0287	0,9173	-0,0260	0,9928	0,7229	**<0,0001***
Sexo		0,0952		0,3191		0,7303
Genótipo OCN1		0,9645		0,6727		0,4599
Genótipo OCT2		0,9682		0,7259		0,8808

η: efeitos aleatórios; r: coeficiente de correlação de Pearson; ka: constante de absorção; V: volume de distribuição (L); Cl: clearance; IMC: índice de massa corporal (kg/m^2); eTFG: taxa de filtração glomerular estimada (mL/min/1,73 m^2); OCT2: transportador de cátions orgânicos 2; OCTN1: transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1. *P<0,05.

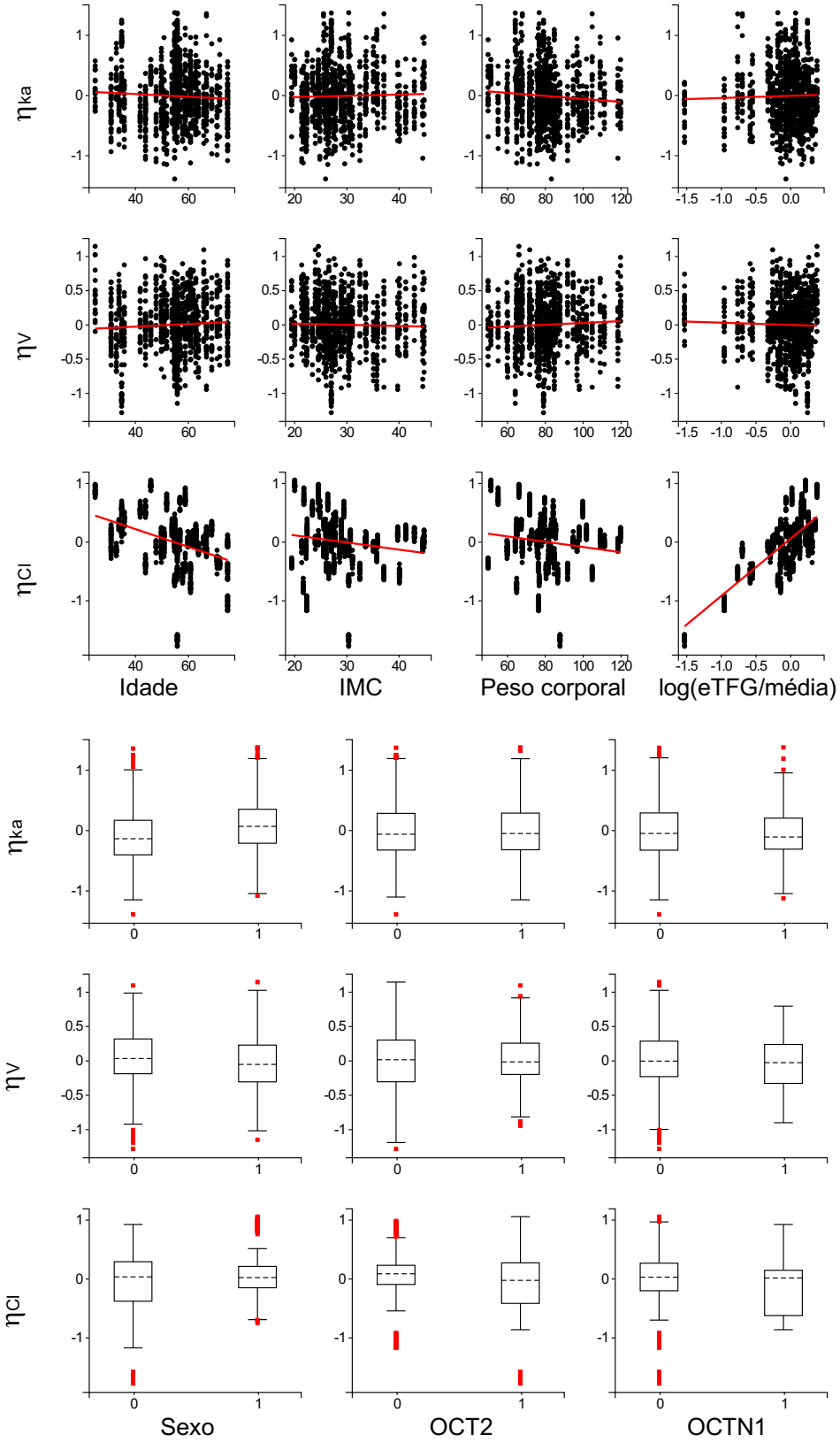


Figura 23. Gráficos de correlação entre o efeito aleatório dos parâmetros farmacocinéticos (η) e as covariáveis investigadas. [idade; peso corporal (kg); IMC: índice de massa corporal (kg/m^2); eTFG: taxa de filtração glomerular estimada (mL/min/1,73 m^2); OCT2: transportador de cátions orgânicos 2; OCTN1: transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1; ka: constante de absorção; V: volume de distribuição (L); Cl: clearance].

Tabela 18. Verossimilhança e critérios de informação de Akaike após adição de uma covariável

Covariável	-2LL	Diferença de -2LL	AIC	Diferença de AIC	Incluído na análise multivariada
Modelo base	611,92		625,92		
idade no Cl	603,34	**-8,58**	619,34	**-6,58**	Sim
eTFG no Cl	574,07	-37,85	590,07	-35,85	Não
log(eTFG/média) no Cl	568,18	**-43,74**	584,18	**-41,74**	Sim
sexo no V	606,70	**-5,22**	622,70	**-3,22**	Sim
sexo na ka	607,21	**-4,71**	623,21	**-2,71**	Sim
genótipo OCT2 no Cl	609,91	-17,99	625,91	-0,01	Não
genótipo OCTN1 no Cl	610,29	-1,63	626,29	+0,37	Não

-2LL: -2×*log-likelihood*; AIC: critérios de informação de Akaike; eTFG: taxa de filtração glomerular estimada (mL/min/1,73 m^2); Cl: clearance: ka: constante de absorção; V: volume de distribuição (L); OCT2: transportador de cátions orgânicos 2; OCTN1: transportador de cátions orgânicos/ergotioneína 1.

Os dados clínicos observados foram melhor representados pelo modelo de erro residual proporcional, no qual o logaritmo da taxa de filtração glomerular estimada normalizada pela média está associado ao clearance (Cl) de gabapentina. Os parâmetros estimados do modelo final estão representados na Tabela 19.

Tabela 19. Equações do modelo populacional e parâmetros estimados

Parâmetro	Valor estimado	EPR (%)
ka (h^{-1})	0,44	14,5
V (L)	86,0	13,3
Cl (L/h)	12,5	4,67
Efeito do log(eTFG/89,58) no Cl	1,04	12,8
Variabilidade interindividual (VII)[a]	*Valor estimado*	*CV (%)*
VII do ka	0,323	61,7[a]
VII do V	0,546	85,2[a]
VII do Cl	0,325	62,0[a]
Erro residual[b]		
Proporcional	0,133	36,5[b]
Equação		
$\boldsymbol{Cl\ (L/h) = 17,3 \times (\frac{eTFG\ mL/min/1,73m^2}{89,58\ mL/min/1,73m^2})^{1,04}}$		

ka: constante de absorção; V: volume de distribuição; Cl: clearance; VII: variabilidade interindividual; EPR: erro padrão relativo [EPR= (erro padrão/valor estimado)x100]; CV: coeficiente de variação.

[a]Calculado pela equação CV= $\boldsymbol{100 \times \sqrt{\exp(VII) - 1}}$

[b]Calculado pela equação CV=$\boldsymbol{100 \times \sqrt{\text{erro residual}}}$

As concentrações plasmáticas observadas apresentaram boa correlação com as concentrações plasmáticas populacionais e individuais preditas com o modelo final (Figura 24). Os resíduos populacionais e individuais ponderados (PWRES e IWRES,

respectivamente) e os erros preditos normalizados (NPDE) apresentaram distribuição normal e simétrica próxima a zero quando relacionados com os valores de concentração plasmática populacional predita e com o tempo (Figura 25). Os efeitos aleatórios dos parâmetros farmacocinéticos (η) também apresentaram distribuição normal (Figura 26). No gráfico de verificação dos dados preditos (VPC) observa-se que os percentis 5, 50 e 95 dos dados observados foram próximos aos percentis dos dados simulados, e além disso, poucos *outliers* foram observados (Figura 27).

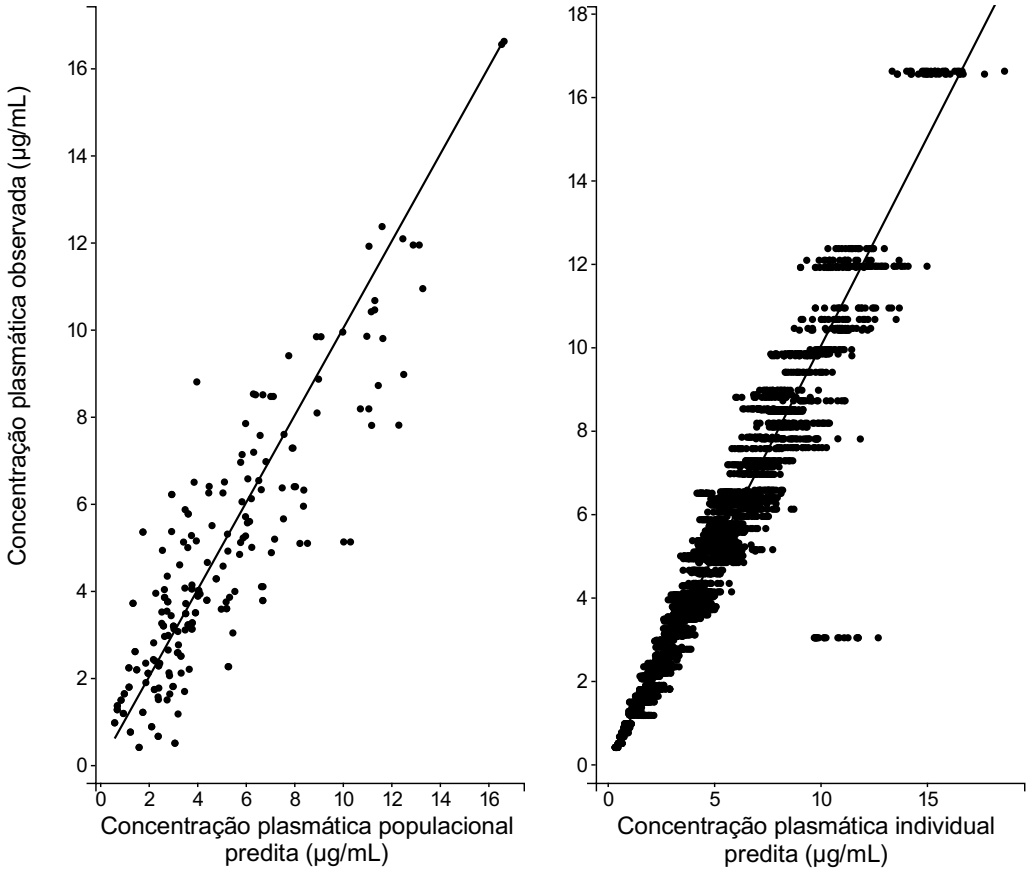


Figura 24. Correlação entre concentração plasmática observada e concentração plasmática populacional (A) e individual predita (B).

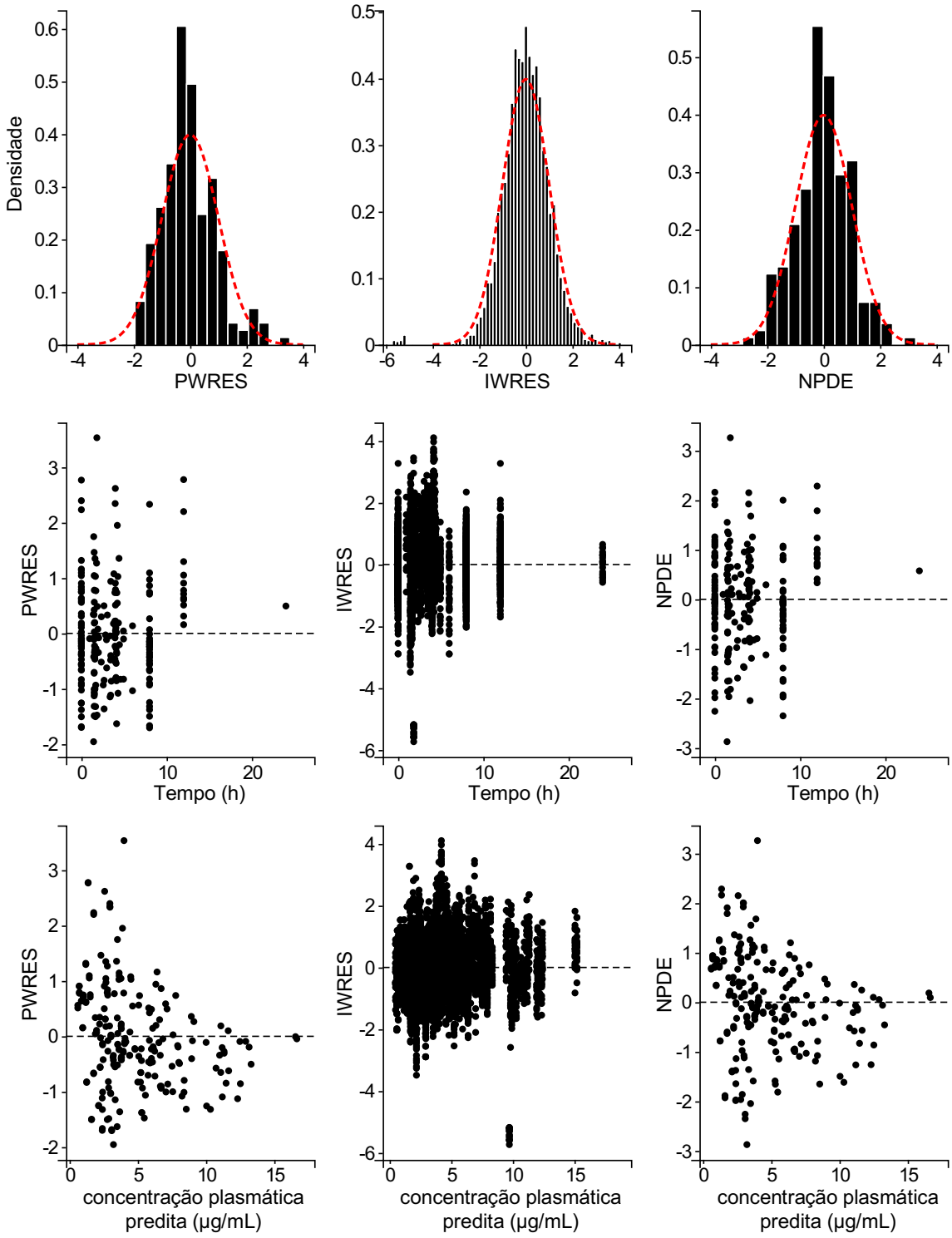


Figura 25. Distribuição dos resíduos. (A) Representação da distribuição normal dos resíduos. A linha vermelha representa a distribuição teórica definida no modelo desenvolvido e as barras a distribuição dos dados observados (B) Distribuição homogênea dos resíduos em relação ao tempo (C) Distribuição homogênea dos resíduos em relação a concentração plasmática predita. [PWRES: resíduos populacionais ponderados; IWRES: resíduos individuais ponderados; NPDE: erros preditos normalizados].

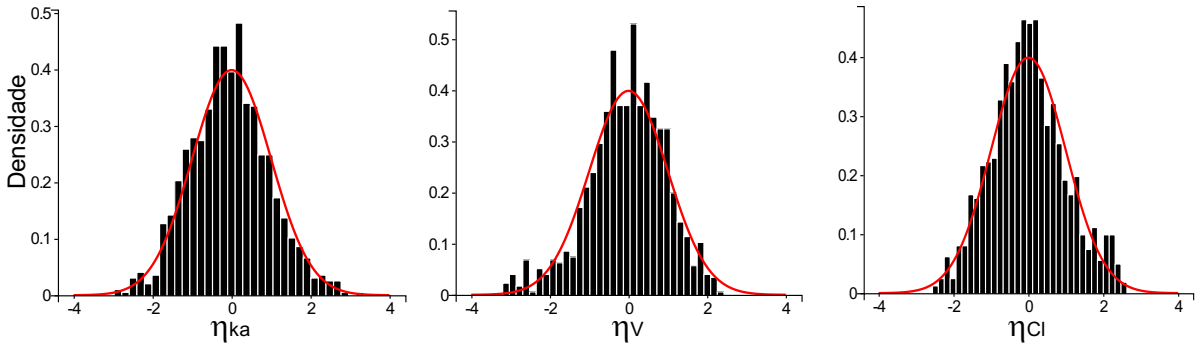


Figura 26. Distribuição dos efeitos aleatórios (η). [ka: constante de absorção; V: volume de distribuição; Cl: clearance].

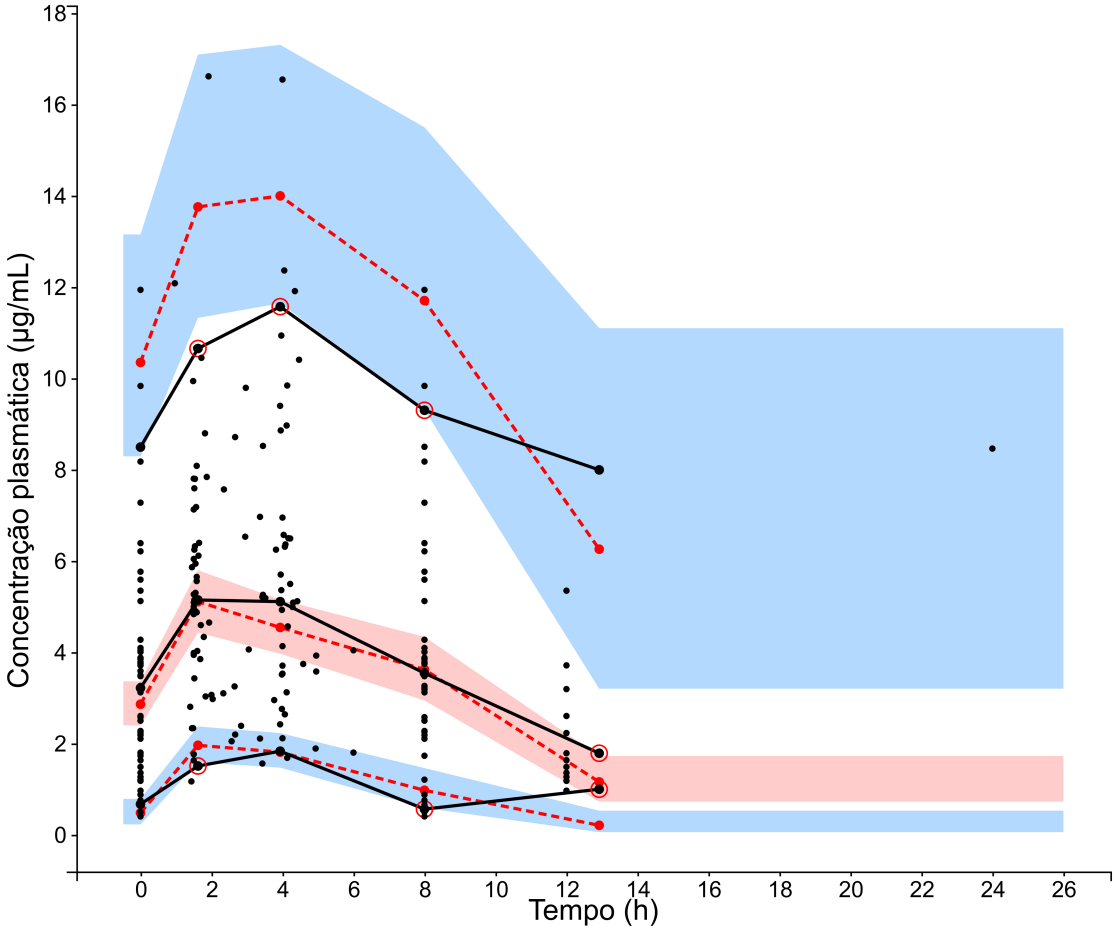


Figura 27. Gráfico de verificação dos valores preditos (VPC, *visual predictive check*). As linhas sólidas representam os percentis 5, 50 e 95 dos dados observados. As linhas pontilhadas vermelhas representam os percentis 5, 50 e 95 dos dados simulados. As áreas indicam o intervalo de 90% preditos associados aos percentis 5, 50 e 95 dos dados simulados. Os círculos pretos correspondem aos dados observados enquanto os círculos vermelhos aos *outliers*.

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise da GAB em plasma e urina por CLAE-UV

O estudo da disposição cinética da GAB em pacientes com dor neuropática exigiu o desenvolvimento de métodos de análise do fármaco em plasma e urina. Considerando que a GAB é um fármaco de eliminação renal, a determinação da quantidade eliminada na urina juntamente com os dados de Cl_{CR} podem colaborar na investigação da influência dos transportadores (OCT2 e OCTN1) na eliminação da GAB.

O método de determinação da GAB em plasma por cromatografia líquida acoplado a detector de ultravioleta (CLAE-UV) foi padronizado após pequenas modificações no método publicado por Jalalizadeh et al. (2007) a fim de reduzir volume de amostra de plasma (100 µL) e manter um protocolo de preparo de amostra simples. No presente estudo também foi desenvolvido método para determinação de GAB em urina, o qual utiliza um pequeno volume de amostra (50 µL) e o 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) como agente derivatizante. Tendo em vista que a GAB não possui grupo cromóforo em sua estrutura é necessário realizar uma reação de derivatização para que possa ser detectada por ultravioleta. A reação de derivatização da GAB com o FDNB está representada na Figura 28.

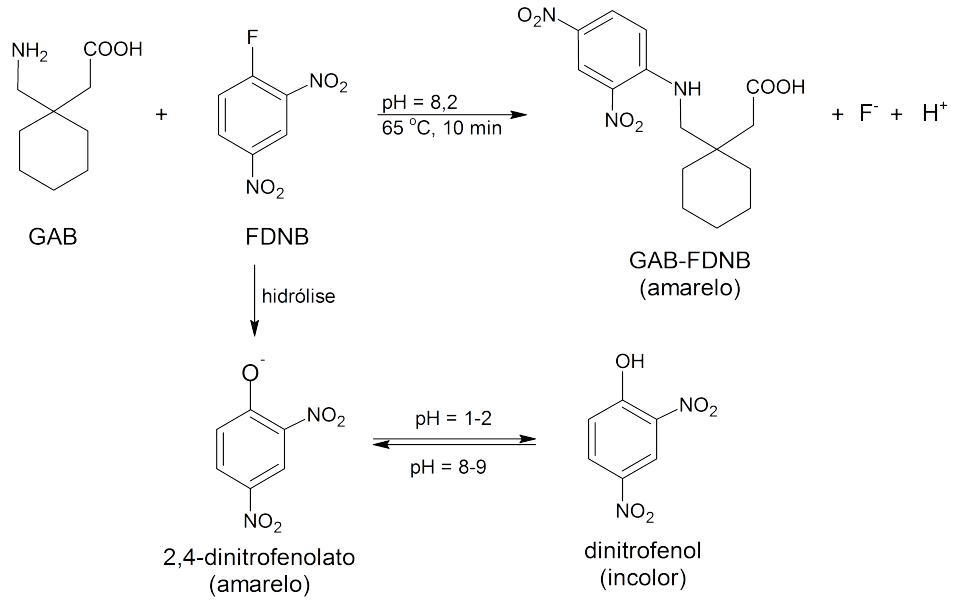


Figura 28. Reação de derivatização da GAB com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB). Fonte: adaptado de Paraskevas; Atta-Polito; Koupparis, 2002; Ebrahimzadeh et al., 2010.

O preparo das amostras de urina incluiu a extração líquido-líquido com a mistura de solventes diclorometano:1-butanol (1:1, v/v) com a finalidade de eliminar componentes interferentes da matriz biológica. O método desenvolvido neste trabalho, além de utilizar um pequeno volume de amostra, possui linearidade para ampla faixa de concentrações de GAB na urina, definida assim devido às altas doses utilizadas pelos participantes.

Os métodos desenvolvidos apresentaram linearidade, precisão, exatidão e estabilidade compatíveis com a sua aplicação para determinação da concentração de GAB no plasma e na urina obedecendo os critérios de validação de métodos bioanalíticos da ANVISA (RDC Nº 27, Brasil, 2012b). A seletividade foi constatada uma vez que não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção do LIQ e do PI nas amostras de plasma e urina humano (Figura 10). O efeito residual foi considerado ausente, visto que nenhum pico interferente, no mesmo tempo de retenção, com resposta superior a 20% e 5% da resposta da GAB e PI, respectivamente, foi detectado nas duas amostras branco injetadas após a injeção de

duas amostras de LSQ (14.000 ng/mL de plasma) (Figura 11). Quase todos os métodos analíticos presentes na literatura não verificaram o efeito residual ou não apresentaram seus dados (Jalalizadeh et al., 2007; Park et al., 2007; Gujral; Haque, 2009; Oertel et al., 2009; Wattananat; Akarawut, 2009; Ebrahimzadeh et al., 2010; Mercolini et al., 2010; Yagi et al., 2012b; Ikeda et al., 2014; Martinc et al., 2014).

Para obtenção de linearidade nos intervalos de 200 a 14.000 ng/mL de plasma e 2 a 120 µg/mL de urina foi necessário utilizar a ponderação $1/x^2$, devido a não homocedasticidade dos dados (Tabela 6, Figura 12). Diversos modelos de ponderação foram avaliados, porém a ponderação $1/x^2$ apresentou menor valor da somatória dos erros relativos e distribuição das variâncias em torno do eixo x mais homogênea (Tabela 7, Figura 13).

As faixas de concentração foram estabelecidas, após a revisão dos estudos clínicos disponíveis na literatura, com base nas concentrações plasmáticas e na quantidade total de GAB excretada na urina observadas após a administração oral diária de 300 a 4.800 mg de GAB, em doses variáveis (item 2.1.3). No entanto, essas faixas de concentração não foram amplas o suficiente para quantificar todas as amostras de plasma e urina, uma vez que algumas amostras apresentaram concentrações de GAB superiores ao LSQ. Com o intuito de avaliar a precisão e a exatidão inerentes ao processo de diluição das amostras seguido do seu preparo e análise cromatográfica, controles de qualidade de diluição (CQD) de plasma e urina foram preparados a partir de amostras branco enriquecidas com GAB para obter as concentrações finais de 20.000 ng/mL de plasma e 300 µg/mL de urina. As amostras de CQD de plasma e urina foram diluídas 5 e 10 vezes, respectivamente, em seguida foram processadas e analisadas. Todos os controles de qualidade (LIQ, CQB, CQM,

CQA e CQD) apresentaram precisão e exatidão dentro do estabelecido pelas recomendações da ANVISA (RDC nº 27, Brasil, 2012b; item 4.1.5.5; Tabela 8).

Muitos métodos bioanalíticos avaliam a recuperação dos analitos após o processo de extração. No entanto, esse parâmetro não é mais um critério de validação de métodos bioanalíticos segundo a ANVISA (RDC nº 27, Brasil, 2012b) e o guia de validação europeu, *European Medicines Agency* (EMA, 2011). O guia de validação de métodos bioanalíticos americano ("*Guidance for Industry: bioanalytical method validation*" do *Food and Drug Administration* – FDA) ainda mantém esse parâmetro, porém o valor da recuperação não necessita ser próximo ou igual a 100%, desde que seja preciso, consistente e reprodutível (FDA, 2001). A recuperação absoluta da GAB nos métodos desenvolvidos não pode ser determinada, uma vez que não há o padrão analítico do produto da derivatização para ser comparado com o produto derivatizado extraído (Peters; Maurer, 2002).

6.2 Farmacocinética clínica da GAB

A GAB é um anticonvulsivante de segunda geração cuja indicação para monitorização terapêutica (MT) é controversa (Neels et al., 2004; Krasowski, 2010; Brandt; May, 2011; Krasowski; McMillin, 2014; Landmark et al., 2015). Alguns autores não indicam a MT da GAB, pois seu uso em doses terapêuticas não está relacionado a eventos adversos graves. O estudo clínico, controlado por placebo, realizado em pacientes com dor neuropática tratados com doses de até 2.400 mg/dia de GAB observou que os eventos adversos mais frequentes nos pacientes tratados com GAB (n=153) foram tontura e sonolência (24,2% e 14,4%, respectivamente). Esses efeitos adversos também foram observados nos pacientes do grupo placebo, porém em frequências menores (7,9 e 5,3%, respectivamente) (Serpell et al., 2002).

Ademais, o intervalo de referência da GAB não está bem estabelecido na literatura. Alguns estudos sugerem o intervalo de 2-20 µg/mL (10-120 µmol/L) de GAB em plasma (Patsalos et al., 2008), outros consideram uma concentração mínima maior (12-20 µg/mL ou 70-120 µmol/L) (Johannessen et al., 2003). No entanto, os intervalos propostos foram baseados em estudos realizados em pacientes com epilepsia. Neste estudo, dos 64 participantes analisados 28,1% (n=18) apresentaram concentração plasmática inferior ao intervalo de 2-20 µg/mL proposto para pacientes com epilepsia (Figura 15). Uma vez que nenhum dos participantes com dor neuropática apresentavam indicação da GAB para epilepsia, e considerando que a patofisiologia da dor não se relaciona com a da epilepsia, o intervalo de referência descrito na literatura não deve ser aplicado a pacientes com dor neuropática.

A monitorização terapêutica é indicada para verificação da adesão ao tratamento e quando a eficácia da terapia é dificilmente estabelecida clinicamente (Patsalos et al., 2008; André et al., 2015). Durante o recrutamento, alguns participantes relataram não fazer o uso correto da dose prescrita devido a eventos adversos (mesmo não sendo graves), a ineficácia (sem melhoras no alívio da dor) e a elevada quantidade de medicamentos em uso.

Uma das limitações do estudo é a autodeclaração de aderência ao tratamento, porém durante a aplicação do TCLE os participantes foram questionados em relação ao uso e a dose diária de GAB, e todos confirmaram o uso contínuo de GAB e a dose administrada. No entanto, ao ser determinada a concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio (concentração no vale), a GAB não foi detectada nas amostras de plasma de dois participantes. Os participantes foram convidados novamente para o protocolo clínico, porém nas novas amostras também não foi detectada a GAB no plasma. Assim sendo, a não adesão ao tratamento ou o uso

incorreto pode levar ao diagnóstico errôneo de falha terapêutica da GAB, por isso é relevante realizar a MT da GAB, principalmente em pacientes que não apresentaram melhoras do quadro clínico e/ou fazem uso de altas doses do medicamento.

Por ser um fármaco eliminado por via renal, a GAB foi avaliada em amostras de urina coletadas no intervalo de doses. Carlsson et al. (2009) correlacionou a quantidade de GAB eliminada inalterada na urina (Ae) e a ASC^{0-24} em pacientes (n=7) com dor neuropática crônica, e observou uma boa relação entre as variáveis (R^2=0,62) (Carlsson et al., 2009). Os resultados obtidos apresentaram alta variabilidade interindividual na quantidade de GAB excretada na urina (12,7%-117,0%) (Tabela 13). Tendo em vista que a GAB não é metabolizada em humanos e sua eliminação é essencialmente renal, a alta variabilidade na Ae observada pode ser explicada pelo menos parcialmente pela variabilidade na biodisponibilidade oral da GAB (29-60%).

A extensa variabilidade farmacocinética interindividual da GAB é um dos fatores que justificam a monitorização terapêutica. Essa variabilidade pode ser explicada pela biodisponibilidade oral dose-dependente, pela influência da idade/taxa de filtração glomerular ou a atividade de transportadores na disposição cinética (Stewart et al., 1993; Gidal et al., 1998; Boyd et al., 1999; Urban et al., 2008; Lal et al., 2010; Ahmed et al., 2017).

A influência de diferentes variáveis na cinética da GAB foi inicialmente analisada através do seu impacto na razão $Cp_{mín}$/DD. Homens e mulheres apresentaram razão $Cp_{mín}$/DD semelhante (P=0,4490), com medianas de 2,662 (ng/mL)/mg e 2,382 (ng/mL)/mg, respectivamente (Figura 17). Os dados do presente estudo corroboram os achados de Landmark et al. (2015), os quais também não observaram influência do sexo na razão Cp/DD (Landmark et al., 2015). Além disso, um estudo que avaliou

o efeito do sexo na farmacocinética da GAB, após dose única de 400 mg, não mostrou diferença na farmacocinética da GAB entre os sexos (Boyd et al., 1999).

Outras variáveis como, idade, peso corporal, IMC e eTFG também foram correlacionadas com a razão $Cp_{mín}$/DD (Figura 18). Apenas a idade e a eTFG apresentaram correlação estatisticamente significativa (P<0,0001 e P=0,0371, respectivamente). A correlação positiva entre a idade e a razão $Cp_{mín}$/DD é justificada pela correlação negativa observada entre a razão $Cp_{mín}$/DD e a eTFG, pois a partir dos 40 anos a eTFG diminui em média 1 mL/min/1,73 m^2 por ano (Lamb; O'Riordan; Delaney, 2003).

A distribuição dos genótipos de ambos polimorfismos estudados obedeceram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências obtidas dos alelos raros (T) dos SNPs *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T foram de 6% e 33%, respectivamente. A população brasileira é considerada miscigenada, dos 66 participantes avaliados no estudo 89,4% se autodeclararam brancos, 7,6% pretos e 3,0% pardos. Dados disponíveis na literatura da frequência alélica total ponderada para a região sudeste para o polimorfismo *SLC22A2* c.808G>T foi de 11,9%, sendo 10,7% em brancos. O polimorfismo *SLC22A4* c.1507C>T apresentou uma frequência alélica total de 32,9%, sendo 38,2% em brancos (Refargen, 2014; Bonifaz-Peña et al., 2014).

A influência desses polimorfismos na farmacocinética clínica de substratos de OCT2 e OCTN1 é pouco descrita na literatura. Estudos clínicos mostraram que a presença do polimorfismo *SLC22A2* c.808G>T alterou o transporte de metformina, reduzindo o clearance renal em pelo menos 25% (Song et al., 2008; Wang et al., 2008; Yoon et al., 2013). No entanto, outro estudo que avaliou o efeito de polimorfismos em diferentes transportadores (entre eles, *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T) no clearance renal da metformina, observou que apenas polimorfismos de OCT1

estava relacionado ao clearance renal da metformina (Tzvetkov et al., 2009). O estudo em pauta é o primeiro relato na literatura que investigou a influência do polimorfismo *SLC22A2* c.808G>T na disposição cinética da GAB. Entretanto, não foi observada influência do genótipo de OCT2 na razão $Cp_{mín}$/DD ou em outro parâmetro farmacocinético. Dados da literatura mostram que o polimorfismo *SLC22A4* c.1507C>T está relacionado a redução da secreção tubular ativa da GAB (Urban et al., 2008). No entanto, nenhuma diferença nos parâmetros farmacocinéticos ou da razão $Cp_{mín}$/DD da GAB foram observados neste estudo ao comparar os genótipos de OCTN1, sugerindo que a farmacogenética não explica a variabilidade na farmacocinética de GAB.

A estimativa da contribuição de cada variável na predição da concentração plasmática mínima de GAB no estado de equilíbrio ($Cp_{mín}$), foi realizada através da análise de regressão linear múltipla. Devido à falta do valor de creatinina sérica para todos participantes, e consequentemente à impossibilidade de estimar a TFG, o número de amostras (n) nesta análise foi de 53. Dentre todas as variáveis avaliadas as que apresentaram contribuição estatisticamente significativa foram a eTFG e a dose diária, as quais explicaram 67,6% da variabilidade na concentração plasmática mínima (concentração no vale) (Tabela 15).

Um modelo farmacocinético populacional foi desenvolvido para correlacionar as variáveis clínicas com os parâmetros farmacocinéticos (ka, Cl e V) estimados para essa população. Esta abordagem traz vantagens em relação a farmacocinética clássica, pois permite estimar ka, Cl e V usando amostragem esparsa. O modelo que melhor relacionou os dados observados com os valores estimados apresentou efeito estatisticamente significativo da taxa de filtração glomerular no clearance de GAB (Tabela 19). Achados similares a este foram relatados em estudos populacionais em

uma pequena população norueguesa, uma população de idosos e em indivíduos saudáveis (Carlsson et al., 2009; Ahmed et al., 2017; Tran et al., 2017; Glerum et al., 2018).

A constante de absorção (ka) observada em estudos anteriores variou de 0,26 a 0,86 h^{-1} (Carlsson et al., 2009 Ahmed et al., 2017; Tran et al., 2017; Glerum et al., 2018). Entretanto, um estudo populacional avaliou o impacto dos valores de ka (entre 0,2 e 1,6 h^{-1}) na verossimilhança do modelo e o valor de 0,44 h^{-1} foi o que apresentou menor valor de -2LL (Carlsson et al., 2009). O modelo final para a população em estudo apresentou um valor de ka de 0,44 h^{-1} corroborando com os dados observados para uma população norueguesa com dor crônica.

A GAB apresenta Vd variável. O valor estimado, neste trabalho, foi de 86,0 L, ou seja, próximo ao descrito na literatura para populações de indivíduos saudáveis (81,0-90,0 L) e para idosos (71,2 L) (Ahmed et al., 2017; Tran et al., 2017; Glerum et al., 2018).

O valor médio do Cl observado na população em estudo foi de 12,5 L/h semelhante ao valor obtido em coreanos do sexo masculino (11,1 L/h) (Tran et al., 2017). O Cl de GAB relatado para idosos com idade média de 79 anos é menor (2,93 L/h) quando comparado com a população em estudo, o que é esperado devido a redução da função renal com o avanço da idade (Ahmed et al., 2017). Outros trabalhos parametrizaram o processo de eliminação utilizando a constante de eliminação (ke), a qual foi calculada para os dados obtidos através da Equação 8.

$$\boldsymbol{k_e = \frac{Cl}{Vd} \rightarrow k_e = \frac{12{,}5\ L/h}{86\ L} \rightarrow k_e = 0{,}14\ h^{-1}} \quad (8)$$

O valor predito para a ke é próximo ao valor relatado na literatura (0,11 h^{-1}) (Carlsson et al., 2009). A concordância dos parâmetros estimados pela análise farmacocinética populacional com os dados da literatura demonstra que tal

abordagem é superior a análise farmacocinética clássica, em função do pequeno número de amostras coletadas por indivíduo.

Não foi observado efeito dos polimorfismos genéticos *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T no clearance da GAB. Assim sendo, estudos realizados em diferentes tipos de populações com indivíduos saudáveis ou em tratamento para dor crônica e/ou epilepsia, mostraram que a função renal (expressa através do Cl_{CR} ou TFG) é a única covariável que influência a eliminação da GAB.

Entre as limitações deste estudo, além da autodeclaração da aderência ao tratamento, o modelo farmacocinético populacional não considerou a absorção não-linear da GAB, devido a falta dos dados de biodisponibilidade. Além disso, outros polimorfismos genéticos não foram investigados (glicoproteína-P e LAT 1 e 2). Embora a atividade dos transportadores LAT1 e LAT2 tenha sido relacionada ao processo de absorção da GAB (Stewart et al., 1993; Nguyen; Smith; Fleisher, 2007; Del Amo; Urtti; Yliperttula, 2008), os genes desses transportadores são altamente conservados, principalmente na região codificadora e polimorfismos na região 5' flanqueadora não se correlacionam com alterações na expressão gênica (Kühne et al., 2007). Poucos estudos sobre a influência da glicoproteína-P (P-gp) na absorção da GAB estão disponíveis na literatura (Kang; Cho; Lee, 2007b; Tran et al., 2017). A P-gp é um transportador de efluxo codificado pelo gene *ABCB1* e expresso nos enterócitos. Os estudos sugerem que o polimorfismo 2677G>T/A do gene *ABCB1,* o qual altera a expressão e função do transportador, resulta em aumento da constante de absorção da GAB. Assim sendo, a presença do SNP reduz a expressão de P-gp nos enterócitos, e consequentemente reduz o transporte da GAB para o lúmen intestinal aumentando a quantidade absorvida (Tran et al., 2017).

Embora existam evidências de que a GAB seja substrato dos transportadores OCT2 e OCTN1, a atividade desses transportadores não apresenta impacto relevante na clínica. Isto indica que o processo de absorção e a filtração glomerular são os principais responsáveis pela variabilidade farmacocinética interindividual, uma vez que a GAB possui alta solubilidade, baixa permeabilidade, que transportadores participam do processo de absorção por via oral, o qual pode ser influenciado pela composição da alimentação, e que apenas a taxa de filtração glomerular estimada mostrou influenciar na sua eliminação. Em resumo, a farmacocinética clínica da gabapentina é fortemente influenciada pela função renal e pela saturação dos processos de absorção e não por polimorfismos genéticos em *SLC22A2* e *SLC22A4*.

7 CONCLUSÕES

1. Os métodos de análise da GAB em plasma e urina foram desenvolvidos e validados em CLAE-UV após derivação com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB). Os métodos foram validados para as faixas de concentração de 200 a 14.000 ng/mL para o plasma e de 2 a 120 µg/mL para a urina, com limites de quantificação de 200 ng/mL e 2 µg/mL, respectivamente. A precisão, a exatidão e a estabilidade dos métodos foram compatíveis com a determinação da GAB em pacientes tratados com doses múltiplas.

2. A taxa de filtração glomerular estimada e a dose diária foram identificadas como covariáveis da concentração plasmática mínima no estado de equilíbrio ($Cp_{mín}$), sendo que juntos estes fatores explicam 68% da variabilidade nas concentrações. Não houve correlação entre peso corporal, IMC, sexo ou genótipo de *SLC22A2* c.808G>T e *SLC22A4* c.1507C>T com a razão $Cp_{mín}$/DD da GAB para os participantes investigados.

3. A análise farmacocinética populacional mostrou que embora tenha sido avaliada uma pequena quantidade de dados (n=212), os parâmetros farmacocinéticos estimados foram próximos aos descritos na literatura. Portanto, a amostragem esparsa realizada mostrou-se eficaz para a análise populacional. Além disso, a função renal foi a única covariável que mostrou influenciar no processo de eliminação e a farmacogenética de OCT2 e OCTN1 não altera a farmacocinética da GAB.

REFERÊNCIAS

1. Ahmed GF, Bathena SP, Brundage RC, Leppik IE, Conway JM, Schwartz JB, et al. Pharmacokinetics and saturable absorption of gabapentin in nursing home elderly patients. AAPS J. 2017 mar; 19 (2): 551-556.

2. Almeida AM, Castelo-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002 jul; 774 (2): 215-22.

3. André P, Navy J, Decosterd LA, Buclin T, Rothuizen LE. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in the 21st century. Epileptologie 2015; 32: 78-84.

4. Armijo JA, Pena MA, Adin J, Vega-Gil N. Association between patient age and gabapentin serum concentration-to-dose ratio: a preliminary multivariate analysis. Ther Drug Monit. 2004 dez; 26 (6): 633-7.

5. Asconapé JJ. Use of antiepileptic drugs in hepatic and renal disease. Handb Clin Neurol. 2014; 119: 417-32.

6. Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. Eur J Neurol. 2010 nov; 13 (10): 1153-69.

7. Backonja M, Beydoun A, Edwards KR, Schwartz SL, Fonseca V, Hes M, et al. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. JAMA. 1998 dez; 280 (21): 1831-6.

8. Backonja MM, Canafax DM, Cundy KC. Efficacy of gabapentin enacarbil vs placebo in patients with postherpetic neuralgia and a pharmacokinetic comparison with oral gabapentin. Pain Med. 2011 jul; 12 (7): 1098-108.

9. Benarroch EE. Blood-brain barrier: recent developments and clinical correlations. Neurology 2012 abr; 78 (16): 1268-76.

10. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs. AAPS J. 2011 dez; 13 (4): 519-47.

11. Bennett DLH. Informed drug choices for neuropathic pain. Lancet Neurol. 2015 fev; 14 (2): 129-30.

12. Blum RA, Comstock TJ, Sica DA, Schultz RW, Keller E, Reetze P, et al. Pharmacokinetics of gabapentin in subjects with various degrees of renal function. Clin Pharmacol Ther. 1994 ago; 56 (2): 154-9.

13. Bockbrader HN, Breslin EM, Underwood BA, Posvar EL, Sedman AJ. Multiple-dose, dose-proportionality study of Neurontin® (gabapentin) in healthy volunteers. Epilepsia 1996; 37 Suppl. 5: 1-214.

14. Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. Clin Pharmacokinet. 2010 out; 49 (10): 661-9.

15. Bockbrader HN. Clinical Pharmacokinetics of Gabapentin. Drugs Today 1995; 31 (8): 613-619.

16. Bonifaz-Peña V; Contreras AV, Struchiner CJ, Roela RA, Furuya-Mazzotti TK, Chammas R, et al. Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. PLoS One 2014 nov; 9 (11): e112640.

17. Boyd RA, Turck D, Abel RB, Sedman AJ, Bockbrader HN. Effects of age and gender on single-dose pharmacokinetics of gabapentin. Epilepsia 1999 abr; 40 (4): 474-9.

18. Brandt C, May TW. Therapeutic drug monitoring of newer antiepileptic drugs. J Lab Med. 2011 jun; 35 (3): 161-169.

19. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012**.** Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, maio 2012b; Seção 1, p. 93-94.

20. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 6, de 18 de fevereiro de 2014. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. Diário Oficial da União fev 2014; Seção 1, p. 68-73.

21. Brasil. Ministério da Saúde - Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria Nº 1803, de 02 de outubro de 2012. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica. Diário Oficial da União out 2012a; Seção 1, p. 54-58.

22. Butt DA, Lock M, Lewis JE, Ross S, Moineddin R. Gabapentin for the treatment of menopausal hot flashes: a randomized controlled trial. Menopause. 2008 mar-abr; 15 (2): 310-8.

23. Carlsson KC, Schootbrugge M, Eriksen HO, Moberg ER, Karlsson MO, Hoem NO. A population pharmacokinetic model of gabapentin developed in nonparametric adaptive grid and nonlinear mixed effects modeling. Ther Drug Monit. 2009 fev; 31 (1): 86-94.

24. Chahbouni A, Sinjewel A, Den Burger JC, Vos RM, Wilhelm AJ, Veldkamp AI, et al. Rapid quantification of gabapentin, pregabalin, and vigabatrin in human serum by ultraperformance liquid chromatography with mass-spectrometric detection. Ther Drug Monit. 2013 fev; 35 (1): 48-53.

25. Chen C, Cowles VE, Sweeney M. The intestinal absorption mechanism of gabapentin makes it appropriate for gastroretentive delivery. Curr Clin Pharmacol. 2013 fev; 8 (1): 67-72.

26. Choi MK, Song IS. Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. Drug Metab Pharmacokinet. 2008; 23 (4): 243-53.

27. Clivatti J, Sakata RK, Issy AM. Review of the use of Gabapentin in the Control of Postoperative Pain. Rev Bras Anestesiol. 2009 jan-fev; 59 (1): 87-98.

28. Cobin RH, Goodman NF. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Position Statement on Menopause-2017 Update. Endocr Pract. 2017 jul; 23 (7): 869-880.

29. Da Silva CP, Emídio ES, De Marchi MRR. Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples. Talanta 2015 jan; 131: 221-227.

30. De Siqueira JTT. Porque a Dor é uma questão também de Saúde Pública! [Internet]. Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED); [acesso em 24 fev 2017]. A Dor crônica no Brasil - o que nos dizem os estudos que temos. Disponível em: http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=74.

31. De Souza JB, Grossmann E, Perissinotti DMN, de Oliveira Junior JO, da Fonseca PRB, Posso IP. Prevalence of chronic pain, treatments, perception, and interference on life activities: Brazilian population-based survey. Pain Res Manag. 2017 set; 2017: 4643830.

32. Deeb S, McKeown DA, Torrance HJ, Wylie FM, Logan BK, Scott KS. Simultaneous analysis of 22 antiepileptic drugs in post-mortem blood, serum and plasma using LC-MS-MS with a focus on their role in forensic cases. J Anal Toxicol. 2014 out; 38 (8): 485-94.

33. Del Amo EM, Urtti A, Yliperttula M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. Eur J Pharm Sci. 2008 out; 35 (3): 161-74.

34. Dickens D, Webb SD, Antonyuk S, Giannoudis A, Owen A, Radisch S, et al. Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). Biochem Pharmacol. 2013 jun; 85 (11): 1672-83.

35. Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM. Transporters involved in the elimination of drug in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. J Pharm Sci. 2001 abr; 90 (4): 397-421.

36. Dupont WD, Plummer WD Jr. PS power and sample size program available for free on the internet. Control Clin Trials. 1997; 18 (3): 274.

37. Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Firozjaei HA, Kamarei F, Tavassoli N, Rouini MR. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of gabapentin in biological samples. Anal Chim Acta. 2010 abr; 665 (2): 221-6.

38. EMA. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Bioanalytical Method Validation. Londres: European Medicines Agency, jul 2011 [acesso em 04 jul 2017]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

39. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, et al. Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. Cell. 2009 out; 139 (2): 380-92.

40. FDA. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: bioanalytical method validation, maio 2001 [acesso em 04 jul 2017]. Disponível em: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf.

41. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. Lancet Neurol. 2015 fev; 14 (2): 162-173.

42. Fujita T, Urban TJ, Leabman MK, Fujita K, Giacomini KM. Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. J Pharm Sci. 2006 jan; 95 (1): 25-36.

43. Fukushima-Uesaka H, Maekawa K, Ozawa S, Komamura K, Ueno K, Shibakawa M, et al. Fourteen novel single nucleotide polymorphisms in the SLC22A2 gene encoding human organic cation transporter (OCT2). Drug Metab Pharmacokinet. 2004 jun; 19 (3): 239-44.

44. Furugen A, Ishiguro Y, Kobayashi M, Narumi K, Nishimura A, Hirano T, et al. Involvement of L-type amino acid transporter 1 in the transport of gabapentin into human placental choriocarcinoma cells. Reprod Toxicol. 2017 jan; 67: 48-55.

45. Futatsugi A, Masuo Y, Kawabata S, Nakamichi N, Kato Y. L503F variant of carnitine/organic cation transporter 1 efficiently transports metformin and other biguanides. J Pharm Pharmacol. 2016 set; 68 (9): 1160-9.

46. Galitz LA, Jayawardena S, Furey SA. Pharmacokinetic effects of simultaneous administration of single-dose gabapentin 500 mg and zolpidem tartrate 10 mg in healthy volunteers: a randomized, open-label, crossover trial. Drugs R D. 2015 mar; 15 (1): 71-7.

47. Garcia-Borreguero D, Larrosa O, de la Llave Y, Verger K, Masramon X, Hernandez G. Treatment of restless legs syndrome with gabapentin: a double-blind, cross-over study. Neurology. 2002 nov; 59 (10): 1573-9.

48. Giacomini KM, Huang SM. Transporters in drug development and clinical pharmacology. Clin Pharmacol Ther. 2013 jul; 94 (1): 3-9.

49. Gidal BE, Decerce J, Bockbrader HN, Gonzalez J, Kruger S, Pitterle ME, et al. Gabapentin bioavailability: effect of dose and frequency of administration in adult patients with epilepsy. Epilepsy Res.1998 jul; 31 (2): 91-9.

50. Gidal BE, Maly MM, Budde J, Lensmeyer GL, Pitterle ME, Jones JC. Effect of a high-protein meal on gabapentin pharmacokinetics. Epilepsy Res. 1996 fev; 23 (1): 71-6.

51. Glerum PJ, Yu Y, Yamada WM, Neely MN, Maliepaard M, Burger DM, et al. Interchangeability of generic drugs: a nonparametric pharmacokinetic model of gabapentina generic drugs. Clin Pharmacol Ther. 2018 jan; doi: 10.1002/cpt.1023.

52. Goa KL, Sorkin EM. Gabapentin: A review of its pharmacological properties and clinical potential in epilepsy. Drugs 1993 set; 46 (3): 409-427.

53. Goldberg DS, McGee S. Pain as a global public health priority. BMC Public Health 2011 out; 11: 770.

54. Gordi T, Hou E, Kasichayanula S, Berner B. Pharmacokinetics of gabapentin after a single day and at steady state following the administration of gastric-retentive-extended-release and immediate-release tablets: a randomized, open-label, multiple-dose, three-way crossover, exploratory study in healthy subjects. Clin Ther. 2008 maio; 30 (5): 909-16.

55. Gujral RS, Haque SM. A validated method without derivatization for the determination of gabapentin in bulk, pharmaceutical formulation and human urine samples. Int J Biomed Sci. 2009 jan; 5 (2): 169-74.

56. Guttuso T Jr, Kurlan R, McDermott MP, Kieburtz K. Gabapentin's effects on hot flashes in postmenopausal women: a randomized controlled trial. Obstet Gynecol. 2003 fev; 101 (2): 337-45.

57. Hahn K, Arendt G, Braun JS, von Giesen HJ, Husstedt IW, Maschke M, et al. A placebo-controlled trial of gabapentin for painful HIV-associated sensory neuropathies. J Neurol. 2004 out; 251 (10): 1260-6.

58. Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, et al. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. Proc Natl Acad Sci USA. 2008 mar; 105 (9): 3628-33.

59. Hložek T, Bursová M, Coufal P, Čabala R. Gabapentin, pregabalin and vigabatrin quantification in human serum by GC-MS after hexyl chloroformate derivatization. J Anal Toxicol. 2016 nov; 40 (9): 749-753.

60. Ikeda K, Ikawa K, Yokoshige S, Yoshikawa S, Morikawa N. Gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry quantitation of valproic acid and gabapentin, using dried plasma spots, for therapeutic drug monitoring in in-home medical care. Biomed Chromatogr. 2014 dez; 28 (12): 1756-62.

61. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Indicadores Sociais Mínimos [acesso em 16 out 2017]. Disponível em: https://www.ibge.gov.br.

62. Jalalizadeh H, Souri E, Tehrani MB, Jahangiri A. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study. J Chromatogr B 2007 jul; 854 (1-2): 43-7.

63. Johannessen SI, Battino D, Berry DJ, Bialer M, Krämer G, Tomson T, et al. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. Ther Drug Monit. 2003 jun; 25 (3): 347-63.

64. Johannessen SI, Tomson T. Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed? Clin Pharmacokinet. 2006; 45 (11): 1061-75.

65. Juenke JM, Brown PI, Johnson-Davis KL, McMillin G. A. Simultaneous quantification of levetiracetam and gabapentin in plasma by ultra-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection. Ther Drug Monit.

2011 abr; 33 (2): 209-13.

66. Kang HA, Cho HY, Lee YB. The effect of MDR1 G2677T/A polymorphism on pharmacokinetics of gabapentin in healthy Korean subjects. Arch Pharm Res. 2007b jan; 30 (1): 96-101.

67. Kang HJ, Song IS, Shin HJ, Kim WY, Lee CH, Shim JC, et al. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population. Drug Metab Dispos. 2007a abr; 35 (4): 667-75.

68. Kawasaki Y, Kato Y, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic cation transporter OCTN1 single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. J Pharm Sci. 2004 dez; 93 (12): 2920-6.

69. Kim KB, Seo KA, Kim SE, Bae SK, Kim DH, Shin JG. Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2011 dez; 56 (4): 771-7.

70. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. Pharm Res. 2007 jul; 24 (7): 1227-51.

71. Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. Mol Aspects Med. 2013 abr-jun; 34 (2-3): 413-35.

72. Krasowski MD, McMillin GA. Advances in anti-epileptic drug testing. Clin Chim Acta 2014 set; 436: 224-36.

73. Krasowski MD. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-Epilepsy Medications. Pharmaceuticals 2010 jun; 3 (6): 1909-1935.

74. Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. Neuroscience 2016 dez; 338: 183-206.

75. Kühne A, Kaiser R, Schirmer M, Heider U, Muhlke S, Niere W, et al. Genetic polymorphisms in the amino acid transporters LAT1 and LAT2 in relation to the pharmacokinetics and side effects of melphalan. Pharmacogenet Genomics 2007 jul; 17 (7): 505-17.

76. Kukkar A, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. Arch Pharm Res. 2013 mar; 36 (3): 237-51.

77. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 1991 out; 19 (19): 5444.

78. Lai Y. Transporters in Drug Discovery and Development. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2013, p. 455-631.

79. Lal R, Ellenbogen A, Chen D, Zomorodi K, Atluri H, Luo W, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response study to assess the

pharmacokinetics, efficacy, and safety of gabapentin enacarbil in subjects with restless legs syndrome. Clin Neuropharmacol. 2012 jul-ago; 35 (4): 165-73.

80. Lal R, Sukbuntherng J, Luo W, Vicente V, Blumenthal R, Ho J, et al. Clinical pharmacokinetic drug interaction studies of gabapentin enacarbil, a novel transported prodrug of gabapentin, with naproxen and cimetidine. Br J Clin Pharmacol. 2010 maio; 69 (5): 498-507.

81. Lamb EJ, O'Riordan SE, Delaney MP. Kidney function in older people: pathology, assessment and management. Clin Chim Acta 2003 ago; 334 (1-2): 25-40.

82. Landmark C, Beiske G, Baftiu A, Burns Ml, Johannessen Si. Experience from therapeutic drug monitoring and gender aspects of gabapentin and pregabalin in clinical practice. Seizure 2015 maio; 28: 88-91.

83. Larsen MS, Frolund S, Nohr MK, Nielsen CU, Garmer M, Kreilgaard M, et al. In vivo and in vitro evaluations of intestinal gabapentin absorption: effect of dose and inhibitors on carrier-mediate transport. Pharm Res. 2015 mar; 32 (3): 898-909.

84. Leabman MK, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, et al. Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. Pharmacogenetics 2002 jul; 12 (5): 395-405.

85. Lee DO, Ziman RB, Perkins AT, Poceta JS, Walters AS, Barrett RW, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the efficacy and tolerability of gabapentin enacarbil in subjects with restless legs syndrome. J Clin Sleep Med. 2011 jun; 7 (3): 282-92.

86. Levendoglu F, Ogün CO, Ozerbil O, Ogün TC, Ugurlu H. Gabapentin is a first line drug for the treatment of neuropathic pain in spinal cord injury. Spine (Phila Pa 1976). 2004 abr; 29 (7): 743-51.

87. Lin X, Cai Y, Yan J, Zhang L, Wu D, Li H. Determination of gabapentin in human plasma and urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr Sci. 2015 jul; 53 (6): 986-92.

88. Maneuf YP, Gonzalez MI, Sutton KS, Chung FZ, Pinnock RD, Lee K. Cellular and molecular action of the putative GABA-mimetic, gabapentin. Cell Mol Life Sci. 2003 abr; 60 (4): 742-50.

89. Martinc B, Roskar R, Grabnar I, Vovk T. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. J Chromatogr B 2014 jul; 962: 82-8.

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

91. Mercolini L, Mandrioli R, Amore M, Raggi MA. Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. J Pharm Biomed Anal. 2010 set; 53 (1): 62-7.

92. Milosheska D, Grabnar I, Vovk T. Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. Eur J Pharm Sci. 2015 jul; 75: 25-39.

93. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2013 abr; 2:e38.

94. Muscas GC, Chiroli S, Luceri F, Mastio MD, Balestrieri F, Arnetoli G. Conversion from thrice daily to twice daily administration of gabapentin (GBP) in partial epilepsy: analysis of clinical efficacy and plasma levels. Seizure 2000 jan; 9 (1): 47-50.

95. Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, Scharpe SL, Hatfield GM, Lambert WE. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. Clin Chem Lab Med. 2004; 42 (11): 1228-55.

96. Nguyen TV, Smith DE, Fleisher D. PEPT1 enhances the uptake of gabapentin via trans-stimulation of $b^{0,+}$ exchange. Pharm Res. 2007 fev; 24 (2): 353-60.

97. Oertel R, Arenz N, Pietsch J, Kirch W. Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC-MS. J Sep Sci. 2009 jan; 32: 238-243.

98. Offord J, Isom LL. Drugging the undruggable: gabapentin, pregabalin and the calcium channel $\alpha 2\delta$ subunit. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2016 jul-ago; 51 (4): 246-56.

99. Omasits U, Ahrens CH, Müller S; Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. Bioinformatics 2014 mar; 30 (6): 884-886.

100. Paraskevas G, Atta-Polito J, Koupparis M. Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent. J Pharm Biomed Anal. 2002 jul; 29 (5): 865-72.

101. Park JH, Jhee OH, Park SH, Lee JS, Lee MH, Shaw LM, et al. Validated LC-MS/MS method for quantification of gabapentin in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers. Biomed Chromatogr. 2007 ago; 21 (8): 829-35.

102. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, et al. Antiepileptic drugs-best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. Epilepsia 2008 jul; 49 (7): 1239-76.

103. Patsalos PN, Zugman M, Lake C, James A, Ratnaraj N, Sander JW. Serum protein binding of 25 antiepileptic drugs in a route clinical setting: A comparison of free non-protein-bound concentrations. Epilepsia 2017 jul; 58 (7): 1234-1243.

104. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet. 2004 maio; 36 (5): 471-5.

105. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. Accred Qual Assur. 2002 nov; 7 (11): 441-449.

106. Radulovic LL, Wilder BJ; Leppik E; Bockcrader HN, Chang T, Posvar EL, et al. Lack of interaction of gabapentin with carbamazepine or valproate. Epilepsia 1994 jan-fev; 35 (1): 155-61.

107. REFARGEN. Projeto REFARGEN-PGENI [Internet]. Rede Nacional de Farmacogenética. [acesso em 18 nov 2016]. Disponível em: http://www.refargen.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=56.

108. Rice ASC, Maton S, Postherpetic Neuralgia Study Group. Gabapentin in postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind, placebo controlled study. Pain 2001 nov; 94: 215-224.

109. Rocha ABO, Kuminek G, Machado TC, Rosa J, Rauber GS, Borba PAA, et al. Cocristais: uma estratégia promissora na área farmacêutica. Quim. Nova 2016 ago; 39 (9): 1112-1125.

110. Rowbotham M, Harden N, Stacey B, Bernstein P, Magnus-Miller L. Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. JAMA 1998 dez; 280 (21): 1837-42.

111. Serpell MG, Neuropathic Pain Study Group. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Pain 2002 out; 99: 557-566.

112. Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsura T, Yano I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultraperformance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. Biomed Chromatogr. 2012 dez; 26 (12): 1519-28.

113. Song IS, Shin HJ, Shim EJ, Jung IS, Kim WY, Shon JH, et al. Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. Clin Pharmacol Ther. 2008 nov; 84 (5): 559-62.

114. Stewart BH, Kugler AR, Thompson PR, Bockbrader HN. A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. Pharm Res. 1993 fev; 10 (2): 276-81.

115. Striano S, Striano P, Capone D, Pisani F. Limited place for plasma monitoring of new antiepileptic drugs in clinical practice. Med Sci Monit. 2008 out; 14 (10): RA173-8.

116. Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender D. Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system L alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. J Neurochem. 1995 maio; 64 (5): 2125-31.

117. Tai Q, Kirshblum S, Chen B, Millis S, Johnston M, DeLisa JA. Gabapentin in the treatment of neuropathic pain after spinal cord injury: a prospective, randomized, double-blind, crossover trial. J Spinal Cord Med. 2002; 25 (2): 100-5.

118. Tjandrawinata RR, Setiawati E, Putri RS, Yunaidi DA, Amalia F, Susanto LW. Single dose pharmacokinetic equivalent study of two gabapentin preparations in healthy subjects. Drug Des Devel Ther. 2014 set; 8: 1249-55.

119. Toh DSL, Limenta LMG, Yee JY, Wang LZ, Goh BC, Murray M, et al. Effect of mushroom diet on pharmacokinetics of gabapentin in healthy Chinese subjects. Br J Clin Pharmacol. 2014 jul; 78 (1): 129-134.

120. Tran P, Yoo HD, Ngo L, Cho HY, Lee YB. Population pharmacokinetics of gabapentin in healthy Korean subjects with influence of genetic polymorphisms of ABCB1. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2017 dez; 44 (6): 567-579.

121. Türck D, Vollmer Ko, Bockbrader H, Sedman A. Dose-linearity of the new anticonvulsant gabapentin after multiple oral doses. Eur J Clin Pharmacol. 1989; 36: A310.

122. Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehrt D, et al. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. Clin Pharmacol Ther. 2009 set; 86 (3): 299-306.

123. UCSF. Pharmacogenetics of Membrane Transporters [Internet]. University of California San Francisco. [acesso em 21 mar 2017]. Disponível em: http://pharmacogenetics.ucsf.edu/index.html.

124. Urban TJ, Brown C, Castro RA, Shah N, Mercer R, Huang Y, et al. Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin. Clin Pharmacol Ther. 2008 mar; 83 (3): 416-21.

125. Urban TJ, Yang C, Lagpacan LL, Brown C, Castro RA, Taylor TR, et al. Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (SLC22A4). Pharmacogenet Genomics. 2007 set; 17 (9): 773-82.

126. Wang ZJ, Yin OQ, Tomlinson B, Chow MS. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. Pharmacogenet Genomics. 2008 jul; 18 (7): 637-45.

127. Wattananat T, Akarawut W. Validated LC-MS-MS method for the determination of gabapentin in human plasma: application to a bioequivalence study. J Chromatogr Sci. 2009 nov-dez; 47 (10): 868-71.

128. Winkelman JW, Armstrong MJ, Allen RP, Chaudhuri KR, Ondo W, Trenkwalder C, et al. Practice guideline summary: Treatment of restless legs syndrome in adults: Report of the guideline development, dissemination, and implementation subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 2016 dez; 87 (24): 2585-2593.

129. Yagi T, Naito T, Mino Y, Takashina Y, Umemura K, Kawakami J. Rapid and validated fluorometric HPLC method for determination of gabapentin in human plasma and urine for clinical application. J Clin Pharm Ther. 2012b fev; 37 (1): 89-94.

130. Yagi T, Naito T, Mino Y, Umemura K, Kawakami J. Impact of concomitant antacid administration on gabapentin plasma exposure and oral bioavailability in healthy adult subjects. Drug Metab Pharmacokinet. 2012a; 27 (2): 248-54.

131. Yoon H, Cho HY, Yoo HD, Kim SM, Lee YB. Influences of organic cation transporter polymorphisms on the population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects. AAPS J. 2013 abr; 15 (2): 571-80.

ANEXOS

ANEXO 1 – Autorização Especial concedida pela ANVISA a FCF-UNESP para compra do padrão analítico de gabapentina

Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

AUTORIZAÇÃO ESPECIAL PARA ESTABELECIMENTO DE ENSINO E PESQUISA N. 013/2016

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

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Gabapentina	7 ampolas de 1ml x 1 mg/ml
Fenobarbital	5 ampolas de 1ml x 1 mg/ml
Fenitoína Sódica	1 g
Carbamazepina	5 ampolas de 1ml x 1 mg/ml
Carbamazepina	1g

O controle e a guarda dos produtos acima ficarão sob a responsabilidade do Professora Dra. Natália Valadares de Moraes, CPF nº 318.183.798-99 e RG 43.454.263-5 SSP/SP.

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

Esta Autorização é válida por 1 (um) ano.

Brasília – DF, 20 de setembro de 2016

Thiago Brasil Silvério
SIAPE 1492947
Coordenador
COCIC/GPCON/GGMON/DIMON/ANVISA

2ª Via ESTABELECIMENTO ADQUIRENTE

Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

Of. 746/2017 – GPCON/GGMON/ DIMON/ ANVISA

Brasília, 30 de maio de 2017.

Ao Responsável Técnico,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (CNPJ: 48.031.918/0025-00)

Assunto: **Aditamento da Autorização Especial para Estabelecimento de Ensino e Pesquisa N. 013/2016**

Sr. Responsável,

Em aditamento à Autorização Especial para Estabelecimento de Ensino e Pesquisa N. 013/2016, emitida por esta agência em 20.09.2016 informamos que, nos campos onde se lê:

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Gabapentina	7 ampolas de 1ml x 1 mg/ml

Leia-se:

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Gabapentina	3 ampolas de 1ml x 1 mg/ml + 300 mg

Atenciosamente,

Thiago Brasil Silvério
Coordenador da COCIC
COCIC/GPCON/GGMON/DIMON/ANVISA

SIA Trecho 5, Área Especial 57, Bloco "B", Brasília / DF CEP 71205-050 – Brasil
Tel. (61) 3462-5832/5848 E-mail: med.controlados@anvisa.gov.br

ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (CEP-FCF)

UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes submetidos ao uso crônico do fármaco

Pesquisador: Priscila Akemi Yamamoto

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 53902516.4.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.274.912

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se bem apresentado, com fundamentação teórica, hipóteses, objetivos, metodologia, exequibilidade.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto propoe avaliar a influência de polimorfismos genéticos de OCTN1 e OCT2 e outras potenciais covariáveis na disposição cinética da GAB em pacientes em uso crônico do fármaco.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são aqueles decorrentes de uma coleta de sangue, (hematoma e dor no local da punção), minimos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A variabilidade na resposta terapêutica de um fármaco pode ser devido à existencia de transportadores especificos que podem variar nos diferentes individuo. Assim, o conhecimento da influencia dos tipos de transportadores/cinetica da gabapentina (anticonvulsivante) pode auxiliar no manejo terapêutico em pacientes não responsivos ou hiperresponsivos.

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 14.801-902
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fcfar.unesp.br

UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE

Continuação do Parecer: 2.274.912

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados e estão de acordo com as exigências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, reunido no dia 29 de agosto de 2017, analisou e aprovou o projeto de pesquisa em questão. O Relatório Parcial deve ser entregue em: 1) FEVEREIRO DE 2018. O Relatório Final junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em AGOSTO de 2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_962381_E3.pdf	14/07/2017 12:34:35		Aceito
Outros	Autorizacao_SCA.pdf	14/07/2017 12:33:48	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Justificativa_Jul2017.pdf	13/07/2017 17:23:28	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Modificado_Julho_2017.pdf	13/07/2017 17:19:25	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Projeto_Modificado_Julho_2017.docx	13/07/2017 17:18:57	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SCA.pdf	13/07/2017 17:17:42	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Aceite_HC2017.pdf	20/04/2017 20:54:50	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HC_ENFERMARIA.pdf	20/04/2017 20:51:47	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HEAB.pdf	31/05/2016 11:33:17	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HCFMRP.pdf	31/05/2016 11:31:16	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	07/03/2016 10:42:16	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 14.801-902
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fcfar.unesp.br

UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE

Continuação do Parecer: 2.274.912

Outros	Carta_de_aceite_HEAB.pdf	04/03/2016 08:40:28	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/12/2015 09:21:40	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Termo_de_doacao.pdf	11/12/2015 16:44:09	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/12/2015 16:42:12	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores.pdf	11/12/2015 16:41:06	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Instituicao_e_IE.pdf	11/12/2015 16:40:35	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

ARARAQUARA, 14 de Setembro de 2017

Assinado por:
Adriano Mondini
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 14.801-902
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fcfar.unesp.br

ANEXO 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEP-HC-FMRP)

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes submetidos ao uso crônico do fármaco

Pesquisador: Priscila Akemi Yamamoto

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 53902516.4.3001.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.102.350

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda de coparticipante, conforme carta de 20/04/2017.

Objetivo da Pesquisa:

Não modificado com a emenda de coparticipante.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não modificado com a emenda de coparticipante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

A emenda é necessária devido a alteração do tamanho amostral, o qual foi recalculado levando em consideração dados da frequência dos polimorfismos em estudo na população brasileira. Além disso, também serão convidados a participar da pesquisa os pacientes internados na enfermaria de neurologia do HC-FMRP-USP (centro coparticipante). Vale ressaltar que o projeto já possui aprovação do CEP-FCF e do CEP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, e já está em andamento (Maiores informações vide carta justificativa 2017).

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

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.102.350

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados ao CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da Instituição Proponente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_906986_E2.pdf	20/04/2017 21:02:29		Aceito
Outros	Justificativa_2017.pdf	20/04/2017 20:55:28	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Aceite_HC2017.pdf	20/04/2017 20:54:50	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Projeto_Modificado_2017.docx	20/04/2017 20:53:59	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Modificado_2017.pdf	20/04/2017 20:52:31	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HC_ENFERMARIA.pdf	20/04/2017 20:51:47	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Carta_justificativa.pdf	01/06/2016 15:15:33	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HEAB.pdf	31/05/2016 11:33:17	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HCFMRP.pdf	31/05/2016 11:31:16	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	07/03/2016 10:42:16	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Outros	Carta_de_aceite_HEAB.pdf	04/03/2016 08:40:28	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/12/2015	Priscila Akemi	Aceito

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

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.102.350

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	09:21:40	Yamamoto	Aceito
Outros	Termo_de_doacao.pdf	11/12/2015 16:44:09	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/12/2015 16:42:12	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores.pdf	11/12/2015 16:41:06	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Instituicao_e_IE.pdf	11/12/2015 16:40:35	Priscila Akemi Yamamoto	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 06 de Junho de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

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

Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina obtidos de estudos clínicos após administração em dose múltipla

Dose diária (mg/dia)	n	τ	$C_{mín}$	$C_{méd}$	$C_{máx}$	$t_{máx}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	ASC^{0-8} (µg.h/mL)	Cl_R (mL/min)	Ae (mg)	Ae %	Referência
300	12	TID	-	-	1.860	2,1	5,1	11,0	122	-	79,0	1
600					3.290	2,0	5,6	19,6	122		69,0	
1.200					5.500	2,1	6,1	33,3	131		64,0	
300	96	TID	860	1.370	1.910	2,0	5,1	11,2	-	-	78,3	2
600			1.550	2.450	3.290	2,0	5,6	19,6			69,0	
900			2.130	3.100	4.020	2,7	5,2	24,8			-	
1.200			2.760	4.160	5.500	2,1	6,1	33,3			63,6	
1.800			4.180	6.640	8.460	2,3	6,0	53,1			64,9	
2.400			4.000	6.090	7.650	1,8	5,3	48,7			52,7	
3.600			6.180	9.580	11.900	1,8	7,5	76,7			47,1	
4.800			6.810	9.750	12.400	2,8	5,9	78,0			35,9	
1.200	11	TID	-	-	5.500	2,1	6,1	33,3	-	253	63,2	3
1.200	14	TID	-	-	5.740± 2.180	-	-	34,4± 11,8	-	-	47,0	4
2.400					8.710± 2.520	-	-	51,4± 4,0			34,0	
3.600					12.100± 3.640			72,4± 21,7			33,0	
4.800					12.500± 4.040			79,7± 27,8			27,0	

GAB: gabapentina; n: número amostral; C_{min}: concentração plasmática mínima (ng/mL); $C_{méd}$: concentração plasmática média (ng/mL); $C_{máx}$: concentração plasmática máxima (ng/mL); $t_{máx}$: tempo para atingir a concentração plasmática máxima; $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação; AUC^{0-8h}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero a 8h; Cl_R: clearance renal; Ae: quantidade total de fármaco excretado na urina [Ae= concentração de GAB na urina x volume de urina total]; Ae (%): % da dose excretada inalterada na urina durante o intervalo de dose no estado de equilíbrio; τ : intervalo de dose; TID: três vezes por dia; BID: duas vezes por dia; QID: quatro vezes por dia; -: dado não disponível. [a]Os valores dos parâmetros farmacocinéticos são valores preditos. [b]AUC^{0-24}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero a 24 h. [c]Concentração plasmática no vale (ng/mL).
[1] Türck et al., 1989; [2] Bockbrader, 1995; [3] Radulovic et al., 1994; [4] Bockbrader et al., 1996.

Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos da gabapentina obtidos de estudos clínicos após administração em dose múltipla (continuação)

Dose diária (mg/dia)	n	τ	$C_{mín}$	$C_{méd}$	$C_{máx}$	$t_{máx}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	ASC^{0-8} (µg.h/mL)	Cl_R (mL/min)	Ae (mg)	Ae %	Referência
1.200	-	TID	2.600	3.900	4.900	-	-	-	-	618	-	5[a]
2.400			4.300	6.200	8.100					1010		
3.600			5.400	7.88	10.200					1280		
4.800			6.300	9.000	11.800					1470		
1.200	-	QID	4.800	4.000	4.800	-	-	-	-	655	-	5[a]
2.400			3.200	6.800	8.200					1110		
3.600			5.500	8.900	10.600					1444		
4.800			7.200	10.500	12.500					1700		
1.200	5	BID	-	3.640[c]	-	-	-	-	-	-	-	6
1.600	2			5.900 [c]								
1.800	9			4.780 [c]								
2.400	7			5.090 [c]								
3.200	6			6.330 [c]								
1.200	5	TID	-	3.220 [c]	-	-	-	-	-	-	-	6
1.600	2			5.200 [c]								
1.800	9			4.300 [c]								
2.400	7			6.140 [c]								
3.200	6			6.870 [c]								
1.800	21	TID	3.534	-	8.166± 1.541	8,0	-	141,0± 30,0 [b]	-	-	-	7
1.800	42	TID	-	6.930	9.070± 3.000	2,3	7,2	166,0± 54,1[b]	-	-	-	8

GAB: gabapentina; n: número amostral; C_{min}: concentração plasmática mínima (ng/mL); $C_{méd}$: concentração plasmática média (ng/mL); $C_{máx}$: concentração plasmática máxima (ng/mL); $t_{máx}$: tempo para atingir a concentração plasmática máxima; $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação; AUC^{0-8h}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero a 8h; Cl_R: clearance renal; Ae: quantidade total de fármaco excretado na urina [Ae= concentração de GAB na urina x volume de urina total]; Ae (%): % da dose excretada inalterada na urina durante o intervalo de dose no estado de equilíbrio; τ : intervalo de dose; TID: três vezes por dia; BID: duas vezes por dia; QID: quatro vezes por dia; -: dado não disponível. [a]Os valores dos parâmetros farmacocinéticos são valores preditos. [b]AUC^{0-24}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo de zero a 24 h. [c]Concentração plasmática no vale (ng/mL).

[5] Gidal et al.,1998[a]; [6] Muscas et al., 2000; [7] Gordi et al., 2008; [8] Backonja; Canafax; Cundy, 2011.

APÊNDICE 2 - Métodos bioanalíticos para quantificação de gabapentina

Tabela 21. Métodos bioanalíticos para quantificação de gabapentina descritos na literatura de 2007-2017

Matriz biológica	Analito	Preparo da amostra	Sistema cromatográfico	Sistema de detecção	Referência
Plasma	GAB, VBG, TOP	Der. e EFS	CLAE	Fluorescência	Mercolini et al., 2010
Plasma e urina	GAB	PP	CLAE	Fluorescência	Yagi et al., 2012b
Plasma	GAB, PBG, VBG, TOP	EFS e Der.	CLAE	Fluorescência	Martinc et al., 2014
Plasma	GAB	Der. e PP	CLAE	UV	Jalalizadeh et al., 2007
Urina	GAB	ELL (3 vezes)	CLAE	UV	Gujral; Haque, 2009
Plasma e urina	GAB	Der. e ME	CLAE	UV	Ebrahimzadeh et al., 2010
Soro	GAB, PGB, VBG	PP	HILIC	MS/MS	Oertel et al., 2009
Plasma	GAB	PP	CLAE	MS/MS	Park et al., 2007
Plasma	GAB	PP	CLAE	MS/MS	Wattananat; Akarawut, 2009
Plasma	GAB e outros	PP	CLAE	MS/MS	Kim et al., 2011
Sangue total, soro e plasma	GAB e outros	PP	CLAE	MS/MS	Deeb et al., 2014
Plasma	GAB, LEV	PP	UHPLC	MS/MS	Juenke et al., 2011
Plasma	GAB e outros	PP	UHPLC	MS/MS	Shibata et al., 2012
Soro	GAB, PGB, VGB	PP	UHPLC	MS/MS	Chahbouni et al., 2013
Plasma e urina	GAB	PP e Der.	EC	LIF	Lin et al., 2015
Soro	GAB, PGB, VGB	Der.	CG	MS	Hložek et al., 2016
Plasma seco	GAB, AVP	Extração com MeOH e Der.	CG	EI/MS	Ikeda et al., 2014

GAB: gabapentina; VGB: vigabatrina; TOP: topiramato; PGB: pregabalina; LEV: levetiracetam; AVP: ácido valpróico; ELL: extração líquido-líquido; Der.: derivatização; PP: precipitação de proteína; EFS: Extração em fase sólida; ME: microextração; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; HILIC: *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica); UHPLC: *Ultra Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Pressão); EC: Eletroforese capilar; CG: cromatografia gasosa; UV: detecção por ultravioleta; MS/MS: detecção por espectrometria de massas em tandem; EI/MS: *electron ionization-mass spectrometry*; LIF: *Laser-induced fluorescence* (fluorescência induzida por laser).

APÊNDICE 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
UNIVERSIDADE DE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Câmpus de Araraquara – Araraquara – SP

PESQUISA CIENTÍFICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Impacto dos polimorfismos genéticos de OCT2 e OCTN1 na disposição cinética da gabapentina em pacientes submetidos ao uso crônico do fármaco.

Nome do Participante do projeto:_____
Data de nascimento____/____/_____ Registro e/ou Documento de Identificação:_____

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Priscila Akemi Yamamoto (FCF-UNESP), Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes (FCF-UNESP).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos e exames complementares devidamente planejados, conforme texto a seguir.

A gabapentina é um remédio aceito para tratar a epilepsia e dor crônica. O presente estudo visa avaliar a influência do código genético na quantidade de gabapentina presente no sangue. Como o (a) senhor (a) tem indicação para usar a gabapentina para tratar a epilepsia ou a dor crônica, a sua colaboração será importante para avaliarmos se o código genético altera a quantidade de gabapentina no sangue.

Inicialmente, no momento em que o (a) senhor (a) for atendido (a) pelo médico será convidado (a) a participar deste protocolo de pesquisa, o qual envolve coleta de amostras (sangue e urina) e obtenção de dados do prontuário (peso corporal, altura, idade, sexo, informações referentes a comorbidades, uso de outros remédios). A coleta de sangue será realizada após o uso de gabapentina a pelo menos 1 semana. No dia da investigação, serão coletadas amostras de sangue para a avaliação das funções do seu corpo, para avaliar a quantidade do remédio gabapentina no sangue e também para avaliação genética. A avaliação genética poderá explicar a distribuição do remédio gabapentina no seu corpo. Para as coletas de sangue, será mantido um tubinho de plástico na sua veia para retirar três amostras em três diferentes períodos do dia, sendo a primeira coleta de 18 mL e a segunda e terceira coletas de 6 mL cada, num volume total de 30 mL. Este volume de 30 mL de sangue não é grande, pois representa menos de 1 % do volume total de sangue do adulto. Será coletada a urina no intervalo entre as doses do remédio gabapentina no mesmo dia da coleta das amostras de sangue. O tempo total para a realização do projeto de pesquisa será de no máximo 12 horas.

Os riscos envolvidos com a sua participação no projeto são aqueles decorrentes de uma coleta de sangue, que são hematoma e dor no local da punção. Portanto, o procedimento que realizaremos é seguro.

A sua colaboração trará como benefícios o conhecimento de como o código genético influência na quantidade do remédio gabapentina presente no sangue. A sua participação poderá auxiliar na elaboração de futuras estratégias de intervenção para ajustar a dose de gabapentina de acordo com o código genético.

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

1. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar minha vontade de continuar participando;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;

3. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos benefícios, procedimentos e riscos ocasionados pelo tratamento a que serei submetido (a);
4. A garantia de acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo;
5. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;
6. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
7. Este documento é emitido em duas vias, sendo que uma dessas vias ficará com o participante da pesquisa e a outra com o pesquisador.

Tenho ciência do exposto acima, concordo em participar do protocolo de pesquisa.

_____, _____de _____ de 20__

Priscila Akemi Yamamoto Pesquisador Responsável CPF: 062.868.506-86	Coordenador Clínico
Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes Pesquisador Responsável CRF-SP: 67349, CPF: 318.183.798-99	**Participante da pesquisa ou Responsável legal** Identificação: _____ _____

Contato: Priscila Akemi Yamamoto: (16) 3301 4688, (16) 98112-1751, e-mail: pri.yamamoto@hotmail.com
FCF-UNESP, Dept. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14800-903, Araraquara, SP - Brasil

Dra. Natália Valadares de Moraes: (16) 3301 4689, (16) 98211 8363, e-mail: nmoraes@fcfar.unesp.br
FCF-UNESP, Dept. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14800-903, Araraquara, SP - Brasil

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-UNESP: (16) 3301 6897
Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14800-903, Araraquara, SP – Brasil

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: (16) 3602 2228
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Campus Universitário, s/n, Monte Alegre, 14048-900, Ribeirão Preto, SP – Brasil.

APÊNDICE 4 – Características demográficas, antropométricas e clínica dos participantes

Tabela 22. Características demográficas e antropométricas dos participantes (n=66)

Participante	Sexo	Idade (anos)	Cor/Raça[a]	Altura (m)	Peso (kg)	IMC (km/m^2)	Genótipo	
							OCT2	OCTN1
1	M	62	Preto	1,76	76,3	24,65	GG	CC
2	F	34	Pardo	1,71	85	29,07	GT	CC
3	F	32	Branco	1,64	60,0	22,31	GT	CT
4	F	65	Branco	1,64	97,0	36,06	GT	CC
5	M	72	Branco	1,60	50,0	19,53	GT	CT
6	M	52	Branco	1,69	82,4	28,85	GT	TT
7	M	35	Branco	1,75	72,0	23,51	GT	CT
8	F	39	Branco	1,48	63,6	29,04	GT	CT
9	F	32	Branco	1,57	75,6	30,67	GT	CT
10	M	45	Branco	1,72	81,8	27,65	GT	CC
11	M	61	Branco	1,73	65,1	21,75	GG	CT
12	F	55	Branco	1,60	65,0	25,39	GT	CC
13	M	50	Branco	1,81	75,0	22,89	GT	CT
14	M	53	Branco	1,71	94,0	32,15	GT	TT
15	F	71	Branco	1,65	77,3	28,39	GT	CC
16	M	75	Branco	1,85	76,7	22,41	GT	CC
17	F	55	Branco	1,59	77,0	30,46	GG	CT
18	F	54	Branco	1,70	65,0	22,49	GT	CT
19	M	61	Branco	1,74	80,7	26,64	GT	CT
20	M	59	Branco	1,71	76,6	26,18	GT	CT
21	F	20	Branco	1,65	70,1	25,75	GT	CC
22	F	56	Preto	1,66	97,0	35,20	GT	CT
23	M	66	Branco	1,73	72,0	24,06	GT	TT
24	M	57	Branco	1,80	79,9	24,66	GT	CT
25	M	75	Branco	1,76	111,5	35,98	GT	CC
26	F	67	Branco	1,63	68,1	25,63	GT	TT
27	F	70	Branco	1,52	57,1	24,69	GT	CC
28	F	43	Branco	1,65	65,0	23,88	GT	CC
29	F	63	Preto	1,54	73,0	30,78	GT	CC
30	M	42	Branco	1,84	100,0	29,54	GT	CC
31	F	65	Branco	1,49	62,5	28,13	GT	CT
32	F	67	Branco	1,57	98,2	39,83	GT	CT
33	M	56	Branco	1,70	88,0	30,45	GT	CT
34	F	50	Branco	1,70	83,0	28,72	GT	TT
35	F	56	Branco	1,54	85,0	35,84	GT	CC
36	M	35	Branco	1,71	79,3	27,12	GT	CC
37	M	55	Branco	1,65	75,8	27,84	GG	CT
38	F	55	Branco	1,63	118,6	44,64	GG	CC
39	M	55	Branco	1,68	77,7	27,53	GT	CT
40	F	61	Branco	1,52	78,1	33,80	GT	CT
41	M	55	Preto	1,79	83,5	26,04	GT	CC
42	M	50	Branco	1,67	120,0	43,03	GT	CC
43	M	48	Pardo	1,78	68,0	21,46	GT	CC
44	M	57	Branco	1,68	82,0	29,04	GT	CC
45	F	33	Branco	1,64	82,1	30,52	GT	CC
46	M	71	Branco	1,65	84,9	31,17	GT	CC
47	F	56	Branco	1,54	64,4	27,13	GT	CC
48	M	51	Branco	1,60	76,0	29,69	GT	TT
49	F	60	Branco	1,68	95,0	33,66	GT	CT
50	F	51	Preto	1,71	78,0	26,67	GT	CC

IMC: índice de massa corporal [peso/(altura^2)]; DP: desvio padrão.

[a]Classificação segundo o conceito de cor ou raça do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE (IBGE, 2017). Dados obtidos dos prontuários (autodeclaração)

Tabela 22. Características demográficas e antropométricas dos participantes (n=66) (continuação)

Participante	Sexo	Idade (anos)	Cor/Raça[a]	Altura (m)	Peso (kg)	IMC (km/m^2)	Genótipo	
							OCT2	OCTN1
51	F	36	Branco	1,69	79,8	27,94	GT	TT
52	F	63	Branco	1,56	109,3	44,89	GT	CC
53	F	75	Branco	1,68	92,0	32,60	GT	CT
54	F	58	Branco	1,47	86,8	40,17	GT	CT
55	F	31	Branco	1,57	102,0	41,38	GG	CC
56	F	46	Branco	1,60	51,5	20,12	GT	CT
57	M	46	Branco	1,73	111,0	37,09	GG	CT
58	M	56	Branco	1,68	105,0	37,20	GT	CT
59	F	69	Branco	1,55	65,6	27,24	GT	CC
60	M	63	Branco	1,80	85,7	26,44	GT	TT
61	F	55	Branco	1,62	67,5	25,70	GT	CC
62	M	52	Branco	1,65	72,0	26,45	GT	CT
63	M	59	Branco	1,59	55,3	21,87	GG	CC
64	F	25	Branco	1,64	66,3	24,65	GT	CC
65	F	64	Branco	1,52	60,3	26,08	GT	CC
66	M	44	Branco	1,84	84,4	24,93	GT	CT
Média		**54±13**		**1,66**	**79,8**	**29,05**		
DP				**0,09**	**15,6**	**5,91**		

IMC: índice de massa corporal [peso/(altura^2)]; DP: desvio padrão.
[a]Classificação segundo o conceito de cor ou raça do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE (IBGE, 2017). Dados obtidos dos prontuários (autodeclaração).

Tabela 23. Dados clínicos dos participantes (n=66)

Participante	Dose (mg/dia)	Intervalo de dose	Comorbidades	Diagnóstico	ETL	TBG	Exames laboratoriais		
							Ureia (mg/dL)	Cr_S (mg/dL)	eTFG (mL/min/1,73m^2)
1	600	BID	1, 2	DNPT pós-AVC	N	N	nd	0,78	112,1
2	800	BID	3, 4	DNPT pós-AVC	N	N	nd	0,71	128,8
3	1.800	TID	-	Hérnia discal	N	N	nd	0,77	102,9
4	1.200	QID	5-7	Lesão de nervo	N	N	nd	nd	nd
5	800	BID	1	DNPT pós-AVC	S	N	53,00	0,80	89,2
6	2.400	TID	2, 8	Polineuropatia periférica	N	N	nd	nd	nd
7	3.600	TID	-	Lesão medular	N	N	nd	0,91	108,8
8	1.800	TID	1, 2	Hérnia discal	N	N	nd	nd	nd
9	3.600	TID	-	Mielite transversa	N	N	32,76	0,60	119,8
10	900	TID	-	Dor nociceptiva	N	N	nd	1,14	77,8
11	600	BID	1, 9, 10	Hérnia discal	N	S	nd	1,03	78,00
12	600	BID	1, 7, 8, 11-12	Hérnia discal	N	N	nd	nd	nd
13	600	BID	-	nd	N	S	nd	nd	nd
14	2.700	TID	1, 2, 4	Mielorradiculopatia	N	N	nd	nd	nd
15	1.800	TID	1, 2	Hérnia discal	N	N	nd	nd	nd
16	900	TID	1-3, 7, 13,14	Neuropatia diabética	N	N	nd	1,86	34,6
17	900	TID	1, 2, 4-7, 13, 15, 16	Neuropatia diabética	N	N	nd	0,87	75,0
18	1.800	TID	-	Mielite-neurocisticercose	N	N	nd	0,67	99,7
19	2.700	TID	1, 2	Polineuropatia tóxica	N	N	nd	1,44	52,0
20	600	BID	2, 17	SDCR	N	N	nd	0,90	93,2
21	3.600	TID	-	SDCR	N	N	nd	nd	nd
22	1.800	TID	-	Mielite transversa	N	N	nd	1,10	65,0
23	1.800	TID	1, 2, 8, 13, 18, 19	Hérnia discal	N	N	nd	1,10	69,6

QD: uma vez ao dia; BID: duas vezes ao dia; TID: três vezes ao dia; QID: quatro vezes ao dia; ETL: etilista; TBG: tabagista; Cr_S: creatinina sérica; eTFG: taxa de filtração glomerular estimada; S: sim; N: não; DP: desvio padrão; -: sem comorbidade; nd: dado não disponível; SDCR: Síndrome de Dor Complexa Regional; CMT: neuropatia hereditária de Charcot-Marie-Tooth; PIDC: polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica. [a]Plexopatia secundária ao HIV, CMV e/ou TARV.
1: hipertensão; 2: dislipidemia; 3: neopasia; 4: problemas cardiovasculares; 5: obesidade; 6: asma; 7: transtorno mental; 8: hipotiroidismo; 9: epilepsia; 10: hepatopatia; 11: incontinência urinária e/ou intestinal; 12: probemas de visão; 13: *diabetes mellitus*; 14: insuficiência renal; 15: apneia do sono; 16: migranea; 17: HIV; 18: pancreatite; 19: problemas gástricos e/ou esofágicos; 20: hipovitaminose B12; 21: rinite alérgica; 22: diverticulite; 23: osteopenia; 24: bursite; 25: miastenia gravis; 26: bexiga neurogênica; 27: psoríase vulgar; 28: anemia; 29: doença pulmonar obstrutiva crônica; 30: oligoartrite e tendinite.

Tabela 23. Dados clínicos dos participantes (n=66) (continuação)

Participante	Dose (mg/dia)	Intervalo de dose	Comorbidades	Diagnóstico	ETL	TBG	Exames laboratoriais		
							Ureia (mg/dL)	Cr_S (mg/dL)	eTFG (mL/min/1,73m^2)
24	900	TID	7	Esclerose múltipla	N	S	nd	0,99	84,2
25	2.400	TID	1, 3, 19, 20	Hérnia discal	S	N	nd	1,03	70,7
26	1.800	TID	1, 2, 4, 8, 13	Dor facial atípica	N	N	62,29	1,24	44,9
27	600	BID	1, 7	Hérnia discal	N	N	nd	nd	nd
28	1.200	TID	3	Lesão actínica	N	N	nd	nd	nd
29	900	TID	1, 6, 8, 11, 21	nd	N	N	15,07	0,76	96,8
30	900	TID	-	Esclerose múltipla	N	N	24,67	0,90	105,0
31	900	TID	1, 4	Hérnia discal	N	S	nd	0,65	93,2
32	1.800	TID	1, 2, 5-7, 13, 22	Neuralgia do trigêmeo	N	N	nd	0,70	89,7
33	600	QD	1, 14	Mielite transversa	N	N	87,31	3,34	19,5
34	900	TID	8	Hérnia discal	N	N	nd	0,98	67,3
35	900	TID	1, 2, 5-7, 13, 15, 20	Neuropatia diabética	N	S	nd	0,79	83,7
36	1.800	TID	-	CMT e PIDC	N	N	20,08	0,81	115,1
37	1.600	QID	1, 2	SDCR	N	N	nd	0,78	101,6
38	2.700	TID	1, 5, 7, 13	Mielite transversa	N	N	nd	0,84	78,2
39	1.800	TID	-	Hérnia discal	N	N	nd	0,72	105,0
40	1.800	TID	1, 23-25	Hérnia discal	N	N	nd	0,62	97,3
41	1.800	TID	2, 17, 23	Plexopatia secundária[a]	N	N	nd	1,13	84,3
42	800	BID	1, 13, 26	Central	N	N	38,00	0,60	117,2
43	1.800	BID	-	Polineuropatia metabólica	S	S	nd	0,79	123,1
44	900	TID	1, 2, 4	Lesão de nervo	N	N	nd	0,95	88,5
45	900	TID	-	nd	N	S	nd	0,65	116,6
46	600	BID	1-3, 5, 13, 27	Hérnia discal	N	N	37,40	0,91	84,5

QD: uma vez ao dia; BID: duas vezes ao dia; TID: três vezes ao dia; QID: quatro vezes ao dia; ETL: etilista; TBG: tabagista; Cr_S: creatinina sérica; eTFG: taxa de filtração glomerular estimada; S: sim; N: não; DP: desvio padrão; -: sem comorbidade; nd: dado não disponível; SDCR: Síndrome de Dor Complexa Regional; CMT: neuropatia hereditária de Charcot-Marie-Tooth; PIDC: polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica. [a]Plexopatia secundária ao HIV, CMV e/ou TARV.
1: hipertensão; 2: dislipidemia; 3: neopasia; 4: problemas cardiovasculares; 5: obesidade; 6: asma; 7: transtorno mental; 8: hipotiroidismo; 9: epilepsia; 10: hepatopatia; 11: incontinência urinária e/ou intestinal; 12: probemas de visão; 13: *diabetes mellitus*; 14: insuficiência renal; 15: apneia do sono; 16: migranea; 17: HIV; 18: pancreatite; 19: problemas gástricos e/ou esofágicos; 20: hipovitaminose B12; 21: rinite alérgica; 22: diverticulite; 23: osteopenia; 24: bursite; 25: miastenia gravis; 26: bexiga neurogênica; 27: psoríase vulgar; 28: anemia; 29: doença pulmonar obstrutiva crônica; 30: oligoartrite e tendinite.

Tabela 23. Dados clínicos dos participantes (n=66) (continuação)

Participante	Dose (mg/dia)	Intervalo de dose	Comorbidades	Diagnóstico	ETL	TBG	Exames laboratoriais		
							Ureia (mg/dL)	Cr_S (mg/dL)	eTFG (mL/min/1,73m^2)
47	1.200	QID	1, 2, 7	Pós-herpética e SDCR	N	S	nd	0,70	96,9
48	1.200	BID	7	nd	N	S	nd	1,07	79,9
49	800	BID	1, 3, 5, 7, 13	Fibromialgia	N	N	29,00	0,60	99,1
50	1.200	TID	8, 28, 29	Lúpus e úlcera crônica	N	N	29,00	0,90	85,8
51	1800	TID	-	Neuralgia do trigêmeo	N	N	nd	0,61	116,6
52	1800	TID	1, 5, 13	Hérnia discal	N	N	nd	0,64	95,0
53	1200	TID	1, 13, 19, 29, 30	Fratura de vértebra	N	N	28,00	0,60	89,2
54	1800	TID	1, 2, 5, 7, 8, 29	nd	N	N	49,86	1,19	50,3
55	600	BID	1	Hérnia discal	N	N	nd	0,60	121,5
56	900	TID	3	Lesão de nervo	N	S	nd	0,56	111,8
57	600	BID	-	Miopatia congênita	N	N	nd	nd	nd
58	1800	TID	2, 13	Neuropatia diabética	N	N	nd	1,77	42,0
59	1800	TID	-	Hérnia discal	N	S	nd	0,44	103,0
60	1800	TID	2	Hérnia discal	N	N	nd	0,79	95,6
61	1800	TID	-	Neuralgia do trigêmeo	N	N	nd	0,84	78,2
62	2700	TID	1, 2, 8	Hérnia discal	N	N	31,68	0,74	106,1
63	900	TID	-	SDCR	N	N	nd	0,91	91,9
64	900	TID	4	Central	N	N	16,60	0,53	132,0
65	600	BID	-	nd	N	N	nd	0,62	95,3
66	1800	TID	-	Hérnia discal	N	N	Nd	0,79	109,2
Média± DP							**36,98± 19,24**	**0,90± 0,43**	**90,4± 23,8**

QD: uma vez ao dia; BID: duas vezes ao dia; TID: três vezes ao dia; QID: quatro vezes ao dia; ETL: etilista; TBG: tabagista; Cr_S: creatinina sérica; eTFG: taxa de filtração glomerular estimada; S: sim; N: não; DP: desvio padrão; -: sem comorbidade; nd: dado não disponível; SDCR: Síndrome de Dor Complexa Regional; CMT: neuropatia hereditária de Charcot-Marie-Tooth; PIDC: polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica. [a]Plexopatia secundária ao HIV, CMV e/ou TARV.
1: hipertensão; 2: dislipidemia; 3: neopasia; 4: problemas cardiovasculares; 5: obesidade; 6: asma; 7: transtorno mental; 8: hipotiroidismo; 9: epilepsia; 10: hepatopatia; 11: incontinência urinária e/ou intestinal; 12: probemas de visão; 13: *diabetes mellitus*; 14: insuficiência renal; 15: apneia do sono; 16: migranea; 17: HIV; 18: pancreatite; 19: problemas gástricos e/ou esofágicos; 20: hipovitaminose B12; 21: rinite alérgica; 22: diverticulite; 23: osteopenia; 24: bursite; 25: miastenia gravis; 26: bexiga neurogênica; 27: psoríase vulgar; 28: anemia; 29: doença pulmonar obstrutiva crônica; 30: oligoartrite e tendinite.

Tabela 24. Outros medicamentos utilizados pelos participantes (n=66)

Participante	Outros medicamentos
1	Anlodipino, carbamazepina, enalapril, hidroclorotiazida, nortriptilina, sinvastatina
2	Abatacept, ácido fólico, carvedilol, codeína, furosemida, metotrexato, omeprazol, prednisona, sertralina, varfarina
3	Ciclobenzaprina, duloxetina, metadona
4	Ácido valpróico, clonazepam, codeína, dipirona, risperidona
5	Ácido acetilsalicílico, clorexidina, dipirona, escopolamina, heparina sódica, lactulose, ranitidina, sertralina
6	Ciprofibrato, clonazepam, levotiroxina, omeprazol, pitavastatina, quetiapina, venlafaxina
7	Amitriptilina, dipirona, metadona, omeprazol, sulfato ferroso, tramadol, varfarina
8	Amitriptilina, atenolol, codeína, paracetamol, sinvastatina
9	Lamotrigina, oxibutinina
10	Amitriptilina
11	Clonazepam, fenitoína, fenobarbital, hidroclorotiazida, sertralina
12	Baclofeno, ciclobenzaprina, clonazepam, dipirona, levotiroxina, omeprazol, orfenadrina, picossulfato de sódio, propranolol, sertralina, topiramato
13	Amitriptilina, complexo B
14	Carvedilol, furosemida, varfarina
15	Amitriptilina, atorvastatina, cálcio, ciclobenzaprina, codeína, fluoxetina, pracetamol, propranolol
16	Ácido acetilsalicílico, doxazosina, enalapril, finasterida, insulina, sinvastatina, sitagliptina
17	Ácido acetilsalicílico, atorvastatina, beclometasona, bromoprida, budesonida, clonidina, diltiazem, espironolactona, formoterol, furosemida, insulina, losartana, metformina, minoxidil, nitrazepam, omeprazol, oxibutinina, propatilnitrato
18	Ácido fólico, baclofeno, domperidona, flogorosa, metotrexato, pantoprazol, sucrafilme
19	Alopurinol, amitriptilina, enalapril, sinvastatina
20	Atorvastatina, diazepam, lamivudina, lopinavir, ritonavir, tenofovir
21	Morfina, venlafaxina
22	Amitriptilina, baclofeno, ciclobenzaprina, solifenacina
23	Ácido fólico, fenobarbital, hidroclorotiazida, levotiroxina, losartana, metformina, omeprazol, pancreatina, sinvastatina
24	Doxazosina, omeprazol, sertralina
25	Alopurinol, amitriptilina, atenolol, codeína, losartana, paracetamol
26	Ácido acetilsalicílico, baclofeno, carbamazepina, clonazepam, codeína, diosmina, ezetimibe, fenofibrato, glicazida, hidroclorotiazida, levotiroxina, metformina, ômega 3, omeprazol, oristate, rosuvastatina, sitagliptina, tramadol, valsartana, venlafaxina, vitamina D3
27	Captopril, clonazepam, diclofenaco, fluoxetina, paracetamol
28	Dipirona, morfina, ondansetrona, tamoxifeno
29	Baclofeno, clonazepam, cloreto de sódio, enoxaparina sódica, levotiroxina, losartana
30	Aciclovir, albendazol, alemtuzumab, carbamazepina, dexclorfeniramina, metilprednisolona, metronidazol, paracetamol, ranitidina, sertralina, tiabendazol
31	Ácido acetilsalicílico, codeína, losartana
32	Alprazolam, beclometasona, diosmina, enalapril, hidroclorotiazida, levanlodipino, metformina omeprazol, sinvastatina, venlafaxina
33	Amitriptilina, anlodipino, baclofeno, cefuroxima, heparina sódica, omeprazol, tramadol
34	Amitriptilina, ciclobenzaprina, clorfeniramina, estradiol, fenilefrina, levotiroxina, paracetamol
35	Ácido acetilsalicílico, amitriptilina, beclometasona, budesonida, clonazepam, dipirona, enalapril, formoterol, genfibrozila, glibenclamida, hidroclorotiazida, imipramina, metformina, nortriptilina, omeprazol, risperidona, salbutamol, sertralina, sinvastatina
36	Amitriptilina, dexametasona, diazepam, dipirona, fenergan, haloperidol, morfina, sertralina, tramadol

Tabela 24. Outros medicamentos utilizados pelos participantes (n=66) (Continuação)

Participante	Outros medicamentos
37	Ácido acetil salicílico, carbamazepina, ciclobenzaprina, doxazosina, duloxetiina, enaparil, finasterida, rosuvastatina, valeriana
38	Amitriptilina, baclofeno, captopril, metadona, oxibutinina
39	Ciclobenzaprina omeprazol
40	Cálcio, imunoglobulina, losartana, piridostigmina, prednisona, rituximabe, vitamina D3
41	Cálcio vitamina D3, oxibutinina, nortriptilina, zidovudina, lamivudina, efavirenz, ciprofibrato
42	Alopurinol, anlodipino, atenolol, clonidina, dipirona, enoxaparina sódica, fluoxetina, gentamicina, hidralazina, insulina, lactulose, lorazepam, omeprazol, tramadol, vancomicina, varfarina
43	Amitriptilina
44	Ácido acetilsalicílico, alopurinol, baclofeno, carvedilol, clonazepam, clopidogrel, furosemida, hidroclorotiazida, isossorbida, losartana, omeprazol, rosuvastatina tramadol, trimetazidina
45	-
46	Acitretina, calcipotriol, captopril, hidroclorotiazida, genfibrozila, glucosamina, insulina, metformina, omeprazol, paroxetina, tamsulon
47	Amitriptilina, fluoxetina, topiramato
48	Nortriptilina, sulprida
49	Cavilon, cetoconazol, clonazepam, codeína dipirona, enoxaparaina sódica, hidroclorotiazida, hirudoid, lactulose, losartamana, metformina, omeprazol, paracetamol, varfarina
50	Ácido fólico, amitriptilina, diosmina, hidroxicloroquina, levotiroxina, metadona, metformina, morfina, omeprazol pentoxifilina, piperaciclicna, varfarina.
51	Fluoxetina, omeprazol
52	Clonazepam, clorpromazina, losartana
53	Amitriptilina, amoxicilina+clavulanato de potássio, anlodipino, betaistina, cetoconazol, claritromicina, dipirona, enalapril, fenoterol, heparina sódica, ipratrópio,lactulose, metformina, omeprazol, seretide, tramadol
54	Ácido acetilsalicílico, anlodipino, dipirona, fluoxetina, hidroclorotiazida, hipromelose, lactulose, levotiroxina, losartana, nitrazepam, omeprazol, sinvastatina, tramadol, trazodona
55	Atenolol, losartana, omeprazol, tiocolchicosideo, venlafaxina
56	Amitriptilina, tamoxifeno
57	Estazolam
58	Ácido acetilsalicílico, atorvastatina, ciprofibrato, insulina, metadona, metformina, nortriptilina
59	Ciclobenzaprina, dipirona, fluoxetina
60	Ácido acetilsalicílico, carvediol, ciprofibrato, omeprazol
61	Amitriptilina, metoprolol, tamoxifeno, topiramato, tramadol
62	Baclofeno, captopril, ceftriaxona, clonazepam, codeína, dipirona, enoxaparina sódica, fluoxetina, levotiroxina, omeprazol, paracetamol, sinvastatina, vitaminas A e D
63	Metadona
64	Ácido acetilsalicílico, cálcio, ceftriaxona, clonazepam, codeína, enoxaparina sódica, paracetamol, prednisona, propranolol, sinvastatina
65	Nortriptilina, sertralina
66	Coenzima Q10, doxazosina, duloxetina, vitaminas B1 e B12